



JULIUS-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT WÜRZBURG

INSTITUT FÜR PHYSIKALISCHE UND THEORETISCHE CHEMIE

**Theoretische Untersuchungen zur
Aufklärung der reversiblen Hemmung
durch kovalente Inhibitoren**

*der Enzyme
Golgi- α -Mannosidase
und Rhodessin*

DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES NATURWISSENSCHAFTLICHEN
DOKTORGRADES
DER JULIUS-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT WÜRZBURG

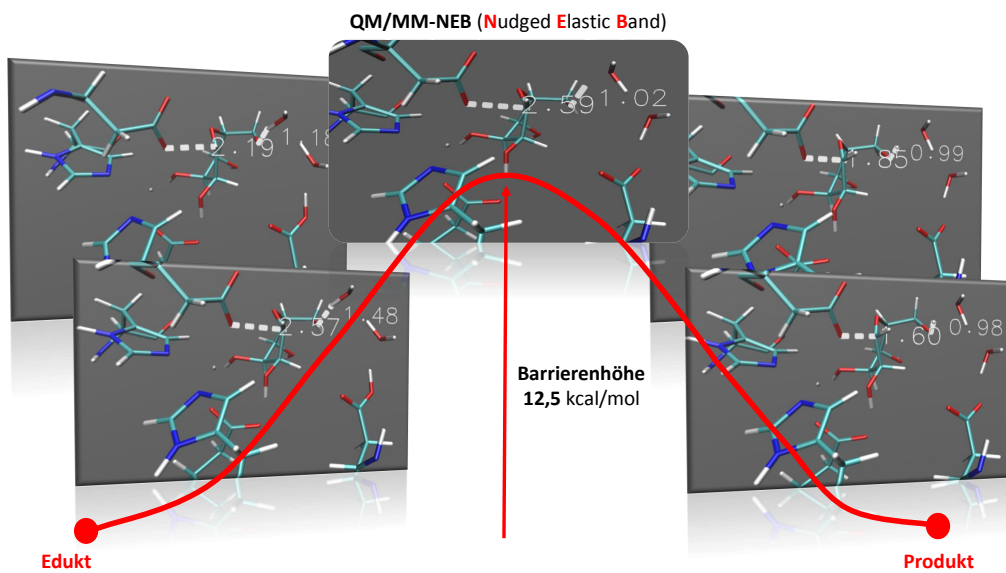
VORGELEGT VON

ANASTASIA WEICKERT

aus Prichsenstadt

Würzburg 2023





Schematische Darstellung der Methode zur Ermittlung der Barrierehöhe am Beispiel der Inhibition der Golgi- α -Mannosidase (GM II) durch die Leitstruktur β -L-Anhydrogulose.



JULIUS-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT WÜRZBURG

INSTITUT FÜR PHYSIKALISCHE UND THEORETISCHE CHEMIE

**Theoretische Untersuchungen zur Aufklärung der
reversiblen Hemmung durch kovalente Inhibitoren**

*der Enzyme
Golgi- α -Mannosidase
und Rhodospirillum rubrum*

DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DES NATURWISSENSCHAFTLICHEN
DOKTORGRADES
DER JULIUS-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT WÜRZBURG
VORGELEGT VON
ANASTASIA WEICKERT

Würzburg 2023



JULIUS-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT WÜRZBURG

INSTITUT FÜR PHYSIKALISCHE UND THEORETISCHE CHEMIE

Eingereicht bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie am

Gutachter der schriftlichen Arbeit

1. Gutachter: _____

2. Gutachter: _____

Prüfer des öffentlichen Promotionskolloquiums

1. Prüfer: _____

2. Prüfer: _____

3. Prüfer: _____

Datum des öffentlichen Promotionskolloquiums

Doktorurkunde ausgehändigt am

meiner Familie

Zusammenfassung

Die Entwicklung maßgeschneiderter Proteinliganden ist ein integraler Bestandteil unterschiedlicher wissenschaftlicher Disziplinen, wie z.B. Wirkstoffentwicklung. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der reversiblen Inhibition in Form von kovalent gebundenen Enzym-Inhibitor-Komplexen der humanen Golgi α -Mannosidase II (GM II) und der Cysteinprotease Rhodesain. Beide Enzyme sind erfolgversprechende Targets in der Bekämpfung von zwei sehr unterschiedlichen Erkrankungen. Einerseits die Golgi α -Mannosidase bei der Behandlung der Tumorprogression^{[1][2]} und andererseits die Cysteinprotease Rhodesain bei der Behandlung der Afrikanischen Schlafkrankheit^{[3][4]}. Die Arbeit an den zwei Enzymen unterteilt sich in zwei Teilprojekte.

Die Entwicklung von maßgeschneiderten kovalent-reversiblen Inhibitoren für die genannten Enzyme wurde im Rahmen eines in-house entwickeltes Protokolls zwecks des rationalen Designs kovalenter Inhibitoren, durchgeführt.^{[5][6][7]}

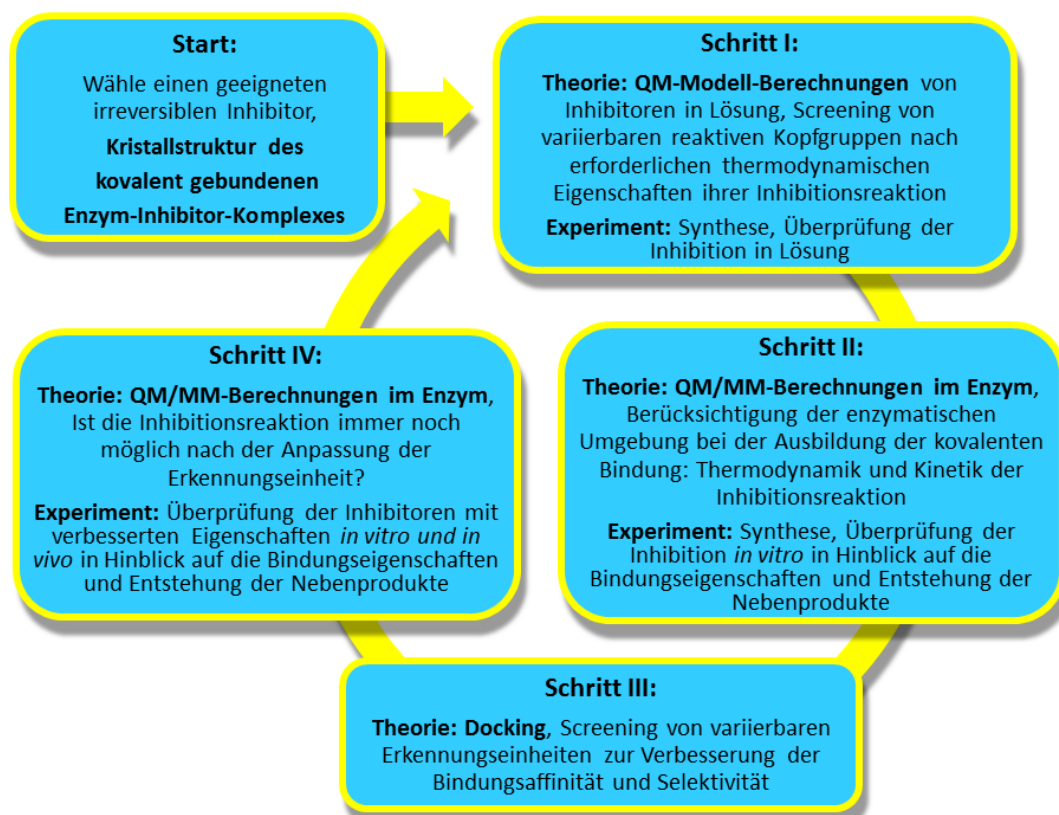


Abbildung 1: Das in-house entwickelte Protokoll zum rationalen Design kovalenter Inhibitoren^[5]. Es werden im Wesentlichen die vier Schritte eines Kreislaufs zwischen experimenteller und theoretischer Untersuchung beschrieben. Die detaillierte Beschreibung findet sich im Text wieder.

Dieses Protokoll basiert auf einer sich gegenseitig unterstützenden Zusammenarbeit zwischen Theorie und Experiment (Abbildung 1). Die vorliegende Arbeit befasst sich mit den theoretischen Untersuchungen mit Hilfe der quantenmechanischen (QM^[8]) als auch mit Hilfe der kombinierten quantenmechanisch/molekülmechanischen (QM/MM^{[9][10][11]}) Methoden zu den genannten Enzymen. In einem ersten Schritt des Protokolls geht es um die Anwendung von Screeningverfahren. In einem Screening werden Leitstrukturen, zunächst in Lösung (Schritt I in Abbildung 1), für eine weitere Untersuchung im Enzym (Schritt II in Abbildung 1) evaluiert. So können die Inhibitoren, für die experimentelle Mess- oder theoretische Dockingdaten vorhanden sind, als eine Leitstruktur betrachtet werden. Durch das Screening unter Verwendung der quantenmechanischen (QM-Modell) Methode kann eine Reihe von Inhibitoren nach einem sich konsistent veränderndem Muster erstellt werden und auf Bindungsparameter hin untersucht werden (Schritt I, fettgedruckt Theorie). Diese Parameter sind Reaktionsenergien und Höhen der Reaktionsbarriere einer Inhibitionsreaktion. Reaktionsenergien werden in dieser Betrachtung quantenmechanisch innerhalb der Born-Oppenheimer-(BO)-Näherung und im Rahmen des Konzeptes der Potentialhyperflächen (im Weiteren PES für potential energy surface) als relative Energien zwischen den optimierten Geometrien der Produkte und der Edukte auf einer Potentialhyperfläche für die Inhibitionsreaktion ermittelt. Die Höhen der Reaktionsbarrieren werden durch die relativen Energien zwischen den Geometrien der Edukte und der Zwischenstufen oder Übergangszustände abgeschätzt. Unter Inhibitionsreaktion wird eine chemische Reaktion verstanden, bei der eine kovalente Bindung zwischen dem Inhibitormolekül und den Aminosäuren in der aktiven Tasche eines Enzyms ausgebildet wird. Für den Schritt I werden die Aminosäuren der aktiven Tasche durch kleine Moleküle, wie Essigsäure und Methanthiol, angenähert. Die kovalent-reversiblen Inhibitoren sollten in dieser Betrachtung nur leicht exotherme Reaktionen mit den relativen Energien ($= \Delta E_{\text{Rx}}$ -Reaktionsenergien, welche detailliert in Abbildungen 4.5 und 5.1 des Hauptteils präsentiert werden) im Bereich -5 bis -10 kcal/mol aufweisen. Der experimentelle Teil liefert währenddessen die Synthese der neuen Inhibitoren und die Nachweise zur kovalenten Bindung mit Hilfe massenspektrometrischer Messungen (Schritt I, fettgedruckt Experiment). Die passenden Kandidaten aus dem ersten Schritt des Protokolls, d.h. Inhibitoren mit gewünschten Bindungsparametern, werden durch die QM/MM-Berechnungen im Enzym (Schritt II, fettgedruckt Theorie) und durch die experimentellen Messungen an den Enzym-Inhibitor-Komplexen in Assays (Schritt II, fettgedruckt Experiment) analysiert. Die Untersuchungen für die Stufe II des Protokolls umfassen die Berechnungen der Reaktionsprofile und Minimumenergiereaktionspfade (MEPs)^[12] für die chemischen Reaktionen von Inhibitoren im Zielenzym^{[6][5][13]}. Detaillierte Beschreibungen der Edukt- und Produkt-Situationen von berechneten Inhibiti-

onsreaktionen im Enzym sind in Abbildung 26, sowie im Hauptteil der Arbeit in Abbildungen 4.8 und 5.9, dargestellt. Ein Pfad minimaler potentieller Energie, der zwei Minima (hier Edukt und Produkt) verbindet, stellt ein Reaktionsprofil für eine chemische Reaktion dar. In der vorliegenden Arbeit wird dies auch als Minimumenergiepfad (MEP)^[12] bezeichnet. Der Letztere lässt sich durch die Nudged Elastic Band (NEB^{[14][15]})-Methode und mittels Potentialhyperflächen^[13] darstellen. Die Reversibilität der Inhibitoren wurde anhand der berechneten chemischen Reaktionen in Form von erstellten Reaktionsprofilen analysiert und diskutiert. Durch Protein-Ligand Docking (Schritt III) wird ein Screening von variierbaren Erkennungseinheiten der neuen Inhibitoren durchgeführt. Die Ergebnisse der Untersuchungen aus dem dritten Schritt liefern Hinweise zur Weiterentwicklung der ausgewählten Inhibitoren. Die letzte Stufe des in-house Protokolls besteht in der erneuten Untersuchung der optimierten Inhibitoren mit Hilfe von Theorie und Experiment (Schritt IV). Die theoretische Untersuchung anhand von QM/MM-Berechnungen überprüft, ob die Inhibitionsreaktion der reaktiven Kopfgruppe nach der Änderung der Erkennungseinheit des Inhibitors weiterhin effektiv und nach dem gleichen Mechanismus mit der aktiven Seite des Enzyms ablaufen kann. Die experimentelle Untersuchung liefert, ähnlich wie im Schritt II, die messbaren Ergebnisse der Inhibition in Hinblick auf die Bindungseigenschaften und die Entstehung der Nebenprodukte.

Die Untersuchungen am System Mannosidase GM II wurden in Zusammenarbeit mit den Arbeitskreisen von Prof.Dr. J. Seibel^[16] und Prof.Dr. T. Schirmeister^[17] durchgeführt. Die Leitstruktur zur Entwicklung des kovalent-reversiblen Inhibitors stellt der cyclische O,O-Acetal-Inhibitor (bestimmt anhand von Dockingexperimenten an der β -L-Anhydroglucose durch Arbeitskreis Prof.Dr. J. Seibel) dar (Abbildung 2).

Die Ergebnisse der theoretischen Studie liefern für den ersten Schritt im Rahmen des Protokolls den geeigneten Kandidaten aus einer Menge von insgesamt 22 modellierten Inhibitoren (siehe auch Tabelle 4.3) für die reversible Inhibition der Mannosidase GM II durch die Ausbildung einer kovalenten Bindung. Hierzu zählen zunächst die thermodynamischen Modellberechnungen der Inhibitionsreaktion, welche die Reaktionsenergien (ΔE_{Rx} , Abbildung 3) für alle Kandidaten des Screenings liefern. Die Inhibitionsreaktion wird in diesem Schritt als Additionsreaktion von Essigsäure an den Inhibitor-Kandidaten modelliert (Abbildung 3).

Für die Leitstruktur (= Inhibitor Nr. **1** in diesem Schritt der Untersuchung) resultiert eine thermoneutrale Beschreibung der Reaktion ($\Delta E_{Rx}=0,2$ kcal/mol) mit Essigsäure und dient im Weiteren als Referenz. Der Inhibitor Nr. **7** (der cyclische N,O-Acetal-Inhibitor) zeigt mit $-7,7$ kcal/mol eine leicht exotherme Reaktion und somit eine bessere Triebkraft der untersuchten Reaktion im Vergleich zur Referenz. Die beiden Inhibitoren wurden dann für Stufe 2 des Protokolls untersucht, in

der eine Analyse der Reaktionsprofile im Enzym mit Hilfe der QM/MM-Methodik durchgeführt wurde. Die Ergebnisse des zweiten Teils der Studie zeigen, dass der cyclische N,O-Acetal-Inhibitor eine deutlich bessere Affinität zur aktiven Seite der GM II im Vergleich zu seiner Leitstruktur aufweisen sollte. Dies zeigt sich auch in der deutlich höheren Triebkraft der Inhibitionsreaktion von ca. -13 kcal/mol. Dieser Energiebeitrag ist klein genug, um eine Reversibilität der Inhibitionsreaktion gewährleisten zu können. Das bedeutet auch, dass der N,O-Acetal-Inhibitor im Vergleich zur Referenzstruktur eine deutlich stärkere Inhibition bedingen sollte. Berücksichtigt man dann noch, dass die Reaktion laut Berechnungen nur leicht exotherm sein sollte, erhält man die Möglichkeit einer reversibel stattfindenden kovalenten Hemmung. Zusammenfassend liefert dieser Teil der Arbeit, der mit Hilfe der QM- und QM/MM-Berechnungen durchgeführt wurde, ein reaktives molekulares Gerüst mit den gewünschten Eigenschaften. Die experimentellen Untersuchungen zur zweiten Stufe des hausinternen Protokolls sind noch nicht durchgeführt.

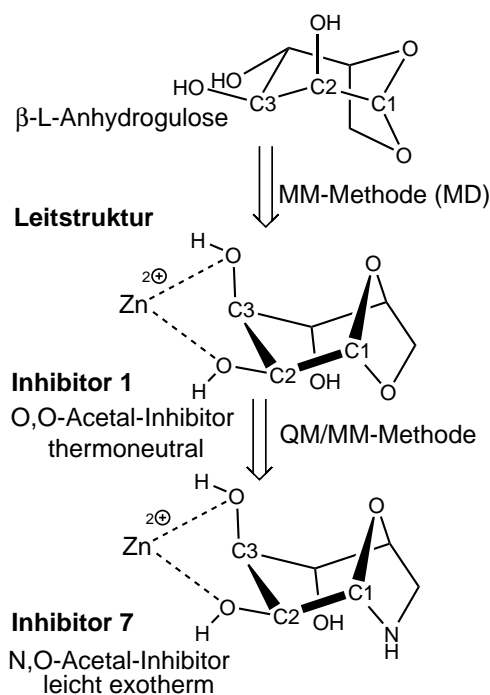


Abbildung 2: Schematische Darstellung bis hin zur Entwicklung des kovalent-reversiblen Inhibitors Nr. 7 (der cyclische N,O-Acetal-Inhibitor) für das Enzym Mannosidase GM II.

Durch die theoretischen Untersuchungen (MD-Simulationen am Enzym-Inhibitor-Komplex) konnte außerdem eine zur Komplexbildung geeignete Konformation der Leitstruktur sowie des neuen Inhibitors gefunden werden. Die reversibel agierenden Acetal-Inhibitoren befinden sich in der aktiven Tasche in einer energetisch höher liegenden Twist-Boot-Konformation und begünstigen mit zwei entstehen-

den Bindungen zum Zn^{2+} -Ion die oktaedrische Koordination im Enzym (durch die Hydroxygruppen der C2- und C3-Kohlenstoffatome gezeigt als 2D-Darstellung in Abbildung 2 und als 3D-Darstellung in Abbildung 4).

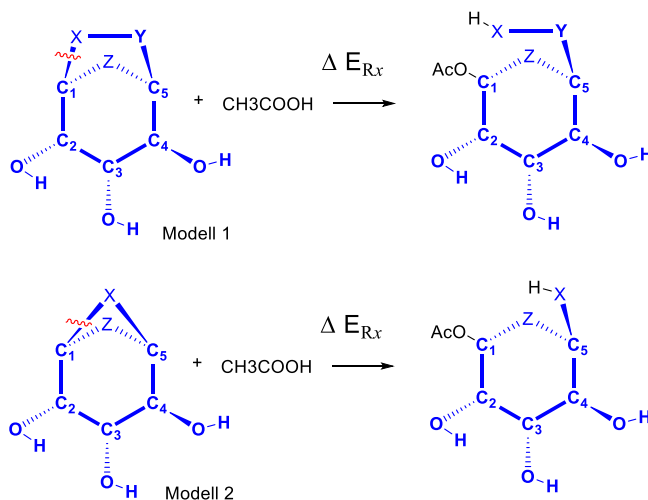


Abbildung 3: Schematische Darstellung zur Berechnung der Reaktionsenergien (Thermodynamik) der Inhibitionsreaktion des Enzyms Mannosidase GM II untersucht für den Screening-Schritt durch die QM-Berechnungen in wässriger Umgebung.

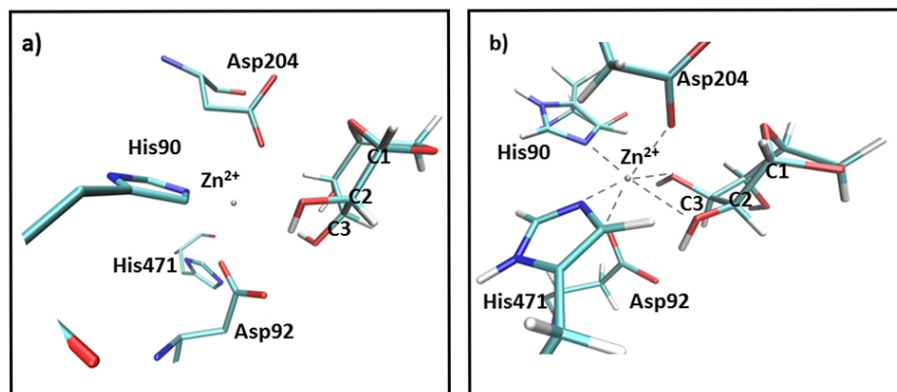


Abbildung 4: Vergleich der nicht-kovalenten Enzym-Inhibitor Komplexe a) vor der MD Simulation (aus Docking): Keine Koordination mit dem Zn^{2+} -Ion möglich und b) nach der MD Simulation: Koordination des Liganden zum Zn^{2+} -Ion ist durch die Hydroxy-Gruppen der C2 und C3 Atome erreichbar.

Als Teil dieser Arbeit wurden NEB-Berechnungen (Nudged Elastic Band^[15], Abbildung 5) zur Bestimmung von Minimumenergiepfaden (im Weiteren MEP für Minimumenergiepfad) durchgeführt. Dies lieferte erweiterte Einblicke in der Berechnung von Reaktionsmechanismen jeweils auch in Kombination von 2- bzw.

3-dimensionalen Scans. Auch in der Beschreibung von Protonenübertragungsreaktionen^[18] nach Grothaus, die einem Umklappen^[19] der kovalenten Bindungen entsprechen, erhält man hier Geometrien für die Teilschritte und somit eine detaillierte Beschreibung des Vorgangs (Abbildung 7).

Der Mechanismus der Inhibition von GM II durch die Leitstruktur beinhaltet einen Wasser-katalysierten (oder auch Wasser-vermittelten) Ringöffnungsschritt in der Tasche des Enzyms (Abbildung 7). Die Testrechnungen zum Protontransfer haben gezeigt, dass der Protontransfer über ein oder mehrere Wassermoleküle unter Verwendung von Standard-PES-Berechnungen (lediglich durch die Variation der Bindungsabstände OD2-C1 und O6-H, Abbildung 6.9) nicht spontan stattfindet. Die Berechnung des MEP durch das Erstellen einer 3-dimensionalen Potentialhyperfläche kann nur dann sinnvolle Ergebnisse liefern, wenn der Protontransfer vom Aspartat Asp341 zum Inhibitor über zwei Wassermoleküle explizit berücksichtigt wird (Abbildung 4.26). In diesem Fall ist die Berechnung der PES kein Standard und erfordert eine zusätzliche Variation der Bindungsabstände O-H der beteiligten Moleküle des Protontransfers. Die Details für die zusätzliche Variation der Bindungsabstände O-H bei der Berechnung der 3-dimensionalen PES haben die NEB-Berechnungen geliefert. Der NEB^{[14][12]}-Formalismus hat sich in der Beschreibung dieser komplexen Reaktionskoordinaten als besser geeignet erwiesen und wurde in dieser Arbeit aus diesem Grund hauptsächlich verwendet. Die Berechnung des Protonentransfers während einer Hemmungsreaktion durch zwei Wassermoleküle mit der NEB-Methode hat den MEP ermittelt, welcher zunächst nicht auf der Grundlage eines 3-dimensionalen Scans ermittelt werden konnte. Solche QM/MM-Rechnungen wurden im Rahmen des in-house Protokolls zum ersten Mal durchgeführt. Dieser Protontransfer ist mit dem Grothaus-Mechanismus konform und kann plausibel anhand einer Klapp-Mechanismus-Betrachtung^[19] nachvollzogen werden (Abbildung 7).

Mit Hilfe der NEB^{[14][12]}-Methode ist es möglich MEPs effektiv und relativ schnell zu ermitteln. Es werden sowohl die Geometrien entlang des Pfades wie auch die einzelnen relativen Energien erhalten (Abbildung 5). Zur Überprüfung der gefundenen Übergangszustände (im Weiteren ÜZ für Übergangszustand) wurden die einzelnen Strukturen mit Hilfe der Normalmodenanalyse weiter untersucht und konnten verifiziert werden (Abbildungen 4.24 und 4.25).

Die MEP-Berechnungen für den Inhibitor Nr. **1** ermöglichen die Etablierung eines Protokolls zur Berechnung eines Reaktionspfades über mehrere Moleküle, welches anschließend zur Berechnung des MEP für den Inhibitor Nr. **7** angewendet wird. Das Protokoll beinhaltet in seiner einfachen Form die Ermittlung der „Two-End“-Komponenten einer chemischen Reaktion - Geometrien von Reaktant und Produkt. Betrifft dies eine Reaktion, die über mehrere Moleküle, z.B. Wassermoleküle oder deren Netzwerk, stattfindet, wird die Aufgabe komplexer. In

diesem Fall ist eine Berechnung mit Hilfe des NEB-Moduls wesentlich produktiver als die Charakterisierung mit Hilfe der 3-dimensionalen PES. Der Vorteil liegt in der kollektiven Beschreibung der Reaktionskoordinaten, sodass die entscheidenden Reaktionskoordinaten und Variablen für die Durchführung von Scans nicht einzeln bestimmt werden müssen. Dennoch kann es hier bei komplexen Reaktionskoordinaten auch zu Konvergenzproblemen bzw. zu langwierigen Optimierungszyklen kommen. In dieser Arbeit wurde die CI-NEB-Version^{[20][15][21]} der NEB^[14]-Methode verwendet (CI für *climbing image*^[15]). Der mögliche Übergangszustand (ÜZ) wurde mittels der Dimer-Methode^{[22][23][24][21]} ausgehend von der projizierten CI-Geometrie optimiert (im Weiteren als CI^[15]-NEB^[14]-Dimer^[24]-Methode erwähnt).

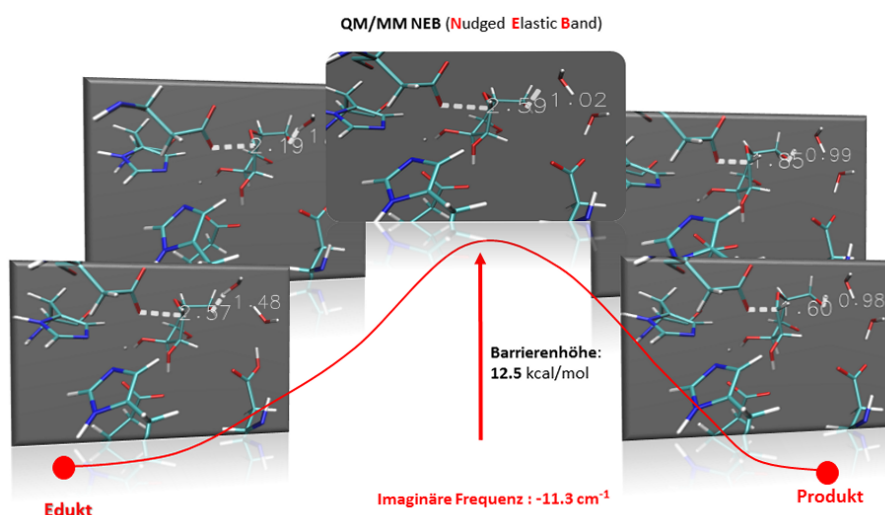


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Methode zur Ermittlung der Barrierrhöhe am Beispiel der Inhibition der GM II durch den Inhibitor Nr. 1 (β -L-Anhydrogulose). Durch die berechneten Geometrien des Edukts und des Produkts wird der MEP der Reaktion mittels der CI-NEB-Optimierung^{[20][15][21]} ermittelt. Der Übergangszustand (ÜZ) wird mittels der Dimer-Methode^{[22][23][24][21]} optimiert. Zum Nachweis der Richtigkeit des so gefundenen Übergangszustands wird eine Frequenzrechnung benutzt. Erhält man hier für die erste Mode eine imaginäre Frequenz, so bestätigt dies den ÜZ.

Als weiteres Resultat liefern die durchgeführten MEP-Berechnungen Einblicke in die katalytischen Eigenschaften der Wassermoleküle für den Protonübertragungsmechanismus nach Grotthuss. Die Daten zeigen, dass die Barriere am niedrigsten wird, wenn zwei Wassermoleküle beim Protontransfer beteiligt sind (Datenreihe 6 im Diagramm 4.12). Wenn nur ein oder gar kein Wassermolekül die Ringöffnung katalysiert, steigt die Barriere auf 12 und 17 kcal/mol (Datenreihen 2 und 3 im Diagramm 4.12).

Die Untersuchung in diesem Teil der Arbeit lässt zudem Einblicke in die nukleo-

phile Substitution der Vollacetale in der Enzym-Tasche der GM II erlangen. Die Rechnungen deuten darauf hin, dass die Vollacetal-Inhibitoren durch Wassermoleküle in der Tasche aktiviert werden. Die ausgebildeten Wasserstoffbrückenbindungen begünstigen die Geometrie des Enzym-Inhibitor-Komplexes. Dies befördert die Ringöffnungsreaktion gleichzeitig mit dem nucleophilen Angriff des Aspartatrestes an dem C1-Atom des Inhibitors (Abbildung 4.12). Im Falle des gemischten Acetal-Inhibitors hingegen wird die Treibkraft bereits durch die Einführung des Stickstoffatoms deutlich erhöht. Durch die richtig angeordneten Grotthus-Wassermoleküle ist in diesem Fall die Barriere der Protonübertragung durch das Aspartat-Aspartat-System der GM II (Asp341/Asp240) sekundär. Betrachtet man die Schwingungsbewegung entlang der imaginären Moden der Übergangszustände, sind diese in beiden E-I-Komplexen ähnlich (vgl. Abbildungen 6 und 4.25). Hierbei wird eine synergistische Bewegung der Bindungsabstände OD2-C1-O6 (Inhibitor Nr. **1**) bzw. OD2-C1-N (Inhibitor Nr. **7**) beobachtet. Der nukleophile Angriff an C1- durch das OD2-Atom findet nahezu gleichzeitig mit der Spaltung der Abgangsgruppe statt. Der Mechanismus der nukleophilen Substitution, die während der Inhibitionsreaktion der GM II durch die untersuchten Inhibitoren stattfindet, kann somit nach der IUPAC Nomenklatur durch D_NA_N ^[25] klassifiziert werden.

Abbildung 6: Normale Schwingungsmode (siehe als Animation im pdf-Format) des Übergangszustands des Enzym-Inhibitor-Komplexes GM II-Inhibitor Nr. **7** mit der imaginären Frequenz von $-100,76 \text{ cm}^{-1}$, berechnet mit Hilfe der CI-NEB-Dimer-Methodik^[21] innerhalb des QM/MM-Formalismus. Die Abbildungen der Animation wurden mit Hilfe des Molden-Pakets^[26] dargestellt.

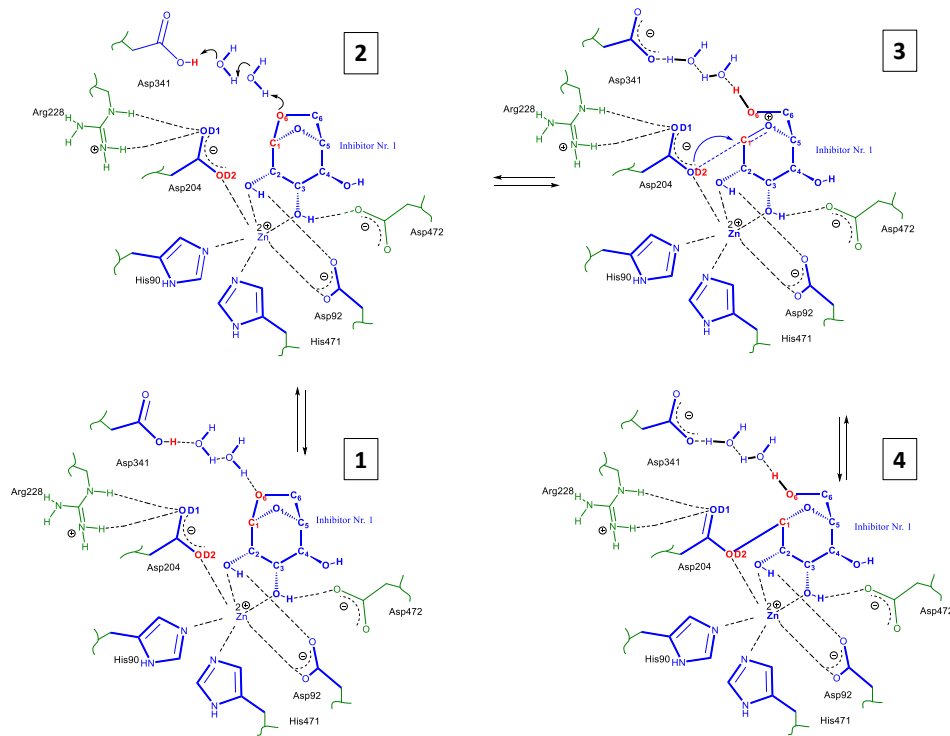


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Reaktionsmechanismus $D_N A_N$ ^[25] für die Inhibitionsreaktion der Mannosidase GM II mit dem Inhibitor Nr. 1. Zwei Wassermoleküle (ein Netzwerk der Wasserstoffbrückenbindungen) leiten den Protontransfer ein. 1: Ausgangspunkt bildet der nicht-kovalente Enzym-Inhibitor-Komplex mit zwei Wassermolekülen, die durch H-Brücken Asp341 mit Inhibitor Nr. 1 verbinden. 2: Darstellung des Protontransfers. 3: Übergangszustand, der OCI-Charakter aufweist. 4: Darstellung des kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplexes. Die Farbkoordination zeigt in blau den Teil, der in den Berechnungen als QM-Teil beschrieben wurde, und die grün dargestellten Bereiche wurden mit MM beschrieben. Die in rot dargestellten Atome implizieren die wesentlichen Änderungen der Reaktionskoordinaten auf einem Reaktionsprofil.

Die Entwicklung der kovalent-reversiblen Inhibitoren für das Enzym Rhodessain wurde in Zusammenarbeit mit dem Arbeitskreis Prof.Dr. T. Schirmeister^[17] durchgeführt. Als Leitstruktur zur Entwicklung des neuen kovalent-reversiblen Vinylsulfon-Inhibitors 4-Pyridyl-Phenylalanyl-Homophenylalanyl- α -Fluor-Phenylvinylsulfon^[5] dient in diesem Projekt der kovalent-irreversibel bindende Inhibitor K777^[27], für den kristallographische Daten (hier als K11777^[4]) bekannt sind (Abbildung 8).

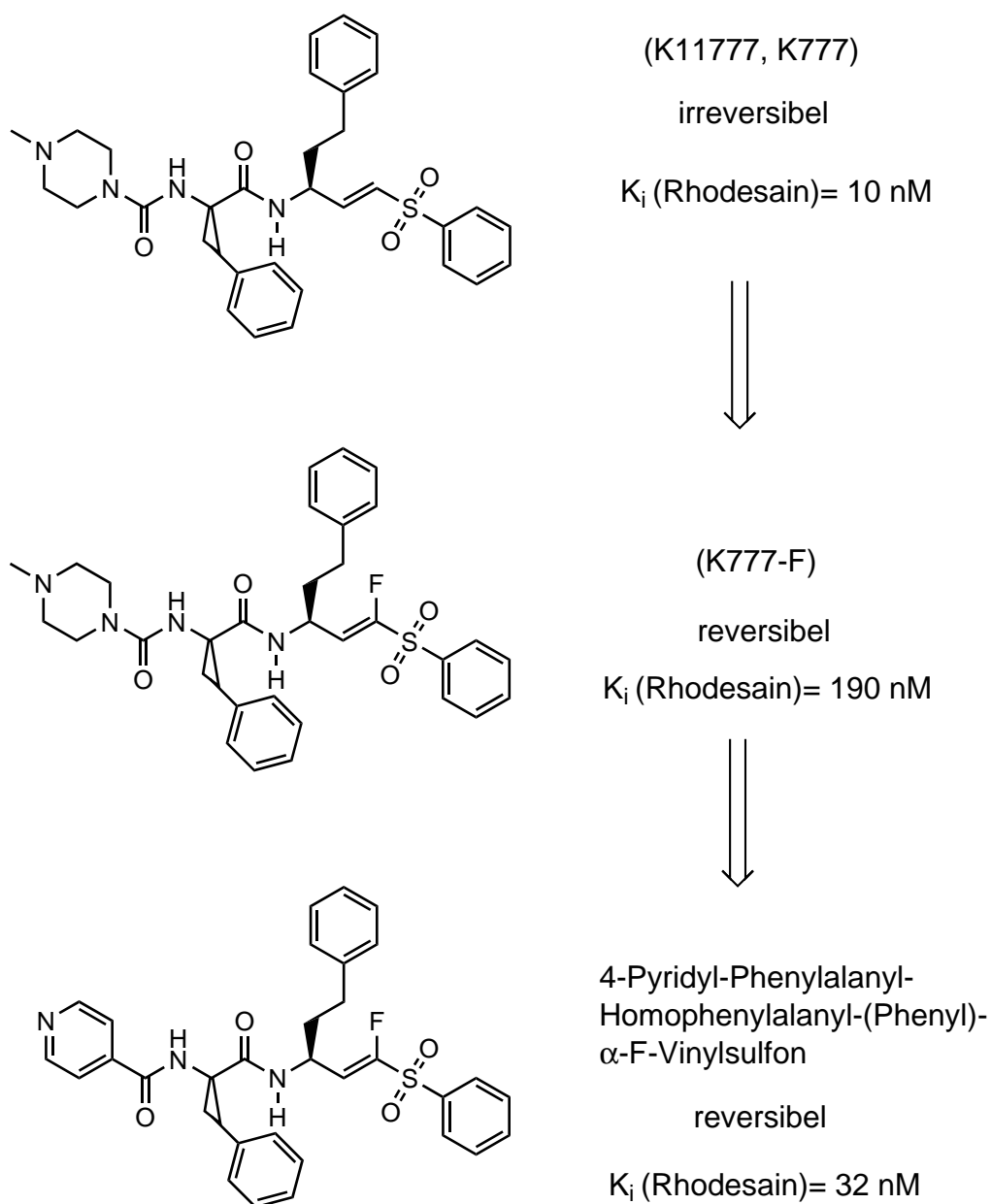


Abbildung 8: Schematische Darstellung zur Entwicklung des kovalent-reversiblen Inhibitors für das Enzym Rhodessain.

Im Rahmen des Protokolls (Abbildung 1) wurde eine Reihe von Inhibitoren untersucht, in denen ein α -H-Atom der Vinylsulfon-Einheit (im Weiteren VS für Vinylsulfon) durch verschiedene Gruppen X substituiert wurde (Abbildung 9). Sie

werden im Folgenden mit K777-X abgekürzt.

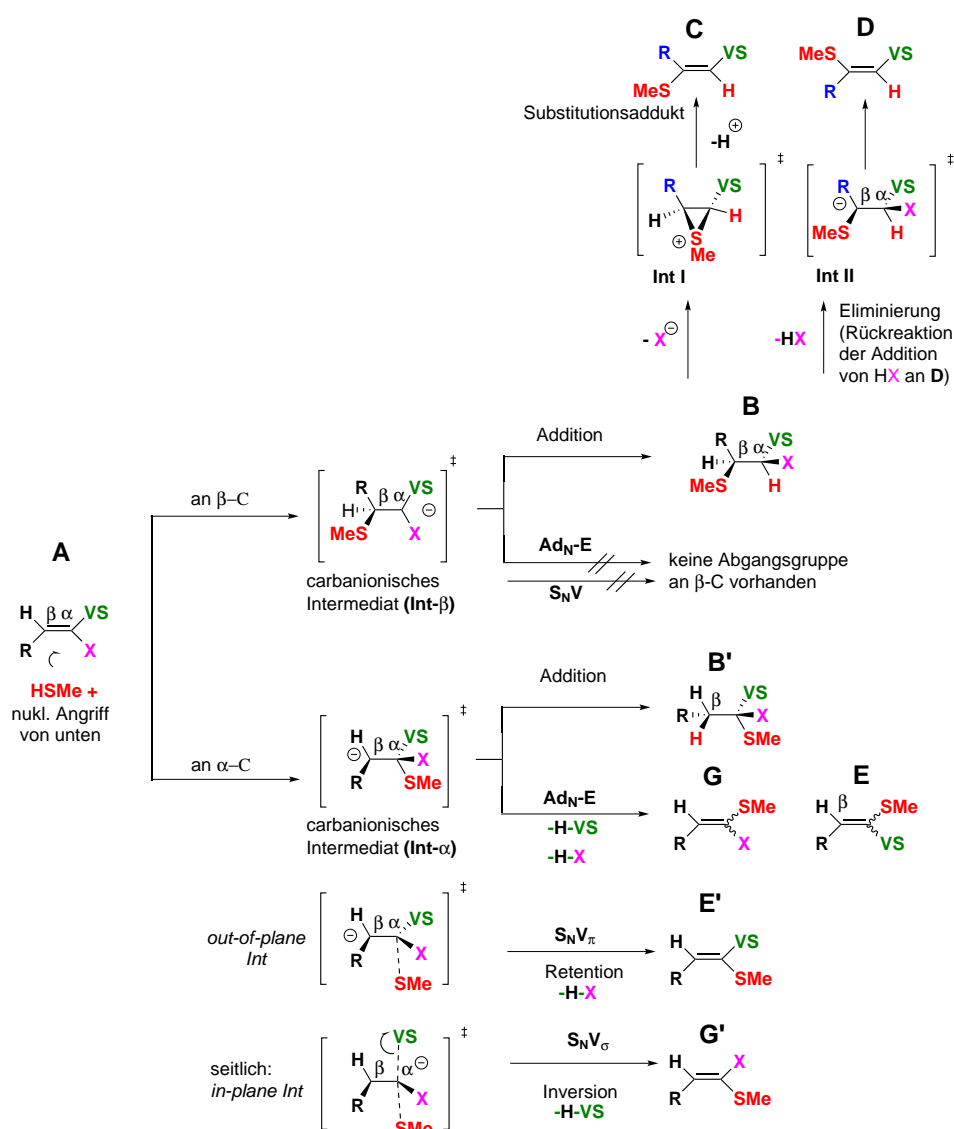


Abbildung 9: Mechanistische Routen der VS-Kopfgruppe des Inhibitors K11777 mit einem variablen X-Substituenten durch den nukleophilen Angriff von Methylthiol. In den Berechnungen wurde für R die Methylgruppe verwendet.

Für den zunächst vorgeschlagenen Cyano-Substituent (CN) in einem VS-Inhibitor (Abbildung 10) ergab sich bei Berechnungen in einem polaren Lösungsmittel eine relativ niedrige Reaktionsenergie, d.h. es wurde eine reversible Reaktion vorhergesagt. Dies wurde experimentell bestätigt. Die theoretischen und experimentellen Ergebnisse von Schritt II (Reaktion mit Enzym, Abbildung 1) widersprechen sich aber. Während experimentell eine schwache reversible Hemmung gefunden wurde, sagten die Berechnungen keine Hemmung voraus. Tatsächlich zeigte sich im Nachhinein, dass die experimentell gefundene Hemmung nicht-kompetitiv ist, d.h. nicht in der aktiven Tasche stattfindet. Im Rahmen des Protokolls werden

dagegen nur die kompetitiv interagierenden Inhibitoren ausgewertet. An dieser Stelle lassen sich die anhand theoretischen Methoden erhaltenen Daten über die Reversibilität der Hemmung (Reaktion im aktiven Zentrum) mit den Ergebnissen aus den experimentellen Untersuchungen (Reaktion außerhalb des aktiven Zentrums) nicht vergleichen.^[28] Durch den Wechsel von CN zu Halogenen wurde schließlich eine neue Reihe von Inhibitoren auf VS-Basis entwickelt. Die Berechnungen von Reaktionsenergien in Lösung und im Enzym haben für diese Inhibitoren eine reversible Hemmung vorhergesagt. Allerdings findet man eine einfache Additionsreaktion an der Doppelbindung der Vinylsulfon-Gruppe. Für X=CN wurde von einer S_N2-Reaktion ausgegangen. Für X=Br fand man, dass sich nach der Addition ein HBr-Molekül abspaltet, sodass die Hemmung insgesamt irreversibel ist (Abbildung 11). Da die Substitutionsreaktion ein irreversibler Prozess ist und die Freisetzung von Bromwasserstoff durch die experimentellen Untersuchungen bestätigt werden konnte, scheint Fluor ein geeigneter Substituent zu sein (X=F).

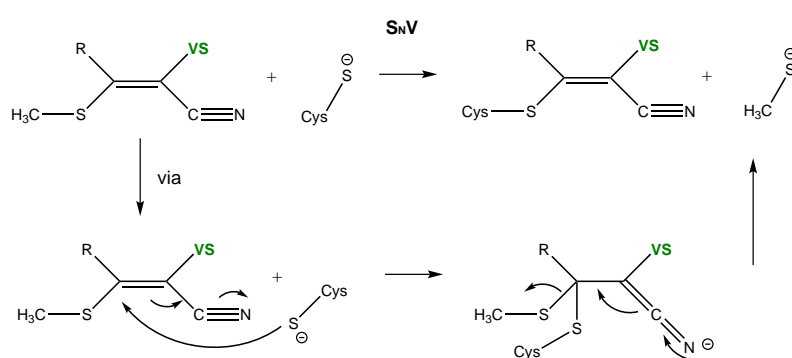


Abbildung 10: Reaktionsschema des reversiblen VS-Inhibitors mit dem Cyano-Substituenten.

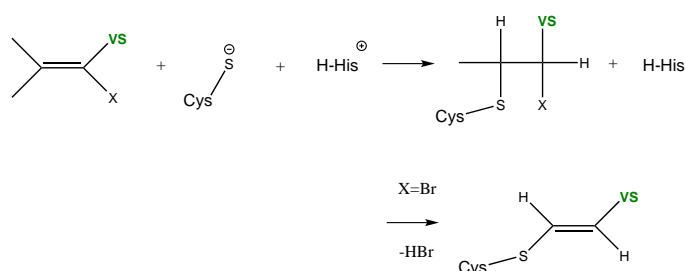


Abbildung 11: Reaktionsschema des irreversiblen VS-Inhibitors mit dem Bromid-Substituenten.

Hier konnte man auch experimentell eine deutlich bessere Hemmung messen. Es wurden daher die Berechnungen im Enzym für Systeme mit den Inhibitoren K777-X mit X=F und X=H (K777-F- und K777-H-Inhibitor) durchgeführt und analysiert. In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, die Reversibilität des K777-

F-Inhibitors gegen die Irreversibilität des K777-H-Inhibitors durch die quantenmechanischen Berechnungen im Rahmen des Protokolls darzulegen.

Die QM/MM-Berechnungen unterteilen sich in zwei Bereiche. Zunächst wurde das Reaktionsprofil (auch Reaktionspfad) der Additionsreaktion des K777-X-Inhibitors an die aktive Tasche von Rhodensin ausgehend von der vorhandenen Kristallstruktur (PDB-Datei) berechnet. Im Folgenden wird dieses Teilergebnis als XP-Berechnung (im Weiteren XP für X-ray-Pfad) bezeichnet. Die detaillierte Beschreibung der Reaktionskoordinaten zum Start der QM/MM-Berechnung ist schematisch in Abbildung 5.9 gezeigt. Alle vier PES (X=H, F, Br und Cl) weisen prinzipiell die gleiche Form auf. Es ergeben sich aber Unterschiede in den berechneten Reaktionsenergien der Additionsreaktion (-20, -16, -10 und -11 kcal/mol). Die Reaktionsenergien der Substituenten Brom und Chlor entsprechen dem Bereich für reversible Reaktionen (ca. -10 kcal/mol), wobei Fluor mit -16 kcal/mol einen Grenzfall darstellt.^[5] Die Konturen der beiden PES (X=H vs. X=F) sind allerdings sehr ähnlich: In beiden Fällen findet sich für das anionische Intermediat kein Minimum (Abbildungen 5.11 und 5.14). In der Potentialhyperfläche für X=F steigt die Barriere der Rückreaktion zwischen dem Intermediat und dem nicht-kovalenten Komplex auf etwa 5 kcal/mol an, die Rückreaktion ist im Vergleich zu dem X=H mit ca. 1,5 kcal/mol leicht exotherm. Das veränderte Verhältnis zwischen der Höhe der Reaktionsbarriere und dem Betrag der Reaktionsenergie (der Übergang von der endothermen zur exothermen Reaktion) auf diesem Abschnitt der PES könnte dazu beitragen, dass die Gesamtreaktion insgesamt reversibel ablaufen kann. Die Reversibilität des Inhibitors mit dem Substituenten Fluor lässt sich auf diesem Schritt der Untersuchung durch die Absenkung der Reaktionsenergie der Additionsreaktion auf etwa 16 kcal/mol erklären, denn die irreversible Reaktionen wurden bisher mit deutlich höheren Reaktionsenergien assoziiert.^{[29] [13] [5]}

Die erhaltenen nicht-kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplexe der XP-Berechnungen wurden in einem zweiten Teilergebnis weiter verwendet, indem der Reaktionspfad der Additionsreaktion des K777-X-Inhibitors vom nicht-kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplex zum kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplex hin berechnet wurde. Im Folgenden wird dieses Teilergebnis als NP-Berechnung (NP für Nicht-kovalente-Pfad) bezeichnet. Die Darstellung der Reaktionskoordinaten zum Start der QM/MM-Berechnung ist in Abbildung 5.10 gezeigt.

Die Berechnung der Reaktionsprofile der Additionsreaktion des VS-Inhibitors für X=H und X=F am α -Kohlenstoffatom der VS-Kopfgruppe lieferte konsistente Ergebnisse in Bezug auf die Reaktionsenergien (Abbildungen 12 - 17). Ähnlich den XP-Berechnungen, wurde ebenfalls die Tendenz der Absenkung der Reaktionsenergie von -7 kcal/mol (X=H) auf -4,3 (X=F) und -0,9 kcal/mol (X=Br) beobachtet. Die Potentialhyperflächen (PESs) sind in den Abbildungen 16, 17 und

5.28 dargestellt. Die Thermodynamik der Additionsreaktion wurde durch einen Wechsel des Substituenten X von H nach F in der VS-Kopfgruppe des K777-X Inhibitors beeinflusst, indem die niedrigere Energiedifferenz zwischen den Edukten und den Produkten erzielt werden konnte. Für beide Teile der Arbeit (XP- und NP-Berechnungen) implizierte dies einen Wechsel von einem irreversiblen zum einem reversiblen Verlauf in der Beschreibung der Reaktionsprofile.

In Anbetracht dessen, dass der Inhibitor K11777 ein irreversibler Inhibitor durch die Additionsreaktion ist, ist die berechnete Reaktionsenergie von -7 kcal/mol in diesem Ansatz deutlich geringer als erwartet.^{[5][13]} Die bisherigen QM- und QM/MM-Berechnungen (siehe Abbildungen 5.2 und 5.11) sagten für die irreversiblen Inhibitoren deutlich höhere Reaktionsenergien vorher. An dieser Stelle tritt eine Diskrepanz der Ergebnisse der NP-Berechnungen mit den durchgeführten QM-Berechnungen an den VS-Inhibitoren in Lösung auf. Auch in der Halogenreihe der VS-Inhibitoren K777-X wird die Reaktionsenergie der Addition deutlich unterschätzt, wenn die QM/MM-Berechnungen nach dem NP-Ansatz durchgeführt werden. Die nahezu thermoneutrale Additionsreaktion des bromsubstituierten Inhibitors K777-Br und die zu geringe Reaktionsenergie des irreversiblen Inhibitors (K11777) lässt darauf schließen, dass die korrekte Darstellung von Reaktionsenergien durch den NP-Ansatz nicht erreicht werden kann.

Die Ergebnisse des zweiten Teils der Arbeit (NP-Berechnungen) liefern nicht nur die konsistent geringeren Reaktionsenergien (Thermodynamik) sondern auch die höheren Reaktionsbarrieren der Additionsreaktion im Vergleich zu den Ergebnissen der XP-Berechnungen. Die Änderungen der Reaktionsbarrieren im NP-Ansatz weisen zusätzliche Diskrepanzen auf, wenn diese jeweils mittels der PES-Scan- und CI-NEB-Dimer-Methodik berechnet werden. Während die Barriere des irreversiblen Inhibitors K11777 mit dem NEB-Ansatz ca. 11 kcal/mol beträgt und durch den PES-Scan nur um 4 kcal/mol höher liegt, ergibt sich eine umgekehrte Situation beim Übergang zu Fluor als Substituent: Durch die NEB-Berechnung liegt die Barriere bei ca. 18 kcal/mol und durch den PES-Scan ergibt sich eine um 4 kcal/mol niedrig liegende Barriere.

Um die Ergebnisse der NP-Berechnungen zu überprüfen, wurden diese QM/MM-Rechnungen wiederholt durchgeführt. In den beiden neu durchgeführten Berechnungen für die Inhibitoren K777-X mit X=H und X=F wurden nur sehr kleine Abweichungen gefunden, die kleiner als die Fehler der Berechnung sind. Die Startstrukturen für die Berechnung des MEP (QM/MM-System, siehe Details) stammten aus der erneut durchgeführten MD-Simulation an der Geometrie des nicht-kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplexes, welche die XP-Berechnung resultierte. Die Gesamtdauer der MD-Simulation wurde zu einem Wert von 9 ns gewählt, welche insgesamt 900 Startstrukturen entlang der Simulation lieferte. Die Berechnung ergab die Reaktionsenergie von $-8,4$ kcal/mol ($-7,0$ kcal/mol als ers-

tes Ergebnis) und die relative Energie des **Int**-Komplexes von 13,2 kcal/mol. Somit beträgt die Barriere der Rückreaktion zur Freisetzung des Inhibitors K11777 (X=H) in Form von einem nicht-kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplex einen Wert von 21,6 kcal/mol. In analoger Vorgehensweise wurde die Evaluierung der NP-Berechnung für den Inhibitor K777-X mit X=F durchgeführt. Die Reaktionsenergien in den beiden Berechnungen unterscheiden sich in einem marginalen Abstieg zu den Werten von -2,9 kcal/mol und -3,3 kcal/mol (-4,3 kcal/mol als erstes Ergebnis). Beide Berechnungen liefern zudem die relativ kleinen Anstiege der Reaktionsbarriere zu den Werten von 19,8 kcal/mol und 20,9 kcal/mol.

Für die Inhibitoren K777-X mit X=H und X=F entsprechen die gefundenen Barrieren einer verzerrten Konformation des nicht-kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplexes, die als eine bioaktive Konformation¹ bezeichnet werden kann. Der anionische Übergangszustand **Int***, der oft in der Literatur als ein anionisches Intermediat^{[31][32]} der Additionsreaktion bezeichnet wird, wurde nur für den Inhibitor mit dem Substituenten Brom (K777-X mit X=Br) identifiziert. Da der Übergangszustand (**Int*** mit der relativen Energie von 11,1 kcal/mol) nur 1,5 kcal/mol über der bioaktiven Konformation (**Int** mit der relativen Energie von 12,6 kcal/mol) liegt und die NEB-Reaktionspfade alleine die Barrieren überschätzen, besitzen die anionischen Übergangszustände der Additionsreaktion der Inhibitoren mit X=H und X=F eine geschätzte relative Energie mit vergleichbaren Abweichungen von ca. 2 kcal/mol zu den identifizierten **Int**-Geometrien. Die durchgeführten Berechnungen zeigen, dass die Substituenten X=H und X=F im Vergleich zum Brom die anionischen Geometrien der nicht-kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplexe jedoch mangelhaft bis ausreichend stabilisieren können. Zusätzlich liegt die geschätzte Energiedifferenz zwischen den Geometrien **Int*** und **Int** unter der möglichen Fehlergrenze der Berechnungen (ca. 3-4 kcal/mol). Aus diesem Grund misslang die Optimierung in Richtung der metastabilen anionischen Geometrien **Int*** mit Hilfe der CI-NEB-Dimer-Methodik im Fall der VS-Inhibitoren K777-X mit X=H und X=F.

Der direkte Vergleich der geometrischen Parameter der nicht-kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplexe für den Inhibitor K777-F aus den XP-Berechnungen mit solchen aus den NP-Berechnungen lässt darauf schließen, dass die Geometrien der Enzym-Inhibitor-Komplexe der XP-Berechnung nur die lokalen Minima mit der verzerrten Geometrie des Inhibitors auf der PES darstellen und die Gesamtinformation über die Barrieren der Reaktion durch die Ergebnisse aus der NP-Berechnung ergänzt werden sollten (Abbildung 19).

Zusammenfassend sagen die Berechnungen für die reaktiven Kopfgruppen der Substanzklasse der halogenierten Vinylsulfone K777-X (X=Br, Cl und F) im Ver-

¹Bioaktive Konformationen sind Geometrien der nicht-kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplexe, aus welchen die chemische Reaktion im Enzym am günstigsten stattfinden kann.^[30]

gleich zur Leitstruktur des Vinylsulfon-Inhibitors K11777^[4] deutlich geringere exotherme Additionsreaktionen im aktiven Zentrum von Rhodesain voraus.^[5] Darüberhinaus konnte anhand der QM/MM-Berechnungen ein experimentell gemessenen verlangsamten Verlauf der reversiblen Inhibition im Falle von X=F (Inhibitor K777-X) durch die relativ erhöhte Reaktionsbarriere im Vergleich zur Leitstruktur erklärt werden (Abbildungen 16 und 17). Dieser Inhibitor dient zunächst als ein erfolgreich selektiertes reaktives Gerüst des neuen Inhibitors K777-X-S3 mit X=F und S3=4-Pyridyl (K777-F-Pyr), welcher mit Hilfe des Docking-Experiments (Schritt III durch die Arbeitsgruppe Prof.Dr. T. Schirmeister) deutlich verbessert werden konnte.^{[5][28]} Die Affinität des durch Docking verbesserten VS-Inhibitors mit Fluor als Substituent durch die eingeführte Seitenkette S3=4-Pyridyl (4-Pyridyl-Phenylalanyl-Homophenylalanyl-(Phenyl)- α -F-Vinylsulfon, Abbildung 8) stieg im Rhodesain von 190 nM zu 32 nM (Schritt IV, experimenteller Teil).^[28] Gleichzeitig konnte durch die QM/MM-Berechnungen in Schritt IV gezeigt werden, dass die Reaktion der reaktiven Kopfgruppe im neuen Inhibitor immer noch eine kovalent-reversible Hemmung von Rhodesain darstellt, auch wenn die Erkennungseinheit geändert wurde. Hierfür kann man die beiden Reaktionsprofile der NP-Berechnungen, die in Abbildungen 17 und 18 gezeigt sind, vergleichen. Die beiden fluorierten VS-Inhibitoren weisen eine Ähnlichkeit bezüglich der Barrierenhöhe und der Reaktionsenergie auf. Der fluorierte Vinylsulfon-Inhibitor K777-F wurde somit als ein neuer kovalent-reversibler Vinylsulfon-Inhibitor der Cysteinprotease Rhodesain erfolgreich eingefügt.^[5]

Die detaillierte Beschreibung der hier vorliegenden Arbeit gliedert sich wie folgt: Nach einer Einführung in den Themenkomplex zur Entwicklung maßgeschneiderter kovalent-reversibler Inhibitoren in Kapitel 1 folgen die grundlegenden Inhalte über die Struktur der untersuchten biomolekularen Systeme GM II und Rhodesain im Kapitel 2. Kapitel 2 versucht einen Überblick über den aktuellen Kenntnisstand der Inhibitionsentwicklung für die Enzyme GM II und Rhodesain zu geben und präsentiert die eigenen Ziele der Arbeit. Die Inhibitionsmechanismen dieser Biomoleküle durch ihre niedermolekularen Inhibitoren wurden mit Hilfe vielfältiger theoretischer Methoden untersucht. Die mathematischen Grundlagen der verwendeten Methoden sind im Kapitel 3 grundlegend dargestellt. Eine Sektion am Ende dieses Kapitels beschreibt die verwendeten Programmpakete innerhalb dieser Arbeit. In den Kapiteln 4 und 5 werden die Ergebnisse zur Untersuchung der Systeme GM II und Rhodesain dargestellt und diskutiert. Für ein konsistentes Vorgehen wurde für alle Berechnungen das in-house entwickelte Protokoll^[5] zum rationalen Design verwendet. Die jeweiligen QM/MM Berechnungen sind einschließlich der Informationen zur Präparation der Systeme jeweils ausführlich dargestellt. Im Kapitel 6 werden die Zusatzinformationen der Berechnungen und die verwendeten Skripte (und Programme) als Appendix dargelegt.

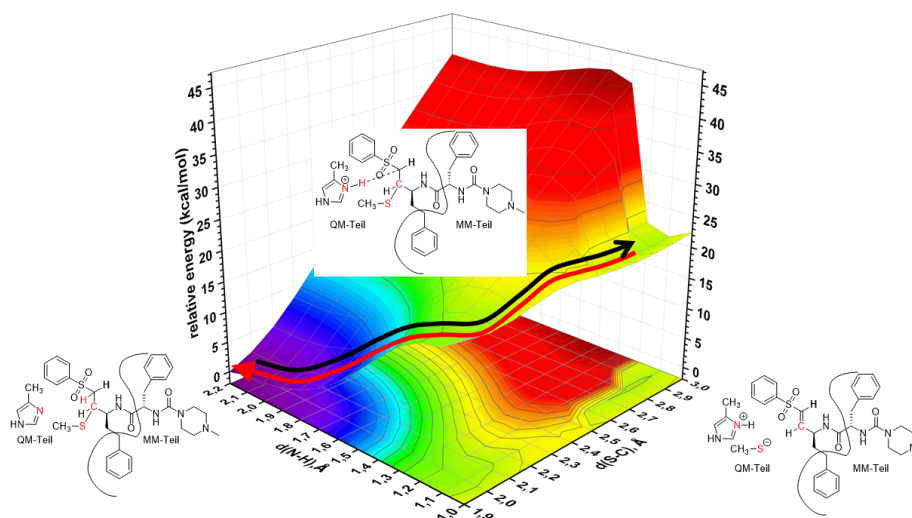


Abbildung 12: Potentialfläche (PES) der Inhibitionsreaktion von K11777 (K777, $X=H$). QM-Berechnungen wurden mit $RI^{[33][34][35]}BLYP^{[36][37]}/def-TZVP^{[38][39]}$ durchgeführt. Der rote Pfeil: Richtung der Additionsreaktion. Der schwarze Pfeil: Richtung der Berechnung.

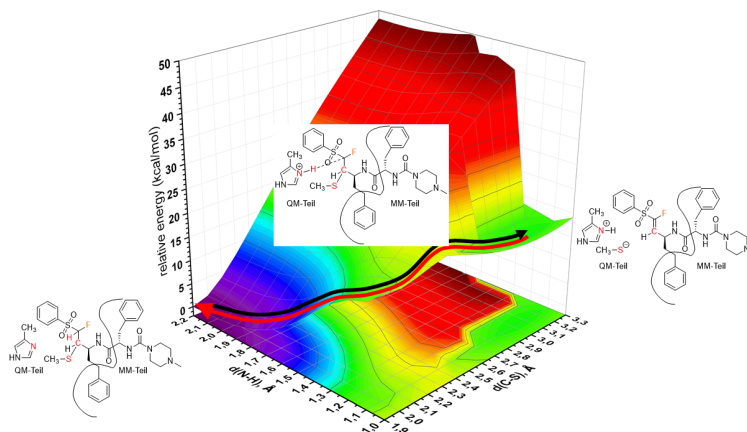


Abbildung 13: PES für den Additionsreaktionspfad des Inhibitors K777-F (K777-X mit $X=F$). QM-Berechnungen wurden mit $RI^{[33][34][35]}BLYP^{[36][37]}/def-TZVP^{[38][39]}$. Der rote Pfeil: Richtung der Additionsreaktion. Der schwarze Pfeil: Richtung der Berechnung.

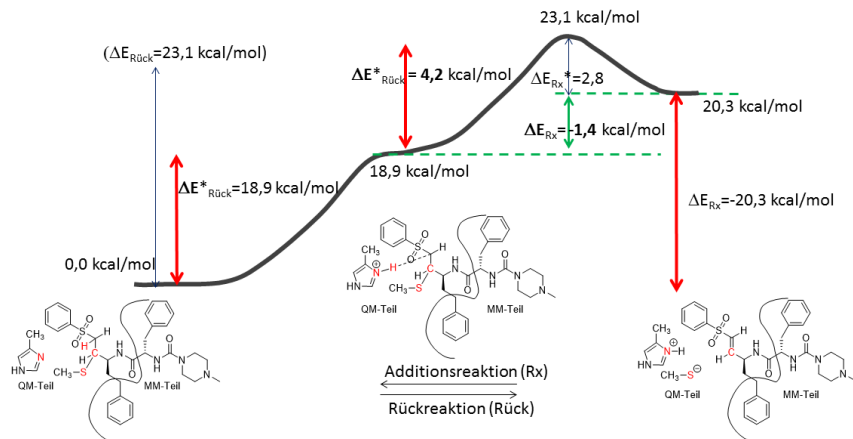


Abbildung 14: Schematische Darstellung der PES: ein Schnitt durch die PES entlang des Minimumenergiepfades (MEP) der Inhibitionsreaktion von K11777 (K777-X, X=H).

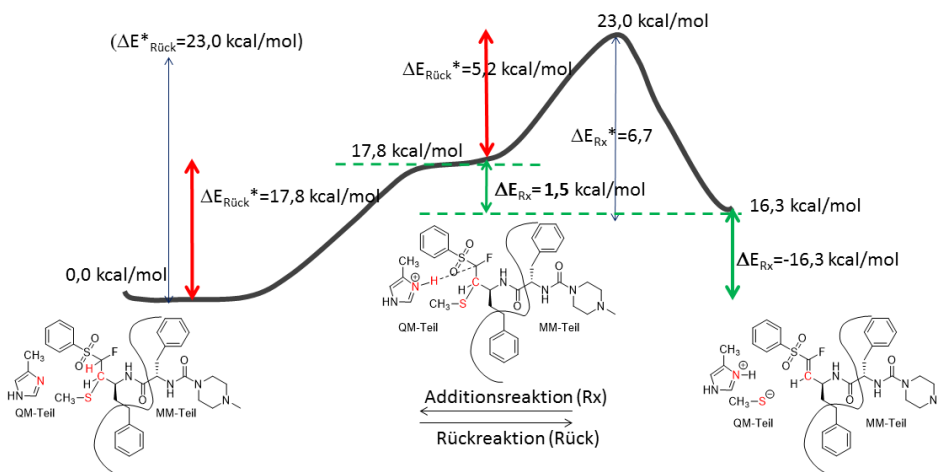


Abbildung 15: Schematische Darstellung der PES: ein Schnitt durch die Fläche entlang des Minimumenergiepfades (MEP) der Inhibitionsreaktion von Inhibitor K777-F (K777-X, X=F).

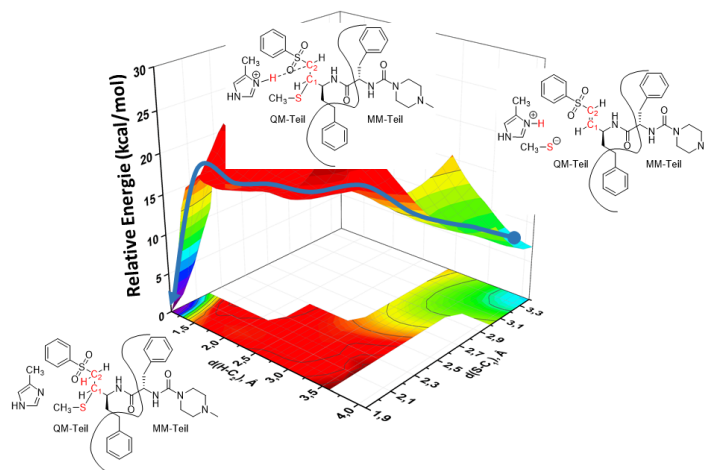


Abbildung 16: PES der Additionsreaktion des Inhibitors K11777 (K777-X mit X=H). Blauer Pfeil: Richtung der Berechnung und gleichzeitig Richtung des Reaktionsablaufs.

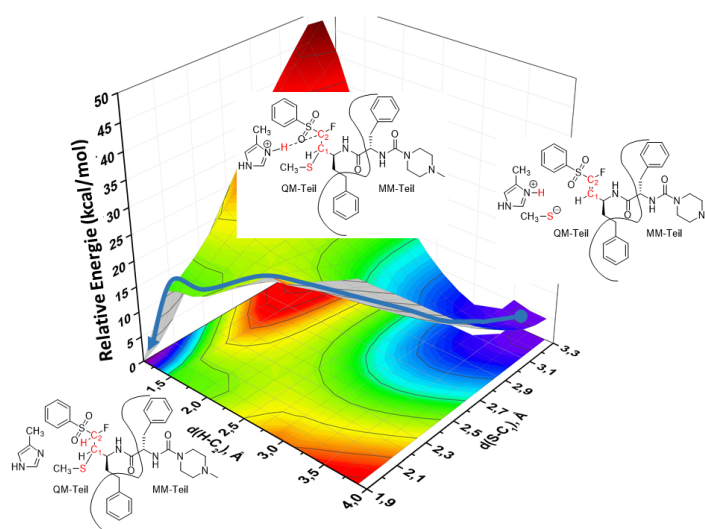


Abbildung 17: PES der Additionsreaktion des Inhibitors K777-F. Blauer Pfeil: Richtung der Berechnung und gleichzeitig Richtung des Reaktionsablaufs.

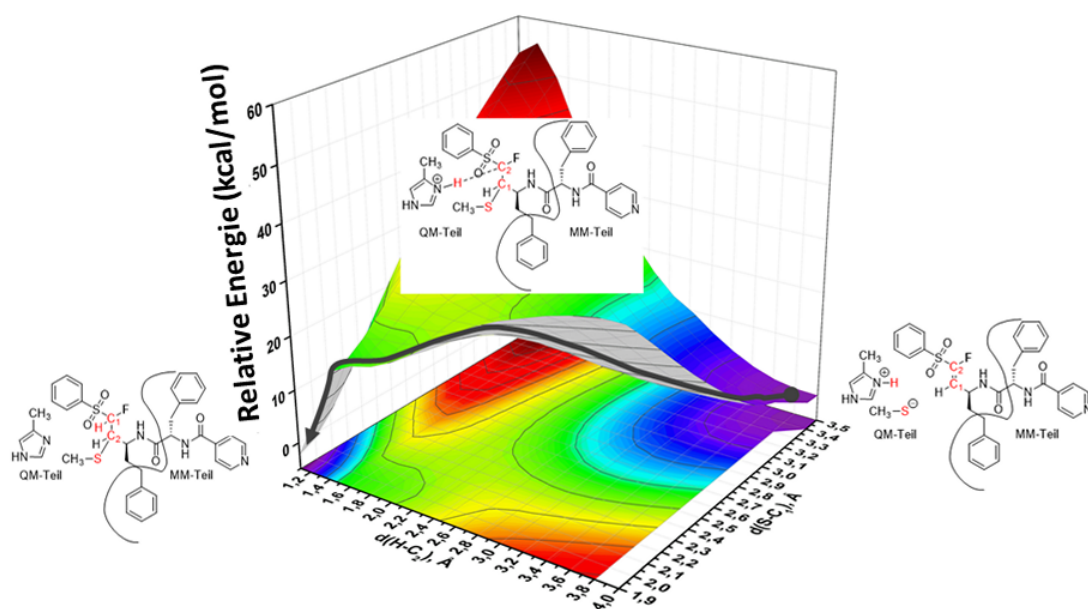
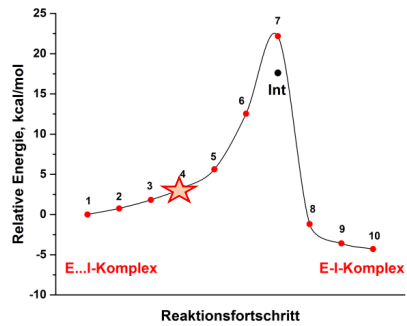
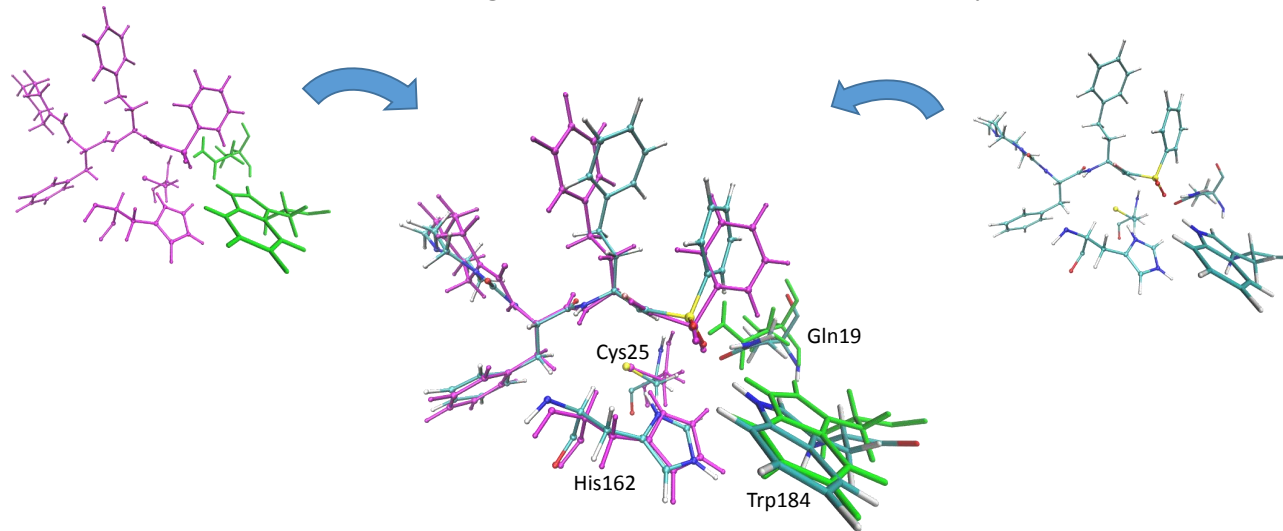


Abbildung 18: PES der Additionsreaktion des Inhibitors K777-X-S3 mit $X=\text{F}$ und $\text{S3}=4\text{-Pyridyl}$. Schwarzer Pfeil: Richtung der Berechnung und Richtung des Reaktionsablaufs.

Geometrie Nr. 4 der NP-Berechnung

E...I-Komplex der XP-Berechnung



Align

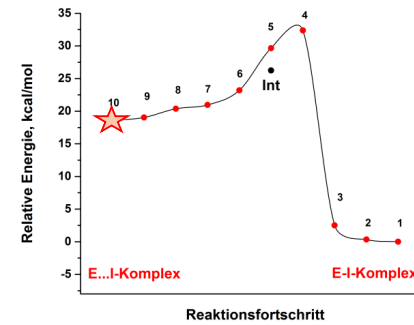


Abbildung 19: Geometrien der nicht-kovalenten E...I-Komplexe für Inhibitor K777-X mit X=F berechnet mit den Ansätzen NP (unten links) und XP (unten rechts).

The development of tailored protein ligands is an integral part of different scientific disciplines, such as drug development. The present thesis is concerned with the reversible inhibition in the form of covalently bound enzyme-inhibitor complexes of the human Golgi α -mannosidase II (GM II) and the cysteine protease rhodesain. Both enzymes are promising targets in the fight against two very different diseases. On the one hand the Golgi α -mannosidase in the treatment of tumor progression^{[1][2]} and on the other hand the cysteine protease rhodesain in the treatment of African sleeping sickness^{[3][4]}. The work on the two enzymes is divided into two sub-projects.

The development of tailor-made covalent-reversible inhibitors for the mentioned enzymes was carried out within the framework of an in-house developed protocol for the rational design of covalent inhibitors (diagramm 20).^{[5][6][7]}

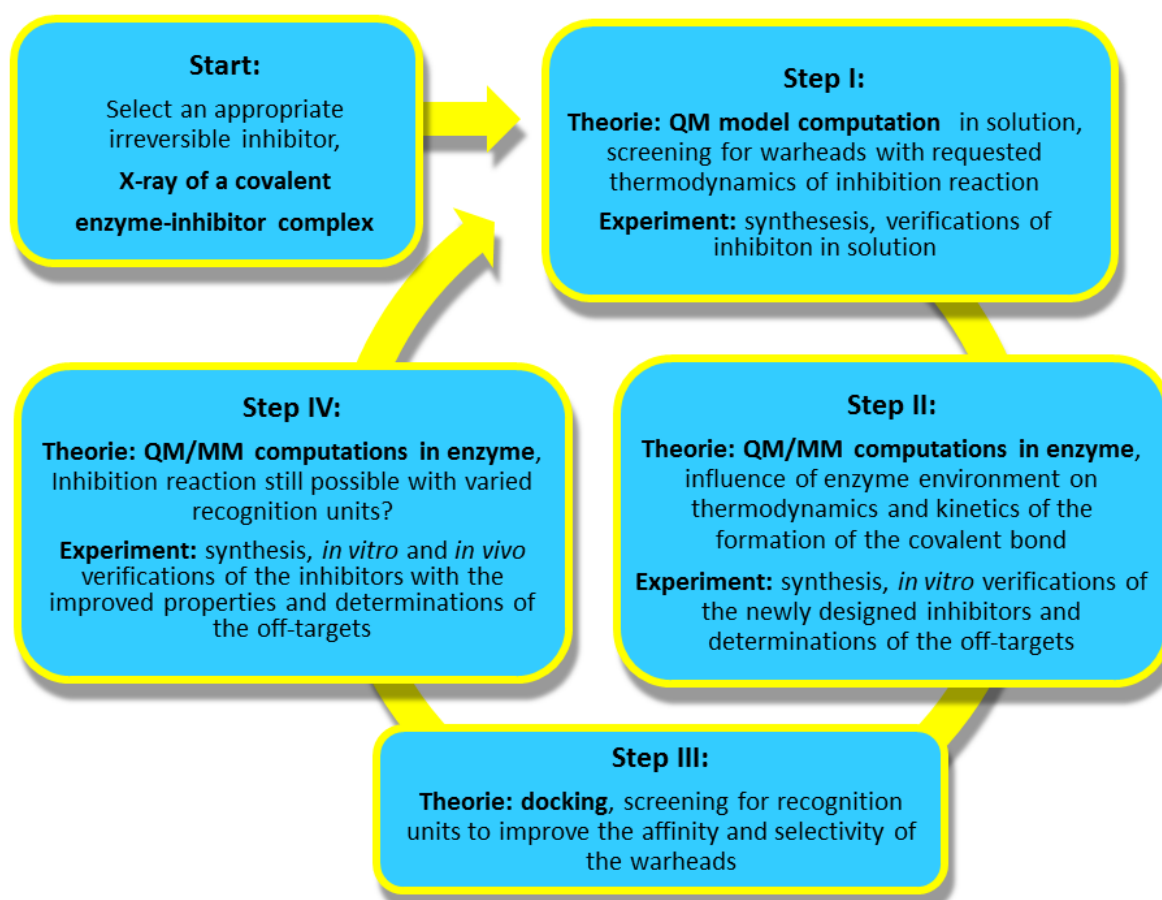


Figure 20: The in-house developed protocol for the rational design of covalent inhibitors^[5]. Essentially, the four steps of a cycle between experimental and theoretical investigation are described. The detailed description can be found in the text.

This protocol is based on a mutually supportive collaboration between theory and experiment. The present work deals with the theoretical investigations using the quantum mechanical (QM^[8]) as well as the combined quantum mechanical/molecular mechanical (QM/MM^{[9][10][11]}) methods for the mentioned enzymes. In a first step of the protocol, screening procedures are applied. In a screening, lead structures are evaluated, initially in solution (Step I in figure 20), for further investigation in the enzyme (Step II in figure 20). Thus, the inhibitors for which the experimental measurement or theoretical docking data are available can be considered as a lead structure. By screening using the quantum mechanical (QM model) method, a series of inhibitors can be designed according to a consistently changing pattern and analyzed for binding parameters (Step I, theory in bold). These parameters are reaction energies and reaction barrier heights of an inhibition reaction. In this consideration, reaction energies are determined quantum mechanically in the Born-Oppenheimer (BO) approximation and within the framework of the concept of potential energy surfaces (hereafter PES for potential energy surface) as relative energies between the optimized geometries of the products and the reactants on a potential energy surface for the inhibition reaction. The reaction barrier heights are estimated by the relative energies between the geometries of the reactants and the intermediates or transition states. The inhibition reaction is understood as meaning a chemical reaction involving the formation of a covalent bond between the inhibitor molecule and the amino acids in the active pocket of an enzyme. For Step I, the active site amino acids are approximated by small molecules such as acetic acid and methanethiol. In this consideration, the covalently reversible inhibitors should only exhibit slightly exothermic reactions with relative energies (= ΔE_{Rx} reaction energies, which are presented in detail in figures 4.5 and 5.1 of the main part) in the range -5 to -10 kcal/mol. Meanwhile, the experimental part provides the synthesis of the new inhibitors and evidence of the covalent bond using mass spectrometric measurements (Step I, experiment in bold). The suitable candidates from the first step of the protocol, i.e. inhibitors with desired binding parameters, are analyzed by the QM/MM calculations in the enzyme (Step II, theory in bold) and by the experimental measurements on the enzyme-inhibitor complexes in assays (Step II, experiment in bold). The studies for stage II of the protocol include the calculations of reaction profiles and minimum energy reaction pathways (MEPs)^[12] for the chemical reactions of inhibitors in the target enzyme^{[6][5][13]}. Detailed descriptions of the reactant and product situations of calculated inhibition reactions in the enzyme are shown in Figure 26, as well as in the main part in Figures 4.8 and 5.9. A path of minimum potential energy connecting two minima (here reactant and product) represents a reaction profile for a chemical reaction. In the present work, this is also referred to as a minimum energy pathway (MEP)^[12]. The latter can be represented by the

Nudged Elastic Band (NEB^{[14][15]}) method and with the help of potential energy surfaces^[13]. The reversibility of the inhibitors was analysed and discussed on the basis of the calculated chemical reactions in the form of created reaction profiles. Protein-ligand docking (Step III) is used to screen variable recognition units of the new inhibitors. The results of the investigations from the third step provide information on the further development of the selected inhibitors. The final stage of the in-house protocol is reexamination of the optimized inhibitors using theory and experiment (Step IV). The theoretical investigation using QM/MM calculations verifies whether the inhibition reaction of the reactive head group after changing the recognition unit of the inhibitor can still proceed effectively and according to the same mechanism with the active site of the enzyme. Similar to Step II, the experimental investigation provides measurable results of the inhibition with regard to the binding properties and the formation of the by-products.

The investigations on the Mannosidase GM II system were carried out in cooperation with the working groups of Prof.Dr. J. Seibel^[16] and Prof.Dr. T. Schirmeister^[17]. The lead structure for the development of the covalently reversible inhibitor is the cyclic O,O-acetal inhibitor (determined by the working group of Prof.Dr. J. Seibel using docking experiments on the β -L-anhydroglucose, inhibitor 1 in figure 21).

For the first step in the protocol, the results of the theoretical study provide the suitable candidate from a total of 22 modeled inhibitors (see also table 4.3) for the reversible inhibition of mannosidase GM II by the formation of a covalent bond. These include the thermodynamic model calculations of the inhibition reaction, which provide the reaction energies (ΔE_{Rx} , figure 22) for all screening candidates. The inhibition reaction is modeled in this step as the addition reaction of an acetic acid to the inhibitor candidate molecule (figure 22).

A thermoneutral description of the reaction ($\Delta E_{Rx} = 0.2$ kcal/mol) with acetic acid results for the lead structure (= inhibitor No.1) and serves as a reference in the following. The inhibitor No.7 (the cyclic N,O-acetal inhibitor) shows a slightly exothermic reaction with -7.7 kcal/mol and thus a better driving force of the investigated reaction compared to the reference. The two inhibitors were then examined for Step II of the protocol, in which an analysis of the reaction profiles in the enzyme was performed using the QM/MM methodology. The results of the second part of the study show that the cyclic N,O-acetal inhibitor should have a significantly better affinity for the active side of the GM II compared to its lead structure. This is also reflected in the significantly higher driving force of the inhibition reaction of approx. -13 kcal/mol. This energy contribution is small enough to ensure the reversibility of the inhibition reaction. This also means that the N,O-acetal inhibitor should cause a significantly stronger inhibition compared to the reference structure. Taking into account that the reactions should only be

slightly exothermic according to calculation, the possibility of a reversible covalent inhibition is obtained. In summary, this part of the work, which was carried out by the QM- and QM/MM calculations, provides a reactive molecular scaffold with the desired properties. The experimental investigations with regard to Step II of the in-house protocol have not yet been carried out.

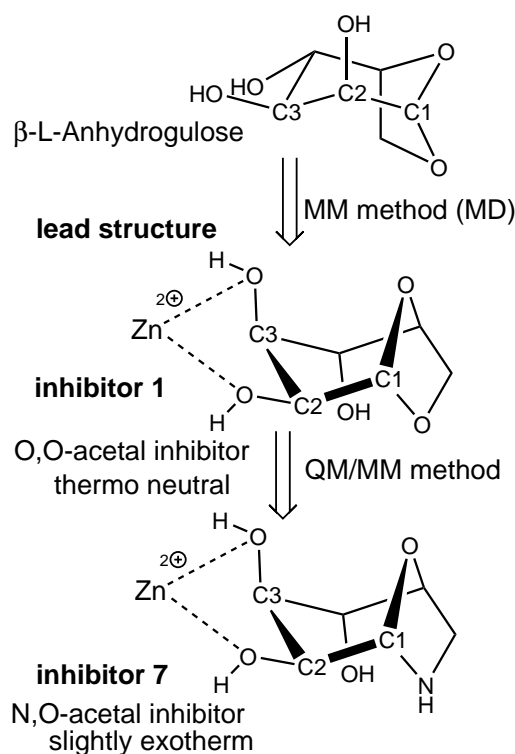


Figure 21: Schematic representation up to the development of the covalent-reversible inhibitor no. 7 (the cyclic N,O-acetal inhibitor) for the enzyme mannosidase GM II.

The theoretical investigations (MD simulations on the enzyme-inhibitor complex) also enabled the lead structure and the new inhibitor to be found in a conformation suitable for complex formation. The reversibly acting acetal inhibitors are located in the active side in an energetically higher twist-boat conformation and, with two bonds formed to the structural Zn²⁺ ion, favor the octahedral coordination in the enzyme (shown by the hydroxyl groups of the C2 and C3 carbon atoms as a 2D representation in figure 21 and as a 3D representation in figure 23). As part of this work, NEB (nudged elastic band^[15], figure 24) calculations were performed to determine minimum energy paths (hereinafter MEP for minimum energy path). This provided additional insights into the calculation of reaction mechanisms with 2- and 3-dimensional scans. Also in the description of proton transfer reactions^[18] according to Grothuss, which correspond to a reversal of the covalent bonds^[19], geometries for the individual steps are obtained here and

thus a detailed description of the process (figure 26).

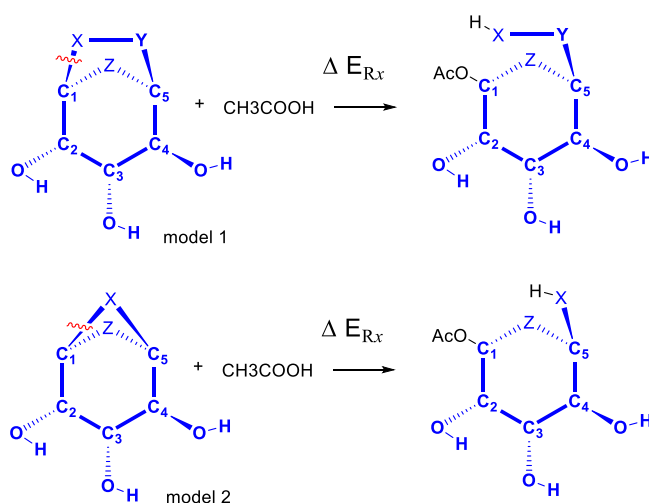


Figure 22: Schematic representation for the calculation of the reaction energies (thermodynamics) of the inhibition reaction of the enzyme mannosidase GM II investigated for the screening step by the QM calculations in aqueous environment.

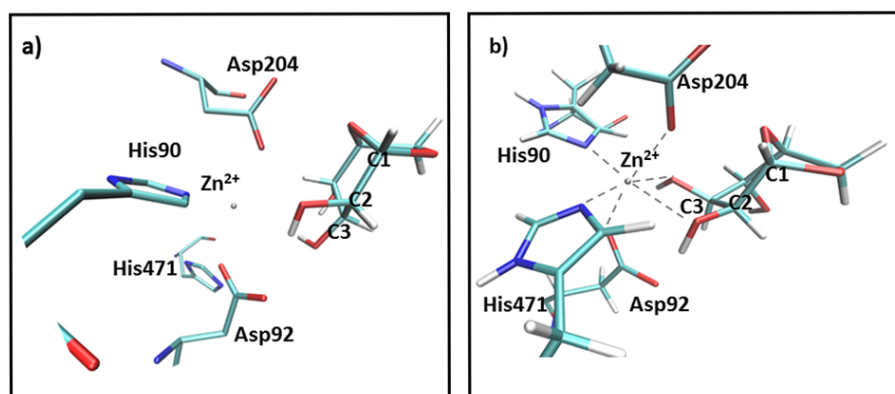


Figure 23: Comparison of the non-covalent enzyme-inhibitor complexes a) before the MD simulation (from docking): no coordination with the Zn^{2+} ion possible and b) after the MD simulation: coordination of the ligand to the Zn^{2+} ion is accessible through the hydroxy groups of C2 and C3 atoms.

The mechanism of inhibition of GM II by the lead structure involves a water-catalyzed (or water-mediated) ring-opening step in the pocket of the enzyme (figure 26). The proton transfer test calculations have shown that proton transfer across one or more water molecules does not occur spontaneously using standard PES calculations (just by varying the bond distances OD2-C1 and O6-H, figure 6.9). The calculation of the MEP by creating a 3-dimensional potential energy surface can only provide meaningful results if the proton transfer from the aspartate Asp341 to the inhibitor via two water molecules is explicitly taken into account (figure 4.26). In this case, the calculation of the PES is not standard

and requires an additional variation of the O-H bond distances of the molecules involved in the proton transfer. The details for the additional variation of the bond distances O-H in the calculation of the 3-dimensional PES have been provided by the NEB calculations. The NEB^{[14][12]} formalism turned out to be more suitable for the description of these complex reaction coordinates and was mainly used in this work for this reason. The calculation of the proton transfer during an inhibition reaction by two water molecules with the NEB method has determined the MEP, which initially could not be determined on the basis of a 3-dimensional scan. Such QM/MM calculations were carried out for the first time within the framework of the in-house protocol. This proton transfer is consistent with the Grotthuss mechanism and can be plausibly understood from a folding mechanism approach^[19] (figure 26).

With the help of the NEB^{[14][12]} method, it is possible to determine MEPs effectively and relatively fast. Both the geometries along the path and the individual relative energies are obtained (figure 24). In order to verify the found transition states (in the following TS for transition state), the individual structures were further investigated with the help of normal mode analysis and could be confirmed (figures 4.24 und 4.25).

The MEP calculations for inhibitor No.1 allow the establishment of a protocol for the calculation a reaction pathway over several molecules, which is subsequently applied to calculate the MEP for inhibitor No.7. In its simple form, the protocol involves determining the „two-end“ components of a chemical reaction - geometries of reactant and product. If this concerns a reaction that takes place over several molecules, e.g. water molecules or their network, the task becomes more complex. In this case, a calculation using the NEB module is much more productive than characterization using the 3-dimensional PES. The advantage lies in the collective description of the reaction coordinates, so the decisive reaction coordinates and variables for carrying out scans do not have to be determined individually. Nevertheless, complex reaction coordinates can also lead to convergence problems or lengthy optimisation cycles. In this work, the CI-NEB version^{[20][15][21]} of the NEB method^[14] was used (CI for *climbing image*^[15]). The possible transition state (TS) was optimised using the dimer method^{[22][23][24][21]} starting from the projected CI geometry (mentioned in the following as CI^[15]-NEB^[14]-Dimer^[24] method).

As a further result, the MEP calculations performed provide insights into the catalytic properties of the water molecules for the proton transfer mechanism according to Grotthuss. The data show that the barrier becomes lowest when two water molecules are involved in the proton transfer (data series 6 in the 4.12 diagram). When only one or no water molecule catalyses the ring opening, the barrier increases to 12 and 17 kcal/mol (data series 2 and 3 in the 4.12 diagram).

The investigation in this part of the work also provides insights into the nucle-

ophilic substitution of the full acetals in the enzyme pocket of GM II. The calculations indicate that the full acetal inhibitors are activated by water molecules in the pocket. The formed hydrogen bonds favour the geometry of the enzyme-inhibitor complex. This promotes the ring opening reaction simultaneously with the nucleophilic attack of the aspartate residue on the C1 atom of the inhibitor (figure 4.12). In the case of the mixed acetal inhibitor, on the other hand, the driving force is already significantly increased by the introduction of the nitrogen atom. Due to the properly arranged Grotthuss water molecules, the barrier of proton transfer through the aspartate-aspartate system of the GM II (Asp341/Asp240) is secondary in this case. If one considers the vibrational motion along the imaginary modes of the transition states, these are similar in both E-I complexes (cf. figures 25 and 4.25). Here, a synergistic movement of the bond distances OD2-C1-O6 (inhibitor No. **1**) and OD2-C1-N (inhibitor No. **7**), respectively, is observed. The mechanism of nucleophilic substitution that takes place during the inhibition reaction of GM II by the inhibitors studied can thus be classified according to the IUPAC nomenclature by D_NA_N ^[25].

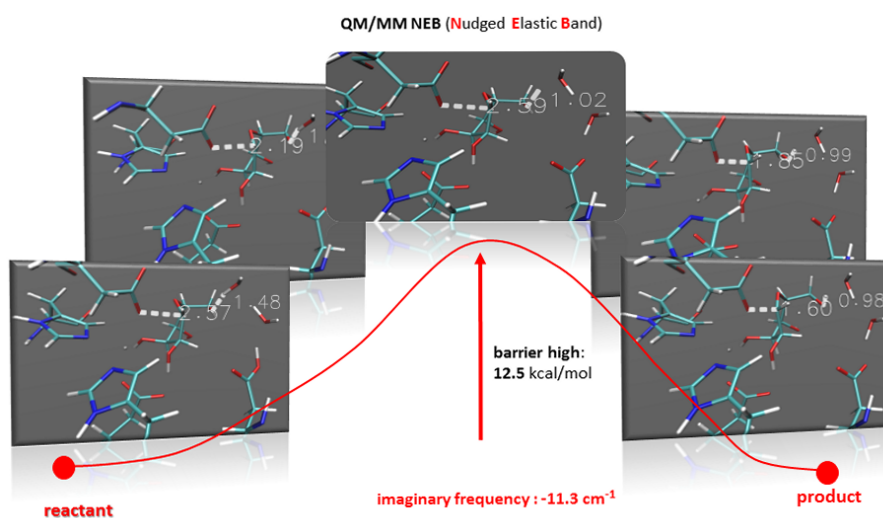


Figure 24: Schematic representation of the method for determining the barrier height using the example of inhibition of GM II by inhibitor no. **1** (β -L-anhydroglucose). Through the calculated geometries of the reactant and the product, the MEP of the reaction is determined using CI-NEB optimization^{[20][15][21]}. The transition state (TS) is optimized using the dimer method^{[22][23][24][21]}. A frequency calculation is used to prove the correctness of the transition state found in this way. If an imaginary frequency is obtained here for the first mode, this confirms the TS.

Figure 25: Normal vibration mode (see animation in pdf format) of the transition state of the enzyme-inhibitor complex GM II-inhibitor No. **7** with the imaginary frequency of $-100,76\text{ cm}^{-1}$ calculated with the CI-NEB dimer methodology within the QM/MM formalism. The images of the animation were shown using the Molden package^[26].

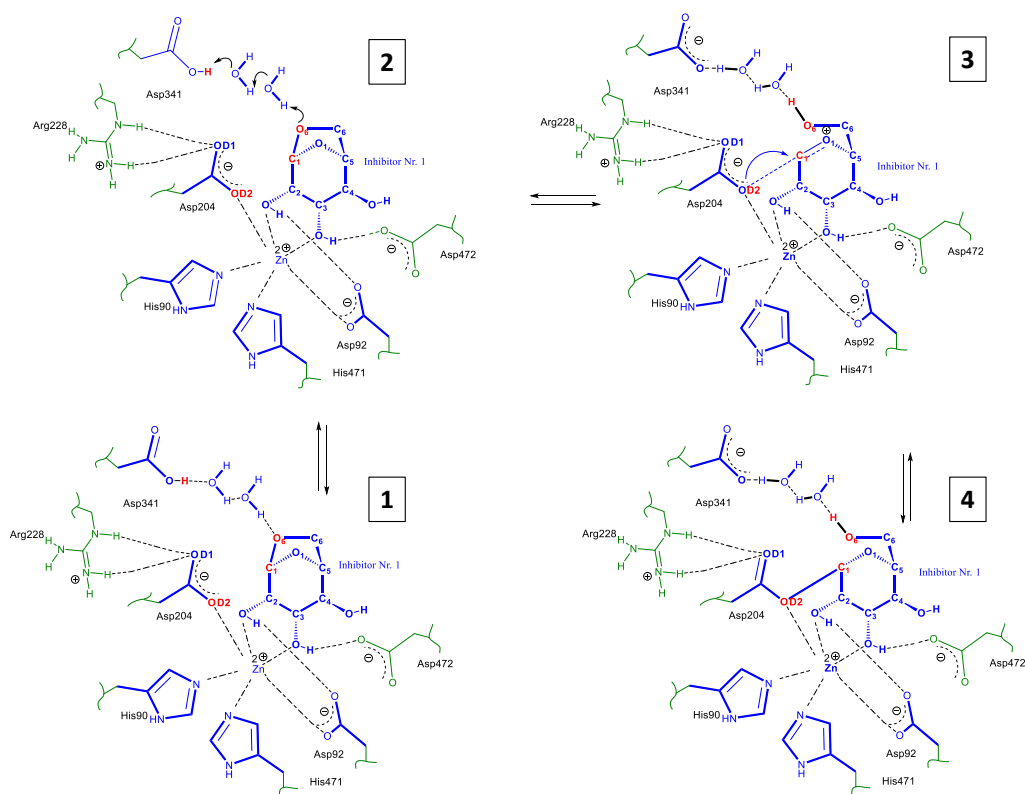


Figure 26: Schematic representation of the reaction mechanism D_NA_N ^[25] for the inhibition reaction of mannosidase GM II with inhibitor No. **1**. Two water molecules (a network of hydrogen bonds) initiate the proton transfer. 1: the non-covalent enzyme-inhibitor complex. 2: Path of proton transfer. 3: Transitional state with the OCI character. 4: Representation of the covalent enzyme-inhibitor complex. The colour coding shows in blue the part that was described as the QM part in the calculations and the areas shown in green were described with MM. The atoms shown in red imply the essential changes of the reaction coordinates on a reaction profile.

The development of the covalent-reversible inhibitors for the enzyme rhodesain was carried out in cooperation with the working group Prof.Dr. T. Schirmeister^[17]. The lead structure for the development of the new covalent-reversible vinyl-sulfone inhibitor 4-pyridyl-phenylalanyl-homophenylalanyl- α -fluoro-phenylvinyl sulfone^[5] in this project is the covalent-irreversible binding inhibitor K777^[27], for which crystallographic data (here as K11777^[4]) are known (figure 27).

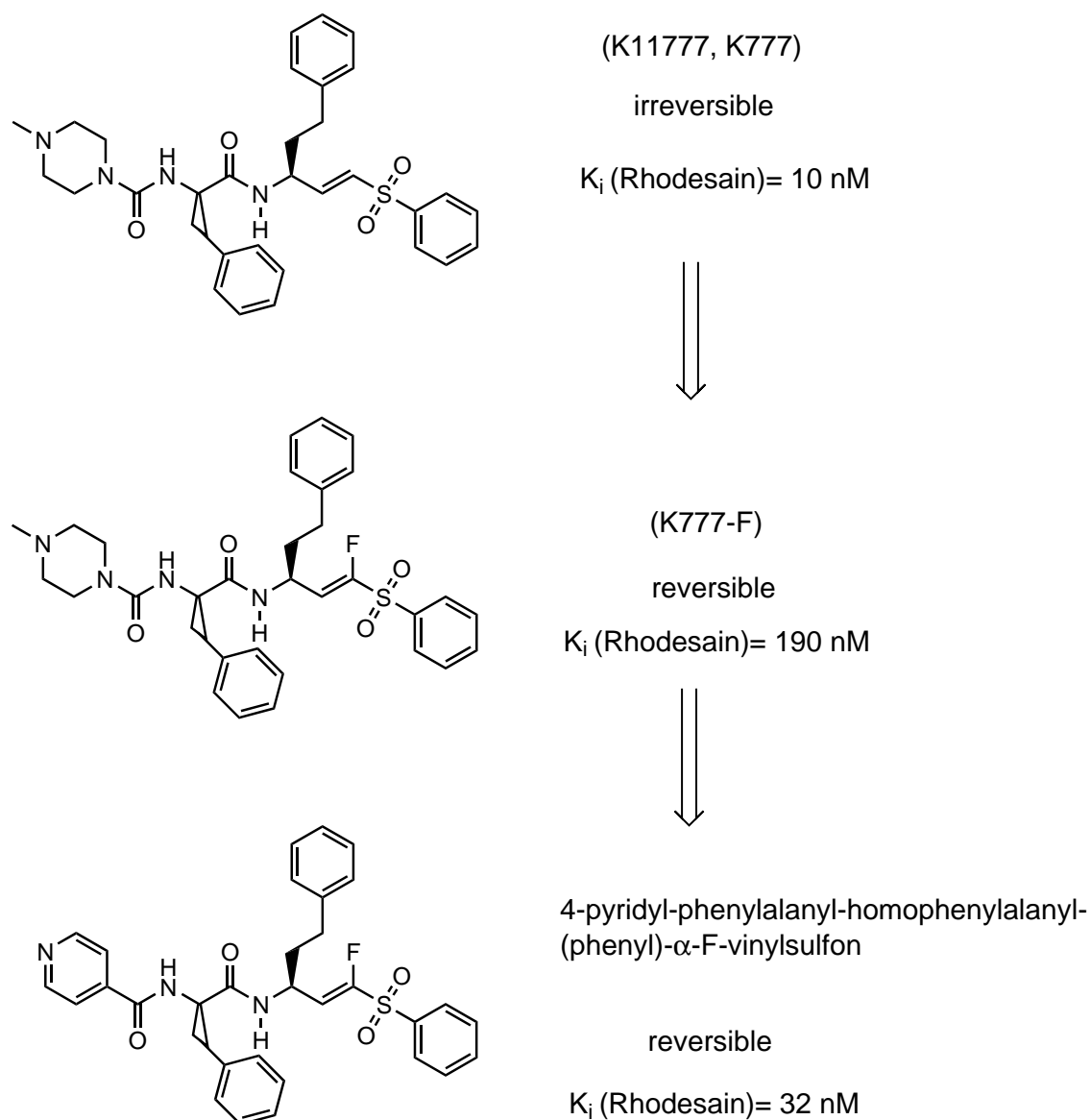


Figure 27: Schematic representation for the development of the covalent-reversible inhibitor for the enzyme rhodesain.

In the protocol (figure 20), a series of inhibitors were investigated in which a α -H atom of the vinyl sulfone unit (hereafter VS for vinyl sulfone) was substituted by various groups X (figure 28). They are abbreviated as K777-X in the following.

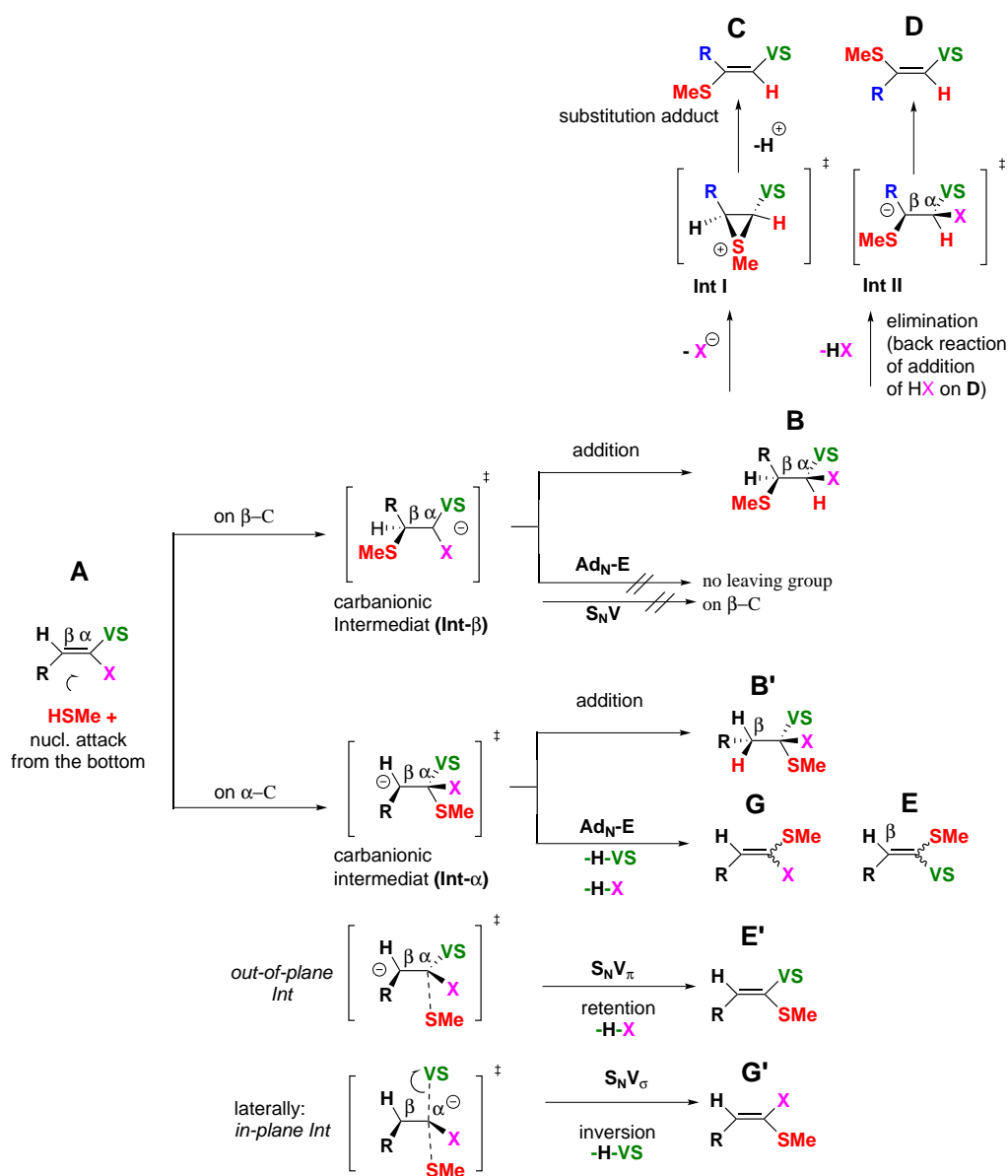


Figure 28: Mechanistic routes of the VS warhead of the inhibitor K11777 with a variable X substituent through the nucleophilic attack of methylthiol. In the calculations, the methyl group was used for R.

For the initially proposed cyano substituent (CN) in a VS inhibitor (figure 29), calculations in a polar solvent revealed a relatively low reaction energy, i.e. a reversible reaction was predicted. This was confirmed experimentally. However, the theoretical and experimental results of Step II (reaction with enzyme, figure 20) contradict each other. While weak reversible inhibition was found experimentally, the calculations did not predict any inhibition. In fact, it was subsequently shown that the inhibition found experimentally is non-competitive, i.e. does not take place in the active pocket. Within the framework of the protocol, however, only the competitively interacting inhibitors are evaluated. At this point, the data on the reversibility of the inhibition (reaction in the active site) obtained using theoretical methods cannot be compared with the results from the experimental investigations (reaction outside the active site).^[28] The switch from CN to halogens finally led to the development of a new range of VS-based inhibitors. The calculations of reaction energies in solution and in the enzyme have predicted reversible inhibition for these inhibitors. However, a simple addition reaction is found at the double bond of the vinyl sulfone group. For X=CN, a S_N2 reaction was assumed. For X=Br, it was found that an HBr molecule splits off after the addition, so that the inhibition is irreversible in total (figure 30). Since the substitution reaction is an irreversible process and the release of hydrogen bromide could be confirmed by the experimental investigations, fluorine seems to be a suitable substituent (X=F).

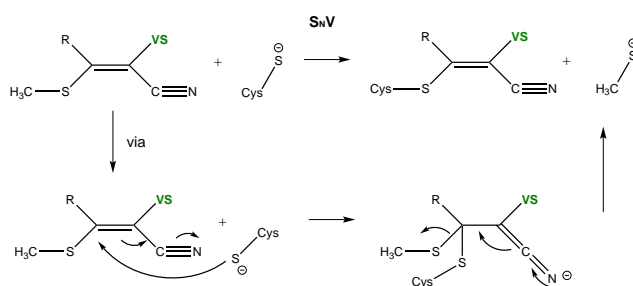


Figure 29: Reaction scheme of the reversible VS inhibitor with the cyano substituent.

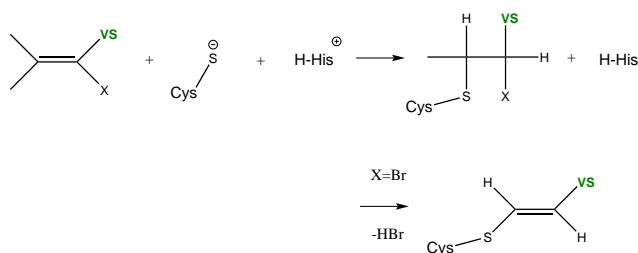


Figure 30: Reaction scheme of the irreversible VS inhibitor with the bromide substituent.

Here, a clearly better inhibition could also be measured experimentally. Therefore, the calculations in the enzyme were carried out and analysed for systems with the inhibitors K777-X with X=F and X=H (K777-F and K777-H inhibitor). In the present work, an attempt was made to demonstrate the reversibility of the K777-F inhibitor against the irreversibility of the K777-H inhibitor through the quantum mechanical calculations within the protocol.

The QM/MM calculations are divided into two areas. First, the reaction profile (also reaction path) of the addition reaction of the K777-X inhibitor to the active pocket of Rhodospirillum rubrum was calculated starting from the existing crystal structure (PDB-file). In the following, this partial result is referred to as XP calculation (hereafter XP for X-ray path). The detailed description of the reaction coordinates to start the QM/MM calculation is schematically shown in figure 5.9. All four PES (X=H, F, Br and Cl) have in principle the same shape. However, there are differences in the calculated reaction energies of the addition reaction (-20, -16, -10 and -11 kcal/mol). The reaction energies of the substituents bromine and chlorine correspond to the range for reversible reactions (approx. -10 kcal/mol), whereby fluorine with -16 kcal/mol represents a borderline case.^[5] But in spite of that, the contours of the two PES (X=H vs. X=F) are very similar: in both cases, no minimum is found for the anionic intermediate (Figures 31 and 32). In the potential hyperplane for X=F, the barrier of the back reaction between the intermediate and the non-covalent complex increases to about 5 kcal/mol, and the back reaction is slightly exothermic compared to the X=H with about 1.5 kcal/mol. The altered relationship between the height of the reaction barrier and the amount of reaction energy (the transition from endothermic to the exothermic reaction) on this section of the PES could contribute to the overall reversibility of the reaction. The reversibility of the inhibitor with the substituent fluorine can be explained at this step of the investigation by lowering the reaction energy of the addition reaction to about 16 kcal/mol, because irreversible reactions were previously associated with much higher reaction energies.^{[29][13][5]}

The obtained non-covalent enzyme-inhibitor complexes of the XP calculations were further used in a second partial result by calculating the reaction path of the addition reaction of the K777-X inhibitor from the non-covalent enzyme-inhibitor complex towards the covalent enzyme-inhibitor complex. In the following, this partial result is referred to as NP calculation (NP for non-covalent pathway). The representation of the reaction coordinates at the start of the QM/MM calculation is shown in Figure 5.10.

Calculation of the reaction profiles of the addition reaction of the VS inhibitor for X=H and X=F at the *a* carbon atom of the VS head group gave consistent results in terms of the reaction energies (figures 31 - 36). Similar to the XP calculations, the tendency of lowering the reaction energy from -7 kcal/mol (X=H) to -4.3 (X=F)

and -0.9 kcal/mol (X=Br) was also observed. The potential hypersurfaces (PESs) are shown in 35, 36 and 5.28. The thermodynamics of the addition reaction was affected by changing the substituent X from H to F in the VS head group of the K777-X inhibitor by obtaining the lower energy difference between the reactants and the products. For both parts of the work (XP and NP calculations), this implied a change from an irreversible to a reversible course in the description of the reaction profiles.

Considering that the inhibitor K11777 is an irreversible inhibitor by the addition reaction, the calculated reaction energy of -7 kcal/mol in this approach is much lower than expected.^{[5][13]} The previous QM and QM/MM calculations (see Figures 5.2 and 31) predicted much higher reaction energies for the irreversible inhibitors. At this point, a discrepancy occurs between the results of the NP calculations and the QM calculations performed on the VS inhibitors in solution. Also in the halogen series of the VS inhibitors K777-X, the reaction energy of the addition energy is clearly underestimated when the QM/MM calculations are carried out according to the NP approach. The almost thermoneutral addition reaction of the bromine-substituted inhibitor K777-Br and the too low reaction energy of the irreversible inhibitor (K11777) suggest that the correct representation of reaction energies cannot be achieved by the NP approach.

The results of the second part of the paper (NP calculations) provide not only the consistently lower reaction energies (thermodynamics) but also the higher reaction barriers of the addition reaction compared to the results of the XP calculations. The changes in the reaction barriers in the NP approach show additional discrepancies when calculated and compared using the PES scan and CI-NEB dimer methodologies, respectively. While the barrier of the irreversible inhibitor K11777 is approx. 11 kcal/mol with the NEB approach and is only 4 kcal/mol higher by the PES scan, the situation is reversed for the transition to fluorine as substituent: by the NEB calculation, the barrier is approx. 18 kcal/mol and by the PES scan, the barrier is 4 kcal/mol lower.

To examine the results of the NP calculations, these QM/MM calculations were carried out repeatedly. In the two newly performed calculations for the inhibitors K777-X with X=H and X=F, only very small deviations were found, which are smaller than the errors of the calculation. The starting structures for the calculation of the MEP (QM/MM system, see details) came from the MD simulation performed again on the geometry of the non-covalent enzyme-inhibitor complex, which resulted in the XP calculation. The total duration of the MD simulation was chosen to be 9 ns, which provided a total of 900 start structures along the simulation. The calculation gave the reaction energy of -8.4 kcal/mol (-7.0 kcal/mol as the first result) and the relative energy of the **Int** complex of 13.2 kcal/mol. Thus, the barrier of the back reaction to release the inhibitor K11777 (X=H) in

the form of a non-covalent enzyme-inhibitor complex is a value of 21.6 kcal/mol. In an analogous procedure, the evaluation of the NP calculation for the inhibitor K777-X with X=F was carried out. The reaction energies in the two calculations differ in a marginal decrease to the values of -2.9 kcal/mol and -3.3 kcal/mol (-4.3 kcal/mol as the first result). Both calculations also provide the relatively small increases in the reaction barrier to the values of 19.8 kcal/mol and 20.9 kcal/mol.

For the inhibitors K777-X with X=H and X=F, the barriers found correspond to a distorted conformation of the non-covalent enzyme-inhibitor complex, which can be described as a bioactive conformation². The anionic transition state **Int***, often referred to in the literature as an anionic intermediate^{[31][32]} of the addition reaction, was identified only for the inhibitor with the bromine substituent (K777-X with X=Br). Since the transition state (**Int*** with the relative energy of 11.1 kcal/mol) is only 1.5 kcal/mol above the bioactive conformation (**Int** with the relative energy of 12.6 kcal/mol) and the NEB reaction pathways alone overestimate the barriers, the anionic transition states of the addition reaction of the inhibitors with X=H and X=F have an estimated relative energy with comparable deviations of ca. 2 kcal/mol to the identified **Int** geometries. The calculations carried out showed that the substituents X=H and X=F can, however, stabilise the anionic geometries of the non-covalent enzyme-inhibitor complexes poorly to sufficiently compared to the bromide. In addition, the estimated energy difference between the **Int*** and **Int** geometries is below the possible error limit of the calculations (about 3-4 kcal/mol). For this reason, the optimisation towards the metastable anionic geometries **Int*** using the CI-NEB dimer methodology failed in the case of the VS inhibitors K777-X with X=H and X=F.

The direct comparison of the geometrical parameters of the non-covalent enzyme-inhibitor complexes from the XP calculations with those from the NP calculations suggests that the geometries of the enzyme-inhibitor complexes of the XP calculation represent only the local minima with the distorted geometry of the inhibitor on the PES and the overall information about the barriers of the reaction should be complemented by the results from the NP calculation (Figure 38).

In summary, the calculations for the reactive head groups of the substance class of halogenated vinyl sulfones K777-X (X=Br, Cl and F) predict a significantly lower exothermic addition reaction in the active site of rhodesain compared to the lead structure of the vinyl sulfone inhibitor K11777^{[4],[5]}. Furthermore, based on the QM/MM calculations, an experimentally measured slowed course of reversible inhibition in the case of X=F (inhibitor K777-X) could be explained by the relatively increased reaction barrier compared to the lead structure (Figures 35 and

²Bioactive conformations are geometries of the non-covalent enzyme inhibitor complexes from which the chemical reaction in the enzyme can take place most favorably.^[30]

36). This inhibitor initially serves as a successfully selected reactive scaffold of the new inhibitor K777-X-S3 with X=F and S3=4-Pyridyl (K777-F-Pyr), which could be significantly improved by means of the docking experiment (Step III by the working group of Prof.Dr. T. Schirmeister).^{[5][28]} The affinity of the docking-improved VS inhibitor with fluorine as substituent by the introduced side chain S3=4-pyridyl (4-pyridyl-phenylalanyl-homophenylalanyl-(phenyl)- α -F-vinylsulfone, Figure 27) increased in rhodesain from 190 nM to 32 nM (Step IV, experimental part).^[28] At the same time, the QM/MM calculations in Step IV showed that the reaction of the reactive head group in the new inhibitor still represents a covalent-reversible inhibition of rhodesain, even if the recognition unit was changed. For this, one can compare the two reaction profiles of the NP calculations shown in figures 36 and 37. The two fluorinated VS inhibitors show similarity in terms of barrier height and reaction energy. The fluorinated vinyl sulfone inhibitor K777-F was thus successfully introduced as a new covalent-reversible vinyl sulfone inhibitor of the cysteine protease rhodesain.^[5]

The detailed description of the work presented here is structured as follows: After an introduction to the complex of topics on the development of customised covalent-reversible inhibitors in chapter 1, the basic content on the structure of the investigated biomolecular systems GM II and rhodesain follows in chapter 2. Chapter 2 attempts to give an overview of the current state of knowledge of inhibition development for the enzymes GM II and rhodesain and presents the thesis' own aims. The inhibition mechanisms of these biomolecules by their small-molecule inhibitors were investigated with the help of diverse theoretical methods. The mathematical foundations of the methods used are fundamentally presented in the chapter 3. A section at the end of this chapter describes the programme packages used within this thesis. In the chapters 4 and 5 the results for the investigation of the systems GM II and Rhodesain are presented and discussed. For a consistent procedure, the in-house developed protocol^[5] for rational design was used for all calculations. The respective QM/MM calculations are presented in detail including the information on the preparation of the systems. In the chapter 6 the additional information of the calculations and the scripts (and programmes) used are presented as an appendix.

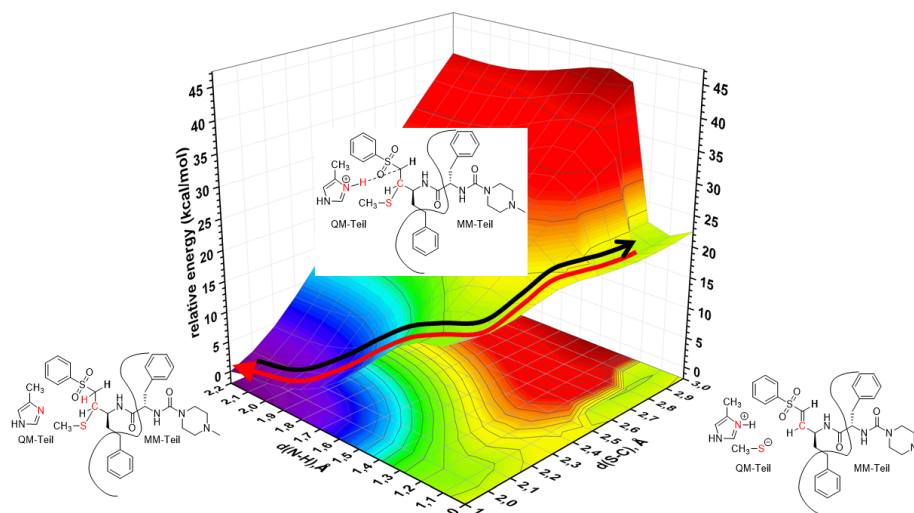


Figure 31: *Potential surface (PES) of the inhibition reaction of K11777 (K777, X=H). The black arrow: direction of the QM/MM calculation. The red arrow: direction of the inhibition reaction. QM calculations were carried out with RI^{[33][34][35]}BLYP^{[36][37]}/def-TZVP^{[38][39]}.*

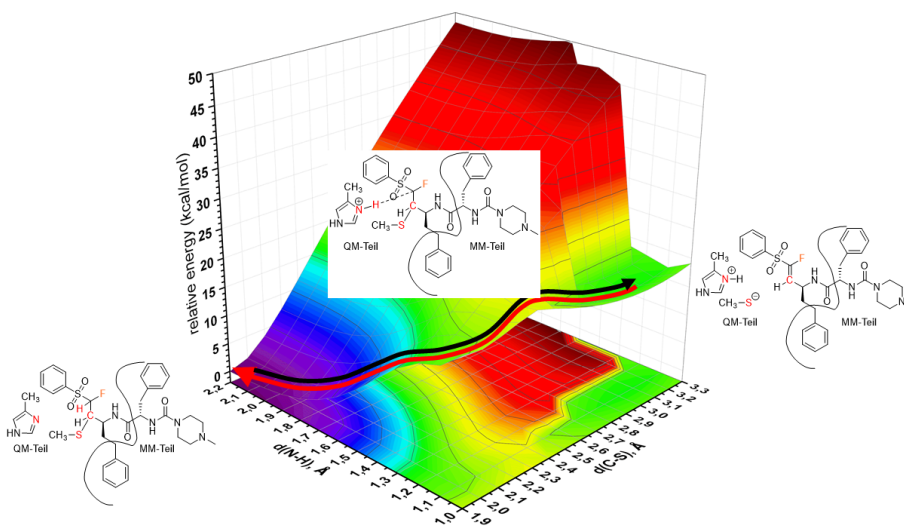


Figure 32: *PES for the addition reaction path of the inhibitor K777-F (K11777 with X=F). The black arrow: direction of the QM/MM calculation. The red arrow: direction of the inhibition reaction. QM calculations were carried out with RI^{[33][34][35]}, BLYP^{[36][40][37]}/def-TZVP^{[39][38]}.*

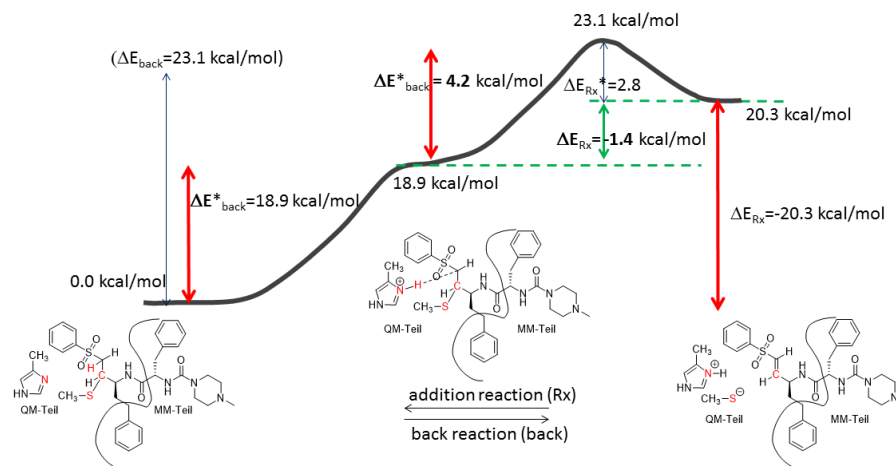


Figure 33: Schematic representation of the PES: a section through the PES along the minimum energy pathway (MEP) of the inhibition reaction of K11777 (K777, X=H).

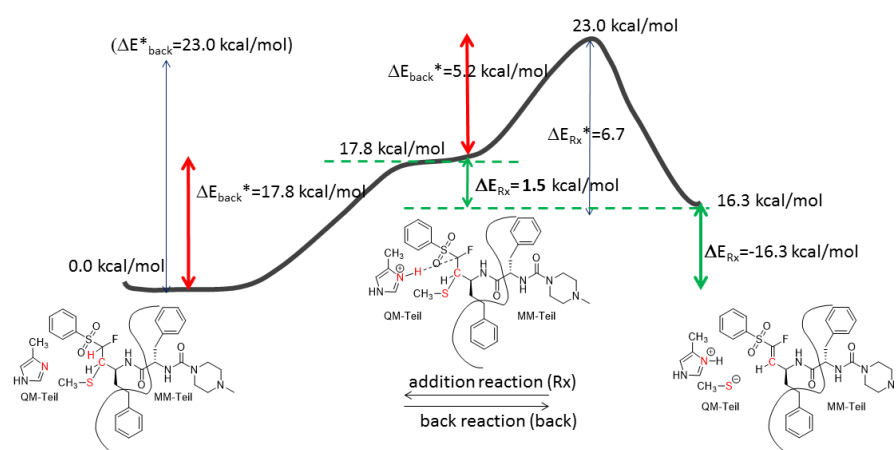


Figure 34: Schematic representation of the PES: a section through the area along the minimum energy path (MEP) of the inhibition reaction of the inhibitor K777-F (K777-X, X=F).

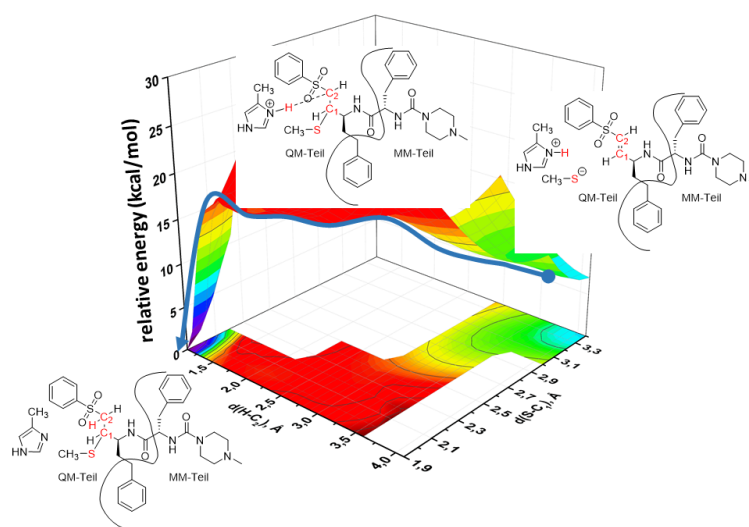


Figure 35: PES of the addition reaction of the inhibitor K11777 (K777 with X = H). The blue arrow: direction of the calculation and at the same time direction of the reaction process.

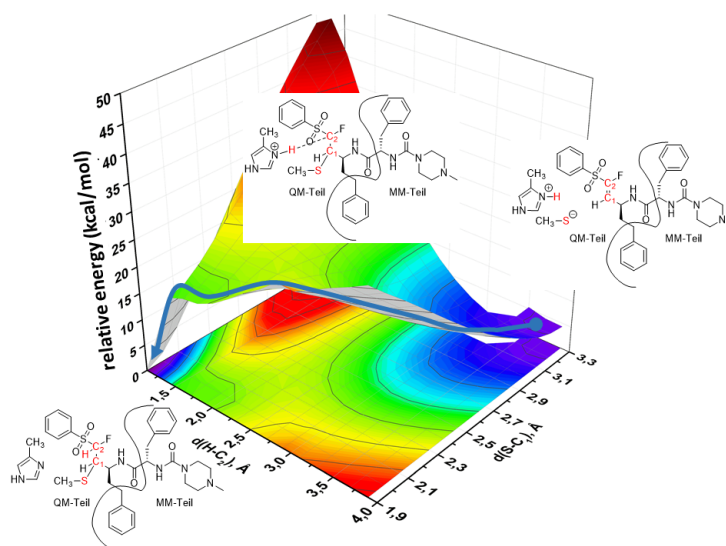


Figure 36: PES of the addition reaction of the inhibitor K777-F. The blue arrow: direction of the calculation and at the same time direction of the reaction process.

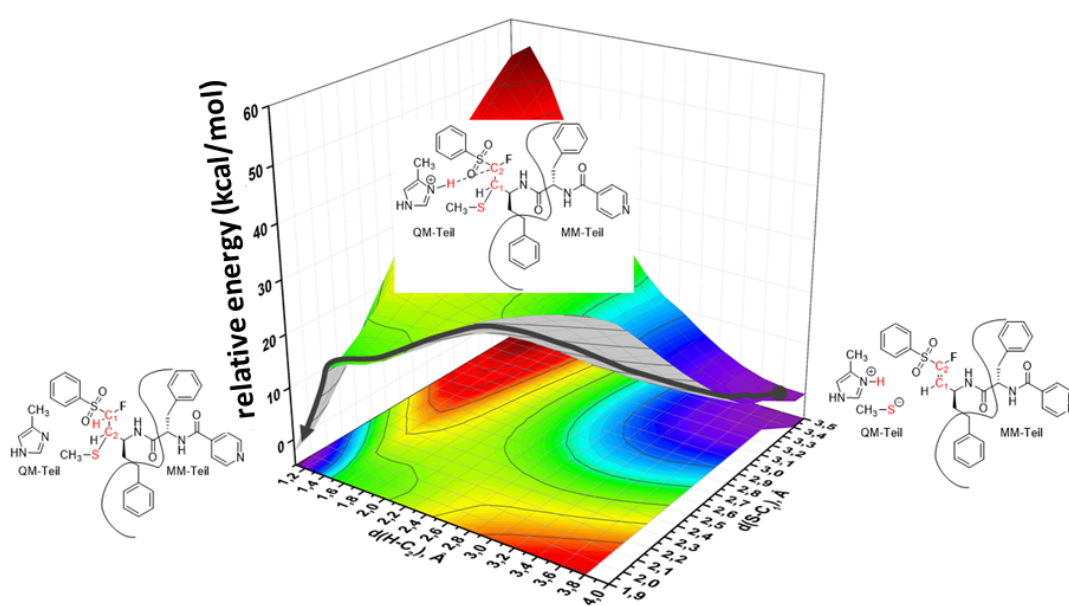


Figure 37: PES of the addition reaction of the inhibitor K777-F-S3 with X=F and S3=4-Pyridyl. The blue arrow: direction of the calculation and at the same time direction of the reaction process.

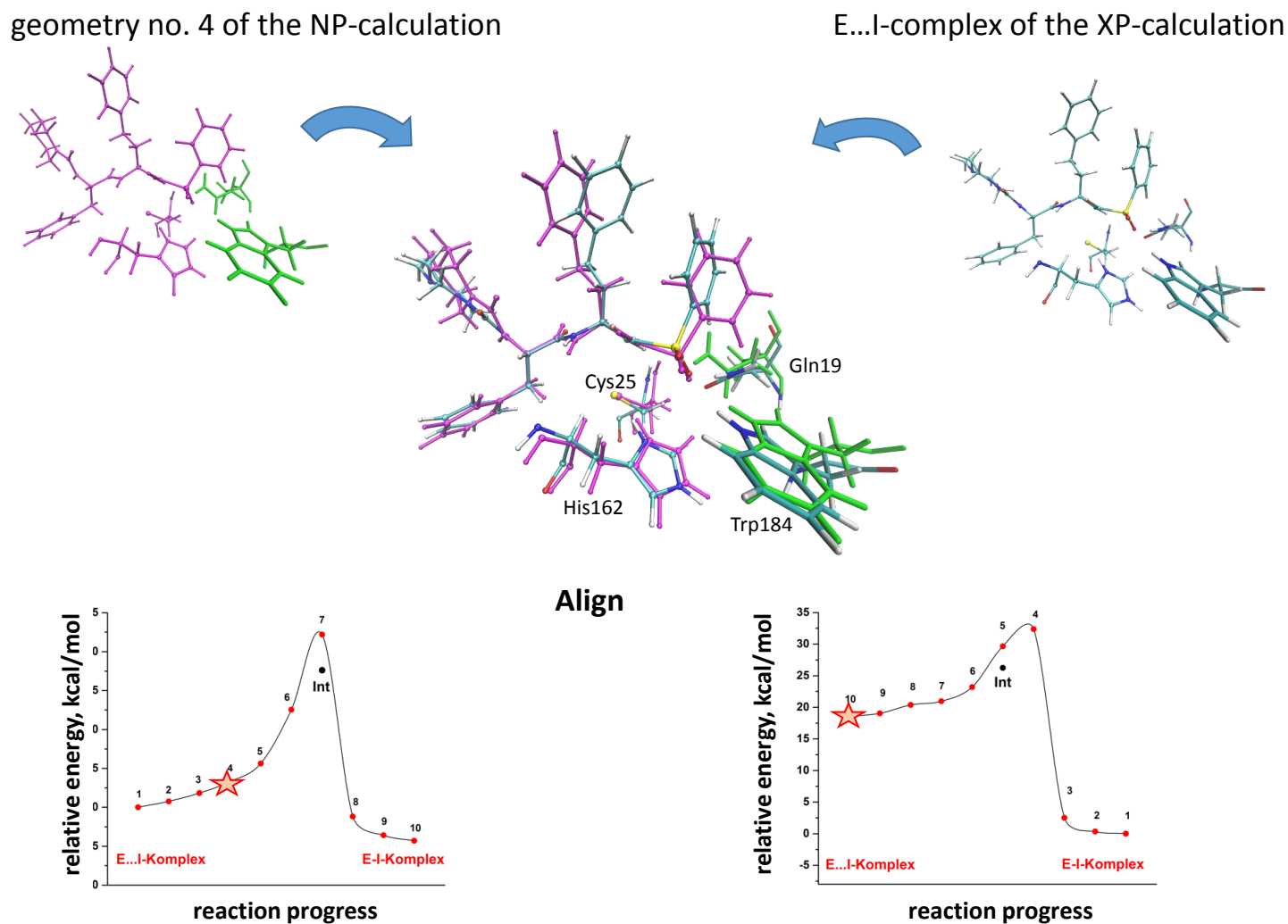


Figure 38: Geometries of the non-covalent $E \cdots I$ complexes for inhibitor K777-X with $X=F$ calculated with the approaches NP (bottom left) and XP (bottom right).

I	Einleitung und Methoden	1
1	Einführung in das Konzept kovalent-reversibler Inhibitoren und das in-house Protokoll zum rationalen Design	3
1.1	Kovalent-reversibel interagierende Inhibitoren	4
1.1.1	Pro und Kontra der kovalent interagierenden Proteinliganden	4
1.1.2	Konzept der rationalen Entwicklung kovalent und reversibel hemmender Inhibitoren	6
2	Biochemischer Hintergrund und Zielsetzung der Arbeit	13
2.1	Glykosidasen und die Golgi- α -Mannosidase II	13
2.1.1	Hydrolasen und Glykosylhydrolasen der H38-Familie	15
2.1.2	Mechanismus der katalytischen Spaltung durch die Glykosidase GM II	17
2.2	Proteasen und die Cysteinprotease Rhodesain	19
2.2.1	Cysteinproteasen der Papain-Familie	20
2.2.2	Mechanismus der Proteolyse durch Cysteinproteasen der Papain-Familie	23
2.3	Mechanistische Routen der Inhibitoren für die Enzyme GMII und Rhodesain	24
2.3.1	Kovalente reversible Inhibitoren für die Glykosylhydrolasen	24
2.3.2	Reversible Vinylsulfon-Inhibitoren für die Cysteinprotease Rhodesain	27
3	Methoden	31
3.1	Born-Oppenheimer-Näherung	31
3.2	Hartree-Fock	36
3.2.1	Fock-Gleichungen	36
3.2.2	Kanonische Form der Lösungen im Rahmen des HF-Verfahrens	38
3.3	Dichtefunktionaltheorie	43
3.3.1	Kohn-Sham-Gleichungen	43
3.3.2	Übersicht der Dichtefunktionale	48
3.4	Berücksichtigung der Lösungsmittelleffekte	53
3.5	Hybride QM/MM-Methoden	56
3.5.1	Kraftfeldverfahren	56
3.5.2	QM/MM-Ansätze	57

3.6	Verwendete Programmpakete	60
II	Ergebnisse und Diskussion	63
4	Entwicklung kovalent-reversibler Inhibitoren für die humane Golgi-α-Mannosidase	65
4.1	Ergebnisse der Vorarbeiten	65
4.2	Ergebnisse der Modellberechnungen	71
4.3	Ergebnisse der Enzymberechnungen	75
4.3.1	Ansätze und technische Details der Berechnungen	75
4.3.2	Ergebnisse und Diskussion	84
5	Entwicklung kovalent-reversibler Inhibitoren für Rhodesain	119
5.1	Ergebnisse der Modellberechnungen	119
5.1.1	Modellberechnungen der Reaktionsenergien in der wässrigen Lösung als implizite Wasserumgebung	120
5.1.2	Modellberechnungen mit expliziten Wassermolekülen in einer wässrigen Lösung	126
5.2	Ergebnisse der Enzymberechnungen	133
5.2.1	Ansätze und technische Details der Berechnungen	133
5.2.2	Ergebnisse und Diskussion	139
6	Anhänge	171
6.1	Zusatzdaten der Berechnungen	171
6.1.1	Zusätzliche QM-Berechnungen zum System GM II in wässriger Lösung (COSMO)	171
6.1.2	Modell-Berechnungen zum System Rhodesain (VS-Liganden) mit zwei expliziten Wassermolekülen (COSMO)	172
6.2	Zusatzdaten der Berechnungen	175
6.2.1	AMBER ^{[41][42]} -Skript zur Anwendung des harmonischen Potentials mit Hilfe einer Kraftkonstante	175
6.2.2	VMD-Skript zur Reduktion der Wassersphäre	175
6.2.3	CHEMSHELL ^[43] -Skript zur Berechnung des Reaktionsprofils als <i>relaxed scan</i>	176
6.2.4	CHEMSHELL ^[43] -Skripte zur Berechnung des MEP mit Hilfe des CI-NEB-Dimer ^{[15][14][23][24]} -Ansatzes	179
6.2.5	Test-Standard-PES der Inhibitionsreaktion der Mannosidase GM II durch den O,O-Acetal-Inhibitor	181
6.2.6	Details zu den Dispersionseffekten im Enzym-Inhibitor-Komplex der GM II mit dem N,O-Acetal-Inhibitor	182
6.3	Zusatzdaten der Berechnungen	183

Literatur	210
Abkürzungen	211
Liste der wissenschaftlichen Beiträge	213
Danksagung	215

I

Einleitung und Methoden

Kapitel 1: Einführung in das Konzept kovalent-reversibler Inhibitoren und das in-house Protokoll zum rationalen Design

Ein Proteinligand oder Inhibitor besteht je nach Art aus einer Erkennungseinheit (Abbildung 1.1), dem Teil des Moleküls mit den funktionellen Gruppen, die nicht-kovalente Wechselwirkungen (wie z.B. Wasserstoffbrückenbindungen, Salzbrücken oder ionische Wechselwirkungen, Van-der-Waals-(VdW)- und hydrophobe Wechselwirkungen)^[30] zu dem Zielenzym ausbilden kann. Sogenannte kovalente Inhibitoren besitzen zusätzlich eine reaktive Kopfgruppe (wie z.B. Keto-, Epoxy- und andere elektrophile Gruppen), die durch den nukleophilen Aminosäurerest angegriffen werden kann und somit die kovalente Verknüpfung zu dem Zielenzym sicherstellen kann.

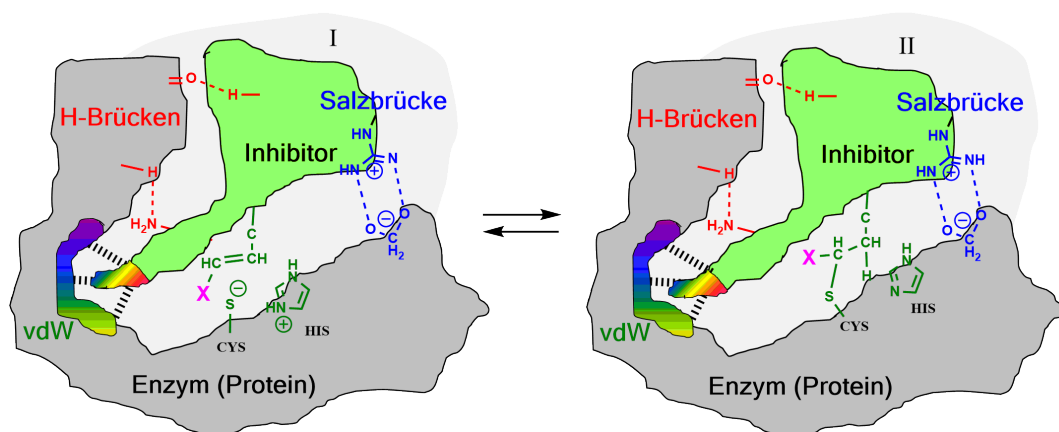


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung für die Ausbildung von Enzym-Inhibitor-Komplexen. Der Inhibitor (Proteinligand) besteht aus einer Erkennungseinheit (eine Passform und funktionelle Gruppen mit nicht-kovalenten Wechselwirkungen in der aktiven Tasche des Enzyms) und einer reaktiven Kopfgruppe (Doppelbindung mit einem X-Substituent). I: Ausbildung eines nicht-kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplexes durch die Wechselwirkungen des Zielenzyms mit den Gruppen der Erkennungseinheit. II: Ausbildung des kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplexes aus dem nicht-kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplex infolge einer chemischen Reaktion zwischen dem nukleophilen Aminosäurerest und der elektrophilen Gruppe der reaktiven Kopfgruppe.

Man unterscheidet zwischen den nicht-kovalenten und kovalenten Proteinliganden. Erstere interagieren ausschließlich durch die nicht-kovalenten Protein-Ligand-Wechselwirkungen mit den Aminosäureresten des Zielenzyms in dem sogenannten nicht-kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplex ($E \cdots I$) und somit nur reversibel an die Funktion des Zielenzym binden können. Die kovalenten Inhibitoren

oder Proteinliganden bilden dagegen, meistens aus dem nicht-kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplex heraus, durch eine chemische Reaktion eine kovalente Bindung zu dem Zielprotein aus. Durch den so gebildeten kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplex (E-I) resultiert meistens eine irreversible Hemmung des Zielenzyms. Bereits Ende des 19. Jahrhunderts, in den Anfängen der chemischen Thermodynamik wurden reversible chemische Reaktionen durch A.W. Williamson in den ersten Untersuchungen zur Ether-Synthese bestätigt und das chemische Gleichgewicht postuliert. Solche reversiblen chemischen Reaktionen eröffnen eine vollkommen neue Möglichkeit zur Arzneimittelentwicklung, denn die Inhibitoren, die zu der nicht-kovalenten Stärke ihrer Wirkung einen Zusatzbeitrag aus der reversiblen chemischen Reaktion erhalten, zeigen häufig einen höheren Wirkungsgrad der Hemmung eines Zielenzyms als nicht-kovalente Proteinliganden.

Kovalente Liganden haben aufgrund vielfältiger Vorteile in den letzten Jahren in der akademischen, aber auch in der industriellen Forschung an Bedeutung gewonnen.^[44] Bisher wurden jedoch die meisten kovalenten Liganden zufällig gefunden (Abbildung 1.2), nicht zuletzt weil die Werkzeuge für ihr rationales Design oder ihr *de novo* Design nicht so gut ausgearbeitet und etabliert sind wie die Methoden, die für die rationale Entwicklung nicht-kovalenter Liganden zur Verfügung stehen. Im Rahmen der rationalen Arzneistofffindung der Kinase-Inhibitoren beobachtet man einen Wiedereinstieg der kovalenten Wirkstoffe, basierend auf den zuvor entwickelten nicht-kovalenten Kinase-Inhibitoren.^[45] Die Gründe der Renaissance der kovalenten Inhibitoren werden in dem nachfolgenden Unterabschnitt erläutert. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich unter anderem mit der Entwicklung kovalenter, reversibler Inhibitoren für die Enzyme Rhodocain und Mannosidase GM II.

1.1 Kovalent-reversibel interagierende Inhibitoren

1.1.1 Pro und Kontra der kovalent interagierenden Proteinliganden

Ein in der pharmazeutischen Industrie weit verbreitetes Credo, dass die elektrophilen Gruppen bei den Wirkstoff-Kandidaten ausgeschlossen werden sollten^[46], begann mit den Forschungsansätzen von E. und J. Miller zu der Theorie der reaktiven Metaboliten.^[47] Dabei wurde die Hypothese ausgesprochen, dass die Karzinogenität durch die chemischen Reaktionen der reaktiven Metaboliten (Elektrophile) mit DNA und Proteinen verursacht werden.^[48] Trotz der ansatzweise entwickelten Methodiken zur Detektion der postulierten Addukte, wurde das Konzept der Arzneistoffentwicklung gegen die Entwicklung der kovalent interagierenden

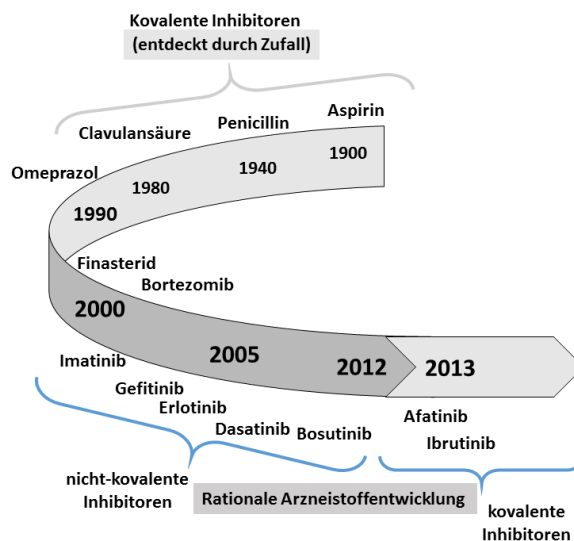


Abbildung 1.2: Zeitleiste der Arzneistoffentwicklung. Die Beispiele sind den Literaturquellen Singh et al.^[44] und Wu et al.^[45] entnommen worden.

Proteinliganden adressiert.^[46] Als Beispiele dienten die Untersuchungen an den Verbindungen wie Acetaminophen, Brombenzol und die pflanzliche Giftsubstanz Urushiol, die als ein Arzneimittel-Kandidat angesehen wurde.^[49]

Erst nach den siebziger Jahren beobachtet man an den Beispielen der Michael-Akzeptoren- und Epoxiden-Gruppen in den Wirkstoffen eine teilweise Hinwendung zu den kovalenten Inhibitoren.^{[44][50]} Die weniger reaktiven Elektrophile wie Acrylamid- und Nitril^[51]-substituierte Liganden spielen eine entscheidende Rolle. Seit Beginn der Untersuchungen und bis zum heutigen Stand zeigen diese ein allgemein sicheres Verhalten und mehr Erfolg bei klinischen Zulassungen.^[50] Heute sind mindestens 42 zugelassene Medikamente auf dem Markt, bei denen es sich um kovalent interagierende Inhibitoren handelt.^[44] Die Anzahl der Publikationen, die man z.B. mit der Datenbank SciFinder^[52] analysieren kann, zeigt für die Referenz „covalent inhibitor“ einen rasanten Anstieg beginnend mit dem Jahr 2010.^[49] Zusätzlich beobachtet man eine prozentuale Zunahme der kovalent bindenden Inhibitoren unter allen anderen möglichen Referenzen für den Suchbegriff „inhibitor“.^[49]

Laut Literaturangaben werden kovalent interagierende Proteinliganden durch ihre Plus- und Minuspunkte charakterisiert.^{[44][49]}

Nachteile und Inadäquatheit der kovalenten Inhibitoren:

- Hyper-reaktive Kopfgruppen könnten zu der Induktion der Toxizität anderer Wirkstoffe (wie z.B. Hepatoxizität, Mutagenität, Karzinogenität) beitragen;
- Risiken der idiosyntaktischen Toxizität und immunvermittelten Hypersensitivität;

- kein Vorteil für biologische Ziel-Systeme, die durch einen schnellen Umsatz der Proteinsynthese charakterisiert sind;
- nicht geeignet für Mechanismen, die kurze Verweildauer am Enzym, oder kurzlebige Inhibition erfordern;

Vorteile und Relevanz der kovalent interagierenden Proteinliganden:

- Effizienz: die Nicht-Gleichgewichtsbindung (*nonequilibrium binding*) eines kovalenten Proteinligands vermag gegen die kompetitive endogene Substratkonzentration (Konzentration des Substrats, das zu der selben aktiven Seite bindet) dominierend wirken;
- sehr hohe biochemische Effizienz könnte niedrigere Dosierungen zur Folge haben, und somit zur Herabminderung der unspezifischen Effekte (*off-target effects*) führen;
- kovalente Bindung könnte den Progress der Resistenz abschwächen (wie z.B. Getinib, Erlotinib und Lapatinib von Kinase Zielenzym);
- ungekoppelte Pharmakodynamik und -kinetik kann zusammen mit den verlängerten Wirkungszeiten (durch sog. *längeren Verweildauer* des Inhibitors am Zielenzym) in eine reduzierte Häufigkeit der Arzneimittelgaben resultieren;
- potentielle Möglichkeit der Arzneimittelentwicklung für Zielenzyme mit kleinen, flach geformten und somit komplex adressierbaren aktiven Taschen (*undragable pocket, solvent-exposed* wie z.B. Kathepsin K);

Die positiven Punkte der kovalent interagierenden Liganden sind im Wesentlichen mit der längeren Verweildauer des Inhibitors verbunden.^{[44] [53]} Wie zudem die Reaktionsthermodynamik und -kinetik ihren Beitrag dazu leistet und welche Vorteile man daraus ziehen kann, wird in dem nächsten Unterabschnitt dargestellt.

1.1.2 Konzept der rationalen Entwicklung kovalent und reversibel hemmender Inhibitoren

Eine für den Erfolg oder Misserfolg eines Inhibitors wichtige Größe ist die Lebensdauer des Enzym-Inhibitor-Komplexes. Sie korreliert mit der freien Bindungsenergie des Komplexes, die wiederum maßgeblich durch die Stärke der zwischen Enzym und Inhibitor existierenden Wechselwirkungen beeinflusst wird. Wie Arbeiten von Kuntz *et al.* zeigen, liegt die freie Bindungsenergie nicht-kovalenter Inhibitoren sehr selten über 15 kcal/mol,^[54] was Bindungskonstanten K_i von etwa

10 pM entspricht und in eine Dissoziationshalbwertszeit¹ des Enzym-Inhibitor-Komplexes $t_{1/2}$ von 2 - 20 Stunden umgerechnet werden kann.^[53] Die meisten nicht-kovalenten Wirkstoffe besitzen sogar nur K_i -Werte im nanomolaren Bereich, so dass sich ihre Dissoziationshalbwertszeiten auf Minuten reduzieren. Da die freie Energie der Komplexbildung pro Schweratom des Liganden (*ligand efficiency*) bei nicht-kovalenten Inhibitoren bei maximal ca. 0,3 kcal/mol pro Schweratom liegt,^[53] werden die notwendigen Affinitäten häufig nur durch sehr große und komplexe Inhibitoren erreicht.

Deutlich stärkere Wechselwirkungen ergeben sich, wenn nach Bildung des nicht-kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplexes $E \cdots I$ (Abbildung 1.3, roter Teil) im zweiten Schritt eine Reaktion zwischen Enzym und Inhibitor stattfindet, die zu einer kovalenten Bindung zwischen Enzym und Inhibitor führt ($E-I$, Abbildung 1.3, blauer Teil). In den weitaus meisten bekannten Fällen sind die gebildeten kovalenten Bindungen aber so stark, dass keine Rückreaktion mehr stattfinden kann (Abbildung 1.3, blaue gepunktet). Als Folge ist das Enzym irreversibel blockiert (*dead-end-Addukt*) und steht nur noch nach Neusynthese wieder zur Verfügung. Trotz des unbestreitbaren Erfolgs von auf irreversibler Hemmung eines Enzyms beruhenden Medikamenten^[54], bestrebt die Entwicklung neuer kovalent reversibel interagierender Inhibitoren signifikante Reduktion des Risikos für eine unspezifisch ablaufende Nebenreaktion zu *dead-end-Addukten* und damit verbundenen Nebenwirkungen (*off-target effects*).^{[54] [55] [56]}

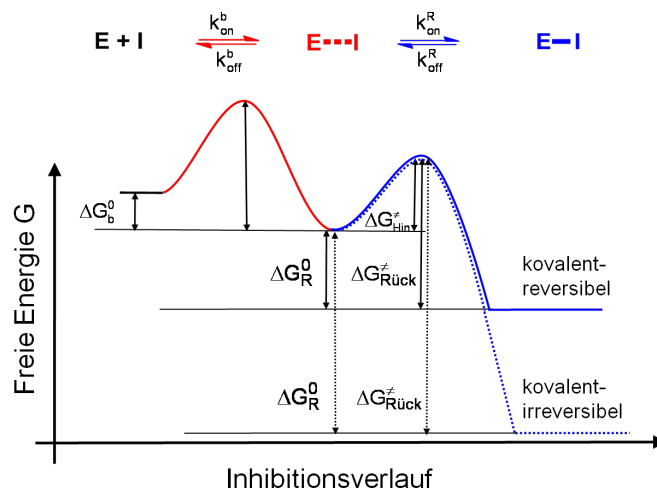


Abbildung 1.3: Reaktionsenergie-Diagramm: Energieprofile nicht-kovalenter (rot), kovalent-irreversibler (blau, gepunktet) und kovalent-reversibler Inhibitoren (blau, durchgezogene Linie).

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich daher mit der Entwicklung der neuen Inhibitoren im Rahmen eines in-house Konzepts zum rationalen Design maßge-

¹Verweildauer des Inhibitors am Zielenzym

schneiderter, kovalent-reversibler Inhibitoren. Die von ihnen ausgebildete kovalente Bindung ist aber so schwach (Abbildung 1.3, durchgezogene blaue Kurve), dass die Rückreaktion stattfinden kann. Folglich wird nach einer gewissen Zeit die kovalente Bindung wieder gebrochen und die Wechselwirkung nur das nicht-kovalente Enzym-Inhibitor-Komplex vorliegt. Durch die Ausbildung einer kovalenten Bindung zum Enzym besitzen sie ebenfalls eine deutlich längere Verweildauer in der aktiven Tasche im Vergleich zu den nicht-kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplexen. Da nur die Verweildauer stark erhöht wird, der Prozess aber reversibel bleibt, treten die möglichen Nachteile irreversibler Inhibitoren nicht auf.

Die Energieverläufe der verschiedenen Inhibitionstypen werden im Energiediagramm in Abbildung 1.3 verglichen. Da die nicht-kovalenten Proteinliganden keine geeignete reaktive Kopfgruppe besitzen, findet bei diesen nur der mit rot gekennzeichnete erste Schritt statt. Ihre Affinität zum Enzym und damit die Lebensdauer des nicht-kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplexes $E \cdot \cdot I$ korreliert mit ΔG_b^0 . Auch kovalent interagierende Inhibitoren bilden zunächst einen nicht-kovalenten Assoziationskomplex $E \cdot \cdot I$ aus. In diesem Komplex kommen sich geeignete reaktive Zentren von Enzym und Inhibitor aber so nahe, dass im zweiten Schritt eine chemische Reaktion stattfinden kann, in deren Verlauf eine kovalente Bindung zwischen Enzym und Inhibitor gebildet wird ($E-I$). Ist diese chemische Reaktion stark exergon (ΔG_R^0 groß; blaue gepunktete Linie), unterscheiden sich die Reaktionsbarrieren der Hin- (ΔG_{Hin}^\ddagger) und der Rückreaktion ($\Delta G_{Rück}^\ddagger = \Delta G_R^0 + \Delta G_{Hin}^\ddagger$) so stark, dass keine Rückreaktion stattfinden kann. Ist diese chemische Reaktion jedoch nur schwach exergon (ΔG_R^0 klein; blaue durchgezogene Linie), unterscheiden sich die Barrieren von Hin- (ΔG_{Hin}^\ddagger) und der Rückreaktion ($\Delta G_{Rück}^\ddagger = \Delta G_R^0 + \Delta G_{Hin}^\ddagger$) nur wenig. Da folglich auch die Rückreaktion stattfindet, wird die Enzym-Inhibitor-Bindung nach einer gewissen Zeit wieder gebrochen und das Enzym wieder freigesetzt. Da der in der Abbildung 1.3 gezeigte Energieverlauf auch dem Energieverlauf der Inhibitionsmechanismen von *slow*, *tight-binding*-Inhibitoren entspricht, kann man die für diese Inhibitoren entwickelten Ansätze ausnutzen, um den Einfluss der nachgeschalteten Reaktion auf die gesamte Dissoziationshalbwertszeit abzuschätzen.^{[53][57][58]} Für eine thermoneutrale Reaktion ($\Delta G_R^0 = 0$ kcal/mol) ergibt sich bereits eine Verlängerung der Dissoziationshalbwertszeit um einen Faktor von 2 relativ zu nicht-kovalent interagierenden Inhibitoren ohne nachgeschalteten Prozess. Für freie Reaktionsenergien ΔG_R^0 von -3, -5 oder -7 kcal/mol verlängert sich die Dissoziationshalbwertszeit um Faktoren von ca. 10^3 , 10^4 und 10^5 .

Geeignete kovalent-reversible Inhibitoren sollten die folgenden Eigenschaften besitzen. Die freie Bindungsenergie, ΔG_b^0 , des zunächst gebildeten nicht-kovalent interagierenden Enzym-Inhibitor-Komplexes $E \cdot \cdot I$ sollte möglichst hoch sein, da sich eine hohe Affinität des Inhibitors zum Zielenzym auch häufig positiv auf sei-

ne Selektivität auswirkt. Zudem muss die Orientierung des Inhibitors im E···I-Komplex die im zweiten Schritt ablaufende Reaktion ermöglichen, d.h. die miteinander reagierenden Zentren dürfen nicht zu weit voneinander entfernt sein. Natürlich muss die Reaktionsbarriere der Hinreaktion ($\Delta G_{\text{Hin}}^\ddagger$) ebenfalls in einem gewissen Energiefenster liegen. Zu hohe Barrieren behindern Hin- und Rückreaktion gleichermaßen, zu niedrige Reaktionsbarrieren dagegen wirken sich negativ auf die Selektivität aus. Beispiele sind heterozyklische Nitrile als Inhibitoren von Cysteinproteasen.^[59] Bei diesen Inhibitoren korreliert häufig die Reaktivität (Elektrophilie) des Nitrils mit geringer Selektivität, d.h. hoch reaktive Nitrile besitzen eine geringere Selektivität. Zu hohe Barrieren würden sich natürlich immer dann ergeben, wenn die während der Reaktion stattfindenden Umlagerungen von Inhibitor zu Enzym zu starken sterischen Effekten führen. All dies unterstreicht die Bedeutung des E···I-Komplexes für die Auswahl geeigneter Inhibitoren. Eine letzte Anforderung ergibt sich aus der Thermodynamik der im zweiten Schritt ablaufenden chemischen Reaktion. Da der Inhibitor kovalent-reversibel wirken soll, darf der zweite Schritt nicht zu exergon sein. Auf Basis der *slow, tight-binding*-Inhibitoren entwickelten Abschätzungen sollte ΔG_{R}^0 daher in einem Fenster von 0 bis -10 kcal/mol liegen.

Aufgrund dieser Anforderungen ist die Entwicklung kovalent-reversibler Inhibitoren komplexer als die Entwicklung ausschließlich nicht-kovalent interagierender Inhibitoren. Durch die Kombination von Docking, Kraftfeldberechnungen (MM), quantenmechanischen Ansätzen (QM) und QM/MM-Hybrid-Ansätzen lassen sich gute Vorschläge für geeignete kovalent-reversibel interagierende Inhibitoren erarbeiten. Die QM-Modell und QM/MM-Methode ermöglicht eine Aufstellung von Energiediagrammen, die den Reaktionsenergie-Diagrammen (ΔG_{R}^0 und ΔH_{R}^0 einer chemischen Reaktion) sowohl in Lösung als auch im Enzym eine sehr gute Näherung darstellen. Es werden die relativen Energien zwischen den Edukten und den Ausgangsstoffen, welche als Gleichgewichtsgeometrien im Rahmen der Born-Oppenheimer-Näherung (die mathematische Grundlagen werden detailliert in Kapitel 3 dargelegt) optimiert werden, ermittelt. Die Berechnungen in der QM-Modell-Betrachtung ergeben somit die Reaktionsenergien einer Inhibitionsreaktion in der wässrigen Lösung (Berücksichtigung der Lösungsmittelleffekte siehe Kapitel 3). Zusätzlich werden die relativen Energien der reaktiven Zwischenstufen einer Inhibitionsreaktion in Lösung in Abhängigkeit von den Substituenten des Inhibitor-Moleküls berechnet. Im nächsten Schritt des Protokolls werden durch punktweise Geometrieoptimierungen Potentialhyperflächen (im Weiteren als PES für *potential energy surface*) für Inhibitionsreaktionen mit definierten Reaktionskoordinaten als 2- und 3-dimensionale Scans erstellt (Abbildungen 1.4 und 1.5).

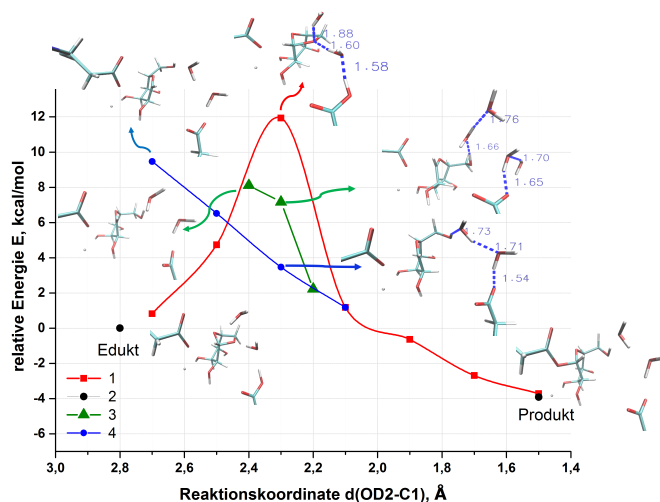


Abbildung 1.4: 2-dimensionaler Scan zur Ermittlung des Reaktionsprofils der Additionsreaktion eines kovalent-reversiblen Inhibitors der α -Mannosidase GM II in Abhängigkeit von der Reaktionskoordinate Bindungsabstand $d(\text{OD2-C1})$.

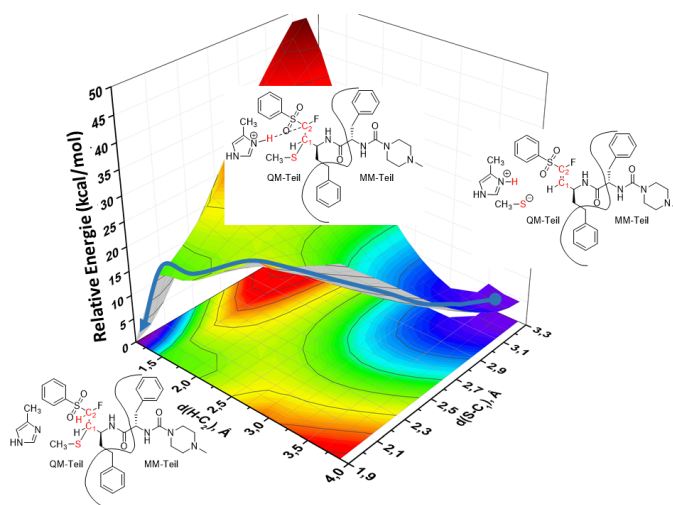


Abbildung 1.5: PES der Additionsreaktion eines kovalent-reversiblen Inhibitors des Enzyms Rhodocystatin als 3-dimensionaler Scan in Abhängigkeit von den Reaktionskoordinaten Bindungsabstände $d(\text{S-C1})$ und $d(\text{H-C2})$. Blauer Pfeil: Richtung der Berechnung und gleichzeitig Richtung des Reaktionsablaufs.

Die berechneten relativen Energien (relativ zu der Energie des Eduktes oder des Produktes je nach der Richtung der QM/MM-Berechnung auf der PES) werden in Ergebnissen und Diskussion auch als Reaktionsenergien einer Inhibitionsreaktion ΔE (kcal/mol) bezeichnet. Diese Größe bestimmt die Reaktionswärme (die thermodynamische Reaktionsenergie ΔH_R^0) und lässt verlässliche Schlussfolgerungen über eine thermodynamische Begünstigung (exotherme Reaktion) oder Hemmung

der Reaktion (endotherme Reaktion) ziehen. Die kovalent-reversiblen Inhibitoren sollten in dieser Betrachtung nur möglichst leicht exotherme Reaktionen mit den relativen Energien (oder, anders ausgedrückt, ΔE_R -Reaktionsenergien) im Bereich -5 bis -10 kcal/mol aufweisen.

Optimierungen eines Übergangszustandes als Sattelpunkt einer PES liefern die relativen Energien, die die freien Aktivierungsenergien der Inhibitionsreaktion (siehe Hin- $\Delta G_{\text{Hin}}^\ddagger$ und Rückreaktion $\Delta G_{\text{Hin}}^\ddagger$ des Energiediagramms in Abbildung 1.3) bestimmen. Es wird in Ergebnissen und Diskussion die Höhe der Reaktionsbarriere anhand der relativen Energien der aktiven Zwischenstufen und Übergangszustände diskutiert. Hierbei lässt sich die in einem Reaktionsprofil relativ hohe Barriere durch eine langsam ablaufende Reaktion (experimentell gemessen) erklären.

Das rationale Design kovalent-reversibler Inhibitoren umfasst vier Stufen, die in der Zusammenarbeit der theoretischen und experimentellen Methoden durchgeführt wird (Abbildung 20).

1. Stufe: Zunächst muss eine geeignete Kopfgruppe, die mit dem aktiven Zentrum des Enzyms schwach exotherm reagiert, identifiziert werden. Hierbei geht man von aktiven Kopfgruppen aus und optimiert die Thermodynamik der Reaktion als Funktion des Substituentenmusters der Kopfgruppe. Eine Eingrenzung auf erfolgversprechende Muster ist bereits mit weniger aufwändigen QM-Berechnungen möglich, bei denen man die Thermodynamik der Reaktion als Funktion der Substituenten in Lösung mit Hilfe kleiner Modellsysteme berechnet.^{[60][51]} Gleich zu Beginn geben Messungen der Kinetik und Thermodynamik der relevanten Reaktionen der aktiven Kopfgruppe mit unterschiedlichen Substituentenmustern in wässriger Lösung Aufschluss über die Genauigkeit der zur Vorauswahl durchgeführten quantenchemischen Berechnungen. Die Vorschläge werden durch die Synthesen realisiert und zunächst in der wässrigen Lösung charakterisiert. Darüber hinaus liefern massenspektrometrische Untersuchungen zuverlässige Nachweise für kovalente Bindungen.
2. Stufe: Da die Reaktion in der aktiven Tasche des Zielenzym stattfindet, ist es im zweiten Schritt erforderlich, die Enzymumgebung explizit zu berücksichtigen und die Enzymhemmung unter diesen Bedingung zu bestimmen. Die in der ersten Stufe erarbeiteten Vorschläge werden im Hinblick auf die Hemmung theoretisch mittels kombinierter QM/MM-Berechnungen^[6] und experimentell mittels geeigneter Experimente *in vitro*^[5], unter mehreren anderen z.B. die fluorometrischen Enzymassays^[28], analysiert.
3. Stufe: Des Weiteren wird versucht, die Affinität eines Inhibitors zum Enzym durch eine zusätzliche Optimierung seiner Seitenketten (Erkennungseinheiten, Abbildung 1.1) weiter zu erhöhen. In diesem Schritt werden die Docking-

Methoden verwendet. Wie in Schritt I, bei dem es um Veränderungen der aktiven Kopfgruppe geht, muss auch in Schritt III sichergestellt werden, dass die neu eingeführten Seitenketten die Orientierung des Enzym-Inhibitor-Komplexes nicht so verändern, dass die chemische Reaktion im aktiven Zentrum entscheidend behindert wird. Die Verifizierung der modifizierten Inhibitoren erfolgt wiederum durch die QM/MM-Rechnungen und experimentelle Überprüfungen im nächsten Schritt des Protokolls.

4. Stufe: Die letzte Stufe des in-house Protokolls besteht darin, die optimierten Inhibitoren erneut auf eine chemische Reaktion in der aktiven Tasche des Enzyms zu untersuchen.

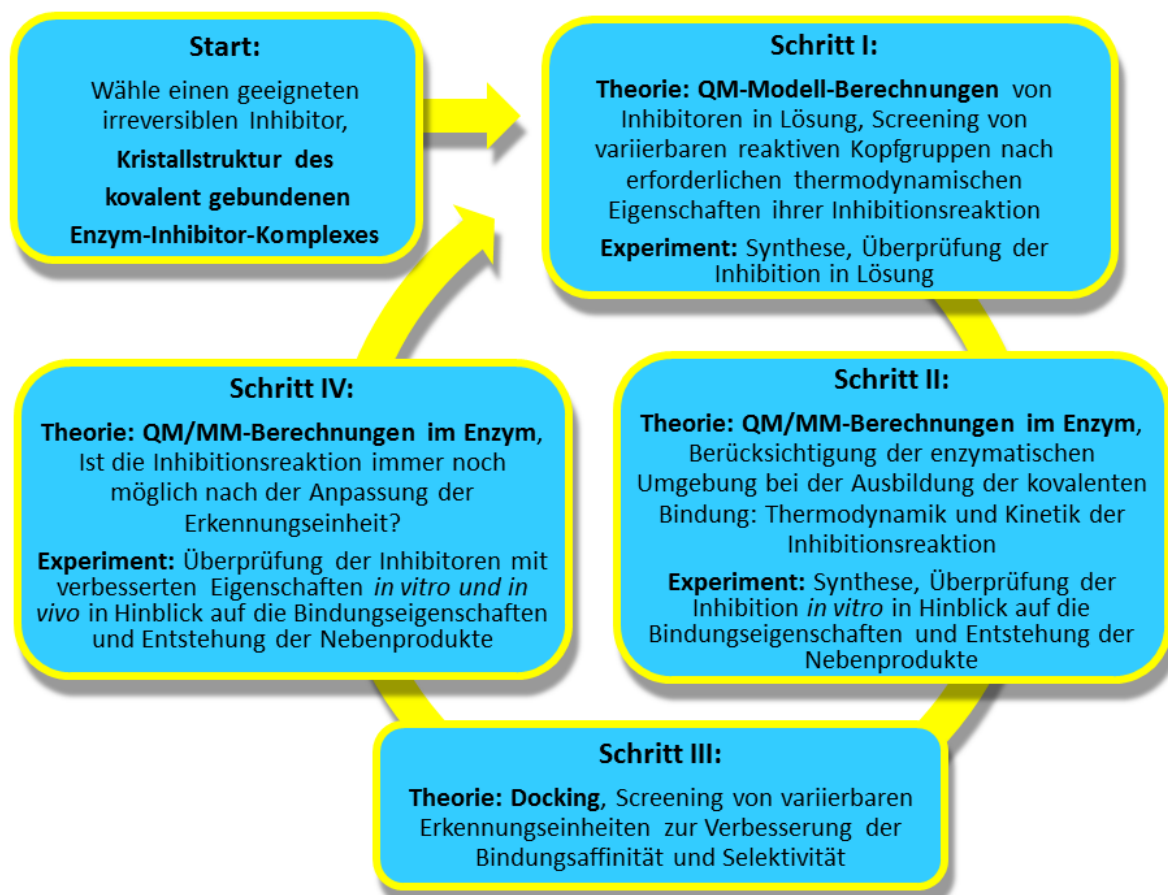


Abbildung 1.6: Das in-house Protokoll zum rationalen Design.^[5]

Kapitel 2: Biochemischer Hintergrund und Zielsetzung der Arbeit

Nach Angaben der WHO sterben pro Jahr 10 Mio. Menschen an Krebs.^[61] Schnelles Tumorwachstum und Metastasierung stellen die wesentlichen Probleme bei seiner Bekämpfung dar. Beide Probleme hängen bei Tumoren mit typischen Oberflächen-Glykoproteinen und mit defizitärem Oligosaccharid-Gerüst zusammen. So konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung der für solche verkürzten Strukturen verantwortlichen, bei Tumoren überexprimierten, Golgi- α -Mannosidase II (GM II) das Tumorwachstum und die Metastasierung stoppt.^{[1][2]} Trotz dieser Erkenntnisse wurden bislang keine Inhibitoren gefunden, die GM II mit ausreichender Affinität und Selektivität hemmen.

Laut Weltgesundheitsorganisation (WHO) werden immer noch die Bevölkerungen der 36 Länder der Region Sub-Sahara durch die sogenannte vernachlässigte tropische, parasitäre Krankheiten, wie z.B. die Afrikanische Schlafkrankheit, bedroht.^{[62][63]} So wurden im Jahr 2015 2729 neue Fälle registriert.^[64] Die veraltete Therapie durch Impfungen mit dem arsenhaltigen Nervengift Mersaloprol und dem mutagenen Präparat Nifurtimox, die irreversible Schäden durch Nebenreaktionen auslösen, zeigen die Notwendigkeit der Entwicklung neuer Wirkstoffe gegen die Afrikanische Schlafkrankheit. Basierend auf der Bedeutung des Zielenzym Protease^[46] für das (Über)-Leben des parasitären Krankheitserregers steht Rhodesain seit einigen Jahren im Fokus der Wirkstoffforschung.^[65] Trotz des Vorhandenseins irreversibel interagierender Inhibitoren der Cysteinprotease Rhodesain^[3] gibt es keine Verbindungen, die die klinische Testphase erreicht haben.^[4] Denn, wie oben erläutert, werden in der pharmazeutischen Industrie keine irreversiblen Leitstrukturen aufgrund der möglichen Nebeneffekte weiterentwickelt.^[49]

Das folgende Kapitel beschreibt die biochemischen Informationen über die Struktur und Funktionen der untersuchten Targetenzyme.

2.1 Glykosidasen und die Golgi- α -Mannosidase II

Die Glykosylierung von Proteinen^[66] gehört zu einer der essentiellen posttranslationalen Modifikationen, die auf dem ER-Golgi-Weg (ER = endoplasmatisches Retikulum) erfolgt. Sie beinhaltet die Anknüpfungen von Oligosacchariden an Proteinen. Erfolgt diese durch die Aminogruppen der Proteine, und zwar durch die Seitenkette der Aminosäure Asparagin, nennt man diese die N-Glycosylierung. Im Fall der Anknüpfung durch die Hydroxygruppen der Proteine, Serin oder Threonin, spricht man von einer O-Glycosylierung. Die daraus resultierenden Glycoproteine finden sich durch die Sekretion im extrazellulären Raum auf der Zello-

berfläche wieder.

Glykosylierung ist an der Regulation vieler Proteinfunktionen beteiligt. Glykoproteine fungieren zum Einen als Regulatoren bei pathologischen Entzündungsformen wie rheumatoider Arthritis, Asthma, Diabetes mellitus und Ischämie. Zusätzlich zählen Glycoproteine zu den wichtigen Membranproteinen, die bei den Zell-Zell-Wechselwirkungen eine wichtige Rolle spielen. Sie dienen zum Beispiel als Signalmoleküle bei der Zell-Zell vermittelten Immunantwort zur gezielten Abwehr von Tumoren und Viren. Für die Initiierung der Immunabwehr sind Kohlenhydrat-bindende Proteine wie zum Beispiel Selectine (Glykoproteine der Plasmamembranen eukariotischer Zellen)^[67] entscheidend. Deshalb sind diese für die pharmazeutische Forschung zu wichtigen Zielstrukturen geworden. Zum anderen sind Selectine auch wichtige Faktoren im Metastasierungsprozess bei Krebserkrankungen^{[68][69]}. Sie vermitteln die Bindung verschiedener metastasierender Krebszellen aus dem Blutstrom an das Gefäßendothel und die anschließende Gewebeeinvasion. Die auf Krebszellen vorkommenden Strukturen mit verändertem Glykosylierungsmuster fungieren dabei als Selectinliganden^{[70][71]}. Bei diesen veränderten Glykosylierungsmustern handelt es sich um die bestimmten verkürzten Oligosaccharidstrukturen, die auch als Tumormarker dienen^{[72][73][74]}. Damit rücken die Enzyme, die am Auf- und Abbau solcher komplexen Oligosaccharide beteiligt sind, in den Fokus zahlreicher Studien. Die defizitäre Glykostrukturen kommen entweder durch eine reduzierte Expression von Glykosyltransferasen oder durch eine erhöhte Expression von Zucker-hydrolysierenden Enzymen, den Glykosidasen,^[75] zu Stande. Durch die gezielte Inhibition der Glykosidasen kann der Abbau von Oligosacchariden verhindert werden^{[76][77]}, deswegen gehören diese zu den vielversprechenden Targets zur Entwicklung von neuen cytotostatischen Wirkstoffen. Eines dieser Zielproteine ist die Golgi- α -Mannosidase II (im Weiteren als Mannosidase GM II), für die bereits die ersten nicht-kovalent bindenden Inhibitoren entwickelt wurden^{[78][79][80]}. Zahlreiche Untersuchungen konnten belegen, dass die Inhibition dieses Enzyms das Tumorwachstum blockiert. So wurde der Indolizin-alkaloide Inhibitor Swainsonin (8 $\alpha\beta$ -Indolizin-1a,2a,8b-triol), welcher seine Wirkung im nanomolaren Bereich zeigt, in zwei klinischen Untersuchungsphasen getestet^{[81][82]}. Jedoch weisen die bislang entwickelten Inhibitoren durch ihre geringe Selektivität zahlreiche Nebenwirkungen auf. Insbesondere werden neben der Mannosidase GM II auch die essentiellen Mannosidasen des Enzyms Lysozym gehemmt^[55]. Die Entwicklung neuer alternativ wirkender Inhibitoren des Enzyms GM II verbleibt deshalb ein aktueller Gegenstand der akademischen und klinischen Krebsforschung.

2.1.1 Hydrolasen und Glykosylhydrolasen der H38-Familie

Die sequenzbezogene Klassifikation von Glykosidasen in die Familien, die jeweils ähnliche Faltungen und Katalysemechanismen aufweisen, ist in der CAZy-Datenbank (Carbohydrate-Active enZymes) strukturiert und dokumentiert^{[83][84]}. Golgi α -1,3-1,6-Mannosidase II (GM II) ist eine Glykosylhydrolase aus der Familie 38 und ist in dem CAZy-System unter *Enzyme Commission* Nummer^[85] E.C.3.2.1.114 eingetragen. GM II spielt eine zentrale Rolle als eine Endhydrolase in dem N-Glykosilierungsweg von Proteinen. Der N-Glykosilierungsweg beinhaltet die Glykosylierung von Proteinen an den Seitenketten des Asparagins in eukariotischen Zellen. Der N-Glykosilierungsweg beginnt im endoplasmischen Retikulum mit der ersten Modifikation des Substrates, wobei die endgültige Modifikation im Golgi-Apparat abgeschlossen wird. Das Enzym GM II spaltet hochspezifisch und sequentiell^{[79][2]} zwei Mannose-Einheiten M4 und M5 (entsprechend α -1,3- und α -1,6- verknüpfte Mannosylreste) des Intermediats $GnMan_5Gn_2$ (*Gn*, N-Acetylglucosamin) zu der Core-Trimannose Struktur $GnMan_3Gn_2$ (Abbildung 2.2), die dem Aufbau komplexer N-Glycane dient. GM II ist ein Transmembranprotein des Typs II mit einer relativ bedeutenden Größe von 125 kDa (Abbildung 2.1). Es besteht aus einem N-terminalen cytoplasmatischen Ende, einer Transmembran-Domäne sowie einer großen C-terminalen katalytischen Domäne. In der sehr konservierten aktiven Tasche der GM II unterscheidet man zwischen der Anker-sub-Tasche, einer katalytischen und einer Halterung-sub-Tasche. Diese sind entsprechend mit G3 (N-Acetylglucosamin), M5 (α -1,6-verknüpfte Mannose) und M4 (α -1,3-verknüpfte Mannose) Substituenten des Substrats besetzt. Die Untersuchungen durch D. Rose *et al.* haben gezeigt, dass die katalytische Spaltung ausschließlich in der M5-sub-Tasche stattfindet. Diese sub-Tasche enthält zwei Asparaginsäure Aminosäurereste Asp204 und Asp341, die im Laufe der Glykosid-Hydrolyse ihre Protonierungszustände so einstellen, dass ein Paar aus Nukleophil und Säure-Base-Katalysator entsteht. Diese katalytischen Aminosäurereste verkörpern die katalytische Maschinerie der Glykosylhydrolasen.^[2] Es wurde berichtet, dass für die Spaltung des M4-Restes eine konformationelle Änderung des Substrats stattfinden muss, indem der M4-Rest in der katalytischen sub-Tasche die Position einnimmt (Abbildung 2.2)^[2]. Zusätzlich enthält die katalytische sub-Tasche ein strukturelles Zink-Dikation, welches elektrostatische Wechselwirkungen zu einem der katalytischen Aspartatreste und dem M5-Rest des Substrats in einer sehr charakteristischen Weise ausbildet. Das zweifach positiv geladene Zink-Ion ist mit den vicinalen Hydroxygruppen des M5-Restes, zwei Histidinresten und zwei Aspartatresten oktaedrisch arrangiert. Die Kristallstruktur der Golgi- α -Mannosidase II aus der Taufliege *Drosophila melanogaster* (dGM II) (PDB-ID: 3D4Y^[79]) gehört zu der gleichen Familie wie die

humane GM II und ist aufgrund der ausreichenden Auflösung von 1,52 Å sehr gut als Modell zur Entwicklung der Inhibitoren der humanen GM II geeignet. Die computergestützten Berechnungen (QM in Lösung und QM/MM im Enzym) in diesem Teil der Arbeit wurden im Rahmen des gemeinsamen Projekts der Arbeitsgruppe Prof. B. Engels mit den Arbeitskreisen Prof. T. Schirmeister und Prof. J. Seibel durchgeführt^{[17][16]}. Die Enzym-Assays mit den zu untersuchenden Inhibitoren wurden experimentell basierend auf der Jack-Bean- α -Mannosidase, die ebenso als Modellsystem für die humane GM II dient^[86], (Arbeitskreis Prof. T. Schirmeister) und auf der exprimierten Mannosidase aus der *Drosophila* (dGM II) (Arbeitskreis Prof. J. Seibel) durchgeführt.

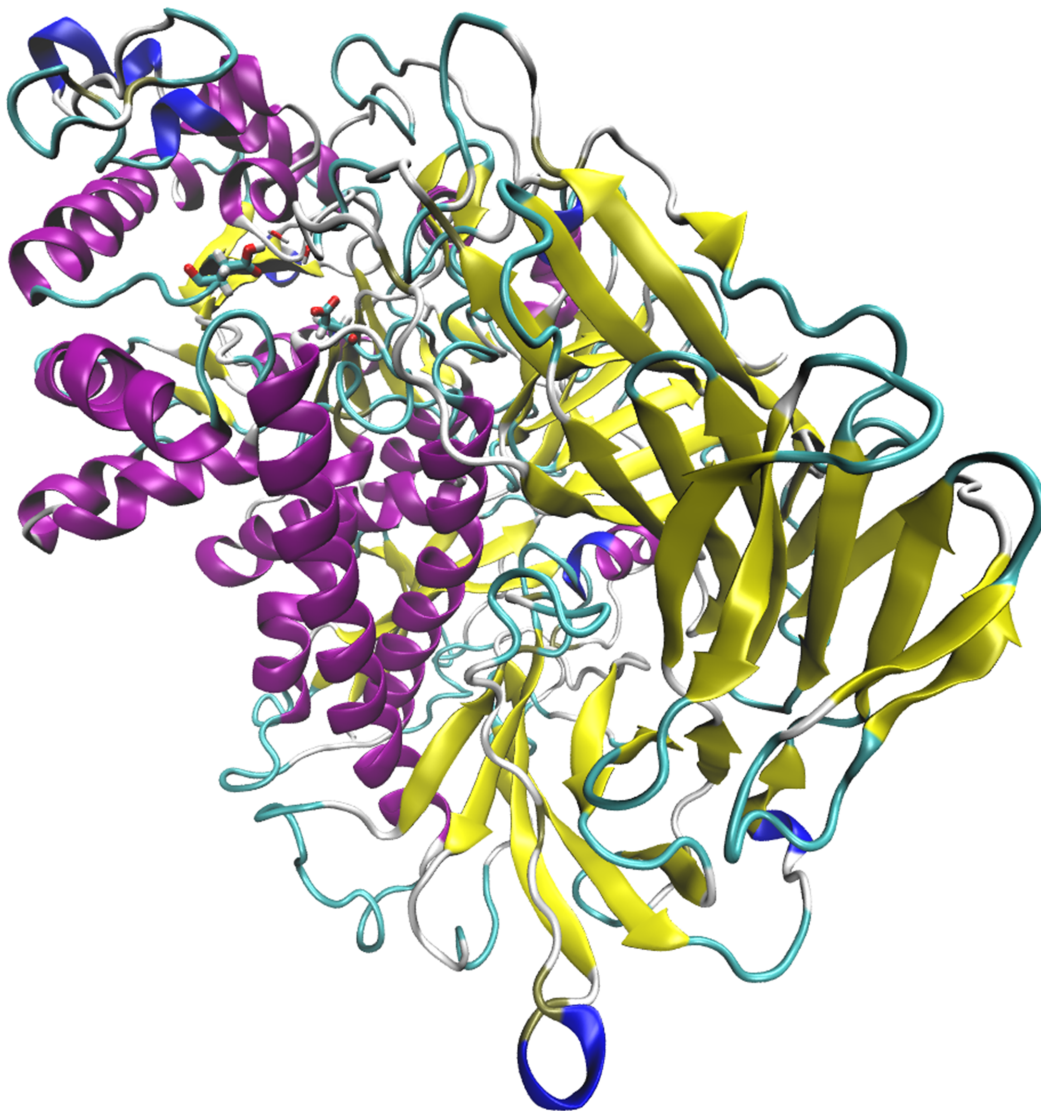


Abbildung 2.1: Kristallstruktur des Enzym dGM II aus der Familie 38 der Glycosylhydrolasen (PDB-ID: 3D4Y^[79]). Die katalytischen Aspartat Reste der M5-sub-Tasche sind in der Licorice-Darstellung des VMD-Visualisierungsprogramms^[87] gezeigt.

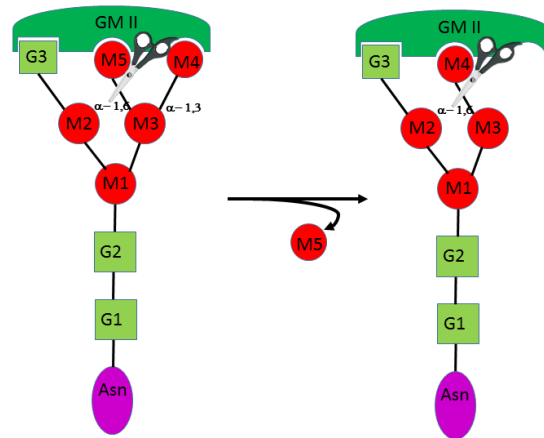


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung des vorgeschlagenen Mechanismus im aktiven Zentrum der GM II in Anlehnung an die Abbildung von D. Rose.^[2] Die katalytische Spaltung der M5 und M4-Reste erfolgt sequentiell in der katalytischen sub-Tasche der GM II.

2.1.2 Mechanismus der katalytischen Spaltung durch die Glykosidase GM II

Glykosidasen katalysieren die hydrolytische Spaltung glykosidischer Bindungen. Nach Koschland unterscheidet man zwischen den invertierenden und retendierenden Enzymen^{[88][89]}. Beide Typen von Glykosidasen enthalten im aktiven Zentrum zwei saure Aminosäuren (Asp oder Glu), von denen eine als Carboxylat und die zweite in der protonierten Form vorliegt. In beiden katalytischen Mechanismen, den retendierenden als auch den invertierenden Glykosidasen, ist ein Wassermolekül involviert^[90]. Bei invertierenden Glykosidasen sind beide Gruppen etwa 6 Å voneinander entfernt, während etwas kürzere Abstände von etwa 5,5 Å bei den retendierenden Enzymen als charakteristisch angesehen werden^[91]. Invertierende Glykosidasen spalten die glykosidische Bindung in einem Ein-Schritt-Mechanismus (Abbildung 2.3). Hierbei deprotoniert der als Carboxylat vorliegende Rest das Wassermolekül, welches in einer S_N2 -artigen Reaktion die zweite Zuckereinheit verdrängt. Die zweite an der Katalyse beteiligte Aminosäure wirkt als Säure und unterstützt die Reaktion durch die Deprotonierung der verdrängten Zuckereinheit. Der Übergangszustand der Reaktion entspricht einem Oxocarbenium-Ion. Theoretische Untersuchungen zu den katalytischen Mechanismen der invertierenden Glykosidasen wurden von Petersen *et al.*^[92] sowie Barker *et al.*^[93] durchgeführt.

Die in der vorliegenden Arbeit behandelnde GM II gehört zu den retendierenden Glykosidasen. Diese spalten die α -1,3- und α -1,6-glykosidischen Bindungen zwischen den Mannopyranosyl-Seitenketten. Der molekulare Ablauf dieser Spal-

tungen ist in der Abbildung 2.4 dargestellt.

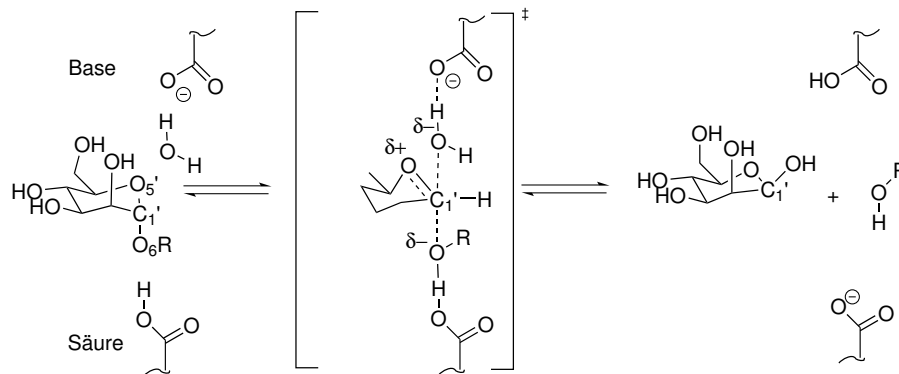


Abbildung 2.3: Molekularer Ablauf des Hydrolysemechanismus einer invertierenden Glykosidase. Gezeichnet ist eine Man-Einheit, während diese ohne Hydroxy-Gruppen im Übergangszustand schematisch dargestellt ist.

Als retendierende Glykosidase spaltet die GM II ihr Substrat in einem Zwei-Schritt-Mechanismus. Im ersten Schritt, der geschwindigkeitsbestimmend ist, greift der als Carboxylat vorliegende Rest als Nukleophil das anomere Kohlenstoffzentrum an und verdrängt die zweite Zuckereinheit. Wiederum unterstützt die zweite Aminosäure des aktiven Zentrums die Reaktion durch Protonierung der verdrängten Zuckereinheit. Wie bei dem invertierenden Mechanismus entspricht der Übergangszustand dieses Schrittes einem Oxocarbenium-Ion. Das nach diesem Schritt vorliegende kovalent verknüpfte glykosilierte Enzym (kovalente Enzym-Substrat-Komplex) wird in dem zweiten Schritt, auch deglykosilierender Schritt genannt, gespalten. Hierbei übernimmt die im ersten Schritt als Säure fungierende Aminosäure die Rolle der Base, die das beteiligte Wasser deprotoniert, sodass es als Nukleophil angreifen kann und in einer S_N2 -artigen Reaktion die Glykosyl-Enzym-Bindung spaltet. Auch dieser zweite Schritt verläuft über einen Oxocarbeniumion-Übergangszustand. Da die Konfiguration des anomeren Zentrums in jedem der beiden Schritte invertiert wird, besitzt es am Ende die gleiche Konfiguration wie zu Beginn der Reaktion^[79]. Durch Berechnung des durch die GM II katalysierten ersten Schrittes der Hydrolyse (Abbildung 2.4, obere Zeile) konnten Reilly und Mitarbeiter^[94] die molekularen Einzelheiten dieses Teilschrittes aufklären und Informationen darüber erhalten, wie sich die elektronischen und geometrischen Strukturen der beteiligten Komponenten im Verlauf dieses Teilschrittes ändern. Weitere theoretische Arbeiten zu retendierenden Glykosidasen stammen von Liu *et al.*^[95], Soliman *et al.*^[96]^[97], sowie Bowman *et al.*^[98].

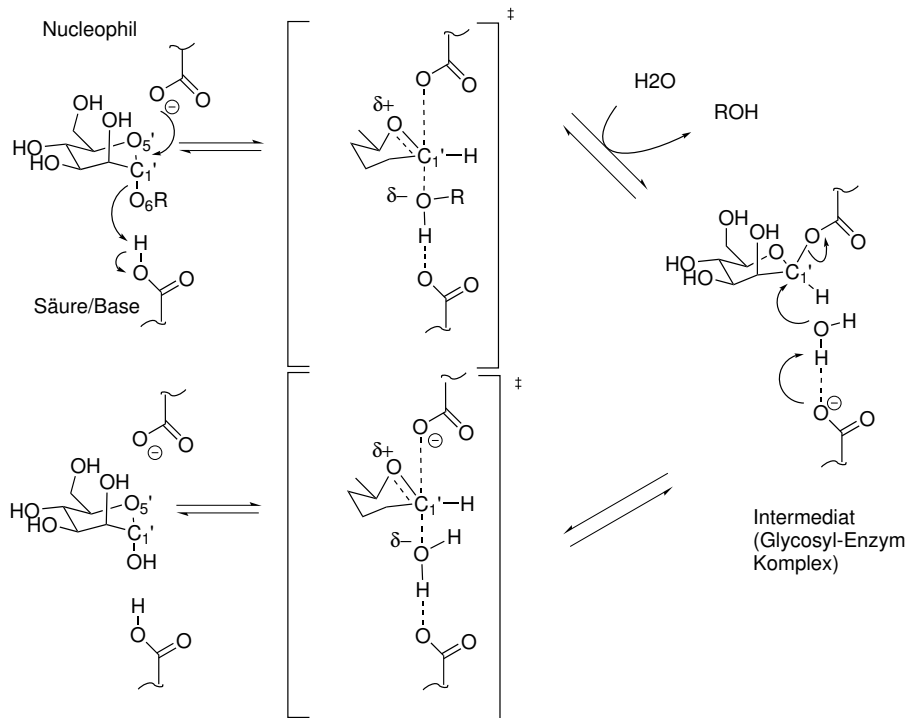


Abbildung 2.4: Molekularer Ablauf des Hydrolysemechanismus einer retendierenden Glykosidase nach Reilly und Mitarbeitern^[94] durchgeführten Berechnungen. Die obere Zeile zeigt die Abfolge des glykosylierenden Schrittes, die untere Zeile entspricht dem deglykosylierenden Schritt. Im Übergangszustand ist die Man-Einheit ohne Hydroxygruppen gezeichnet.

2.2 Proteasen und die Cysteinprotease Rhodessain

Proteasen gehören zu einer der meist untersuchten Gruppen der Enzyme. Auch als Peptidasen bekannt, katalysieren diese Enzyme sehr selektiv die Proteolyse, die katalytische Reaktion des biologischen Abbaus von Proteinen durch die Hydrolyse an einer bestimmten Peptidbindung (*scissile-bond*) des Substrats. Proteasen werden bezüglich des Aufbaus des aktiven Zentrums und des sich daraus ableitenden katalytischen Mechanismus durch die freizugängliche Online-Datenbank MEROPS^{[99][100]} in acht Familien unterteilt: Aspartat-(A), Glutamat-(G), Serin-(S), Threonin-(T), Cystein-(C), Metallo-(M), gemischte (P) und unbekannte (U) Proteasen. Die Notation der Peptidase-Klassifikation hat die Form X01.234, in welcher X als Großbuchstabe aus S, C, T, A, G, M, oder U gewählt wird, und die Zahlen die Familien- bzw. Clan- und Subfamiliennummern bedeuten. Manche Familien enthalten Subfamilien aufgrund der Divergenz innerhalb der Familie. Clans sind Gruppierungen von Familien, die sich ihrerseits aufgrund der Ähnlichkeiten in der Aminosäuresequenz und der Tertiärstruktur ergeben.^[101] Jeder Clan beinhaltet zudem eine Protease, die für diesen eine Basis darstellt und als der Namensgeber fungiert.

Im Fokus dieses Teils der Arbeit stehen Cysteinproteasen und die Cysteinprotease Rhodesain, auf die strukturellen Merkmale welcher wird im Folgenden näher eingegangen.

2.2.1 Cysteinproteasen der Papain-Familie

Alle Cysteinproteasen sind entsprechend dem MEROPS^[100]-System in insgesamt 118 Familien (C1-C118) untergliedert, die wiederum in neun Clans zusammengefasst sind. Dies sind CA (Papain-Kathepsin-), CD (Caspase-), CE (Adenain-), CF-, CL-, CM-, CN-, CO- und CP-Cysteinproteasen^{[99][102][103][104]}. Ursprünglich wurden alle Cysteinproteasen aus den afrikanischen Trypanosomen als Trypanopaine bezeichnet^[105]. Später konnte man zwischen den parasitären Enzymen, die auf unterschiedliche Wirte übertragen werden, z.B. in Säugetieren und in Menschen, entsprechend aus *T. brucei rhodesiense* und *T. brucei brucei* zu Rhodesain und Brucipain unterscheiden, obwohl die Enzyme sehr ähnliche Sequenzen aufweisen und in den verschiedenen Wirten die gleichen Funktionen aufweisen. Die pflanzliche Cysteinprotease Papain^{[106][107]}, die aus der Kautschukmilch der Papaya-Pflanze gewonnen wird, ist die am häufigsten untersuchte Cysteinprotease. Gemeinsam mit der humanen Cysteinprotease der Säugetiere, Kathepsin L, stellt sie die Basis für die Papain-Familie und Kathepsin-L-Subfamilie dar.

Die lysosomale Cysteinprotease Rhodesain gehört zu den Proteasen der Papain-Kathepsin-Familie (CAC1). Im Rahmen der MEROPS-Klassifizierung gehört Rhodesain zu dem Clan CA, Familie C1 und der Subfamilie C.01.72. Die Kristallstruktur des Enzym-Inhibitor-Komplexes des Enzyms Rhodesain mit dem Inhibitor K11777 (N-Methyl-Piperazinyl-Phenyl-Homophenylalanyl-Phenylvinylsulfon) stellt das kovalente Enzym-Inhibitor-Komplex mit der Auflösung von 1,65 Å (PDB-ID: 2P7U^[4]) dar. Die Darstellung dieser Kristallstruktur wurde unter Zuhilfenahme der Methode molekulare Ersetzung (engl. *molecular replacement*) sichergestellt. Hierbei wurde die vorhandene Kristallstruktur von Enzym-Inhibitor-Komplex des Enzyms Cruzain (PDB-ID: 1F2A^[108]) als Startgeometrie (Abbildung 2.5) verwendet. Cysteinprotease Cruzain, die ein Zielprotein zur Bekämpfung der Chaga-Krankheit darstellt, gehört ebenfalls zu der Papain-Familie (CAC1). Deswegen weisen die beiden Cysteinproteasen eine sehr große Ähnlichkeit in der molekularen Architektur auf. Die Peptidkette dieser Proteine ist aus den zwei katalytischen Domänen, R- und L-Domäne, aufgebaut. Der katalytische Cystein Cys25-Aminosäurerest gehört der L-Domäne an, während der katalytische Histidin His162-Aminosäurerest der R-Domäne zugeordnet wird (Abbildung 2.5). Die L-Domäne ist im wesentlichen aus α -Helix-Elementen aufgebaut, während die R-Domäne die β -Faltblatt-Struktur aufweist. Zwischen den beiden Domänen liegt das hoch konservierte aktive Zentrum. Dieses ist durch die Aminosäuren Cystein,

Histidin, Glutamin und Asparagin charakterisiert. Die räumliche Anordnung der Cys-, His- und Asn-Aminosäurereste wird als die katalytische Triade bezeichnet. In der Kristallstruktur von Rhodesain sind die Aminosäuren des aktiven Zentrums durch Cys25, His162, Gln19 und Asn184 vertreten. Der Cystein Cys25 Aminosäurerest in Papainproteasen weist eine ungewöhnlich hohe Acidität auf. Der pK_a -Wert des Cystein Cys25 ist 4, wohingegen der pK_a -Wert von normalen Thiolen, wie z.B. Ethylmercaptan, zwischen 8,5 und 12 liegt. Diese starke Verschiebung des pK_a -Wertes der Cysteingruppe unterstreicht den starken Einfluss der Enzymumgebung. Zusammen mit dem Histidin (His162) bildet der Cys25-Aminosäurerest das Thiolat-Imidazolium-Ionenpaar^[29] in der Mitte des aktiven Zentrums aus ($pK_a(\text{Imidazolium}) = 8,5$).^[102] Das direkt an der proteolytischen Reaktion beteiligte zwitterionische Thiolat-Imidazolium-Ionenpaar wird durch die Wasserstoffbrückenbindung der katalytischen Triade (His162-Asn182) stabilisiert (Abbildungen 2.7 und 2.8 Geometrie 1).

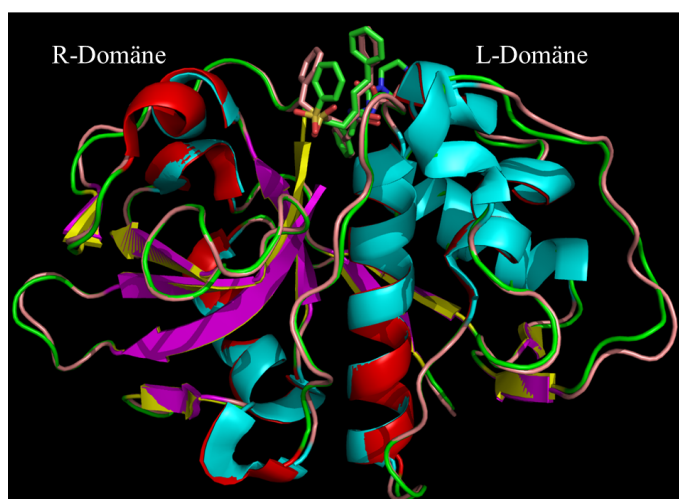


Abbildung 2.5: Kristallstrukturen der Enzyme aus der Papain-Familie Rhodesain (PDB-ID: 2P7U^[4], die Farbe türkis für α -Helix, magenta für β -Faltblatt, die Farbe hellrosa für den Rest des Proteins und den Inhibitor) und Cruzain (PDB-ID: 1F2A^[108], die Farbe rot für α -Helix, gelb für β -Faltblatt, die Farbe grün für den Rest des Proteins und den Inhibitor) überlagert durch die RMSD-Matrix des Proteinerückgrats. Die Darstellung und das strukturelle Alignment der Geometrien wurden mit Hilfe des VMD-Visualisierungsprogramms^[87] erzeugt.

Die aktive Tasche wird nach Berger- und Schlechter-Nomenklatur^[109] in die primären S_1 , S_2 , usw. an dem C-Terminus und die nicht-primären sub-Taschen S_1 , S_2 , usw. an dem N-Terminus unterteilt. Die Aminosäurereste des Substrats werden entsprechend der Besetzung der sub-Taschen P_1 , P_2 , usw. und P'_1 , P'_2 , usw. genannt (Abbildung 2.6).

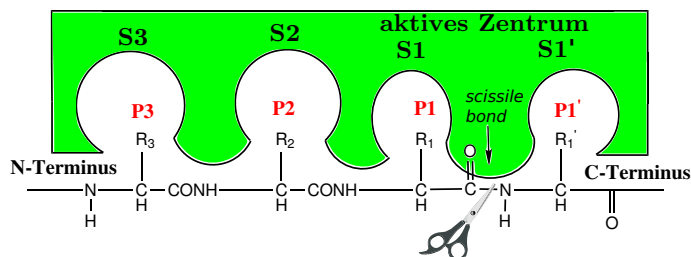


Abbildung 2.6: Nomenklatur nach Berger und Schlechter^[109] für die Aminosäuresequenzen in der Bindetasche des Enzyms.

In der Kristallstruktur des kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplexes Rhodesain - K11777 unterscheidet man die folgenden sub-Taschen (Abbildung 2.7).

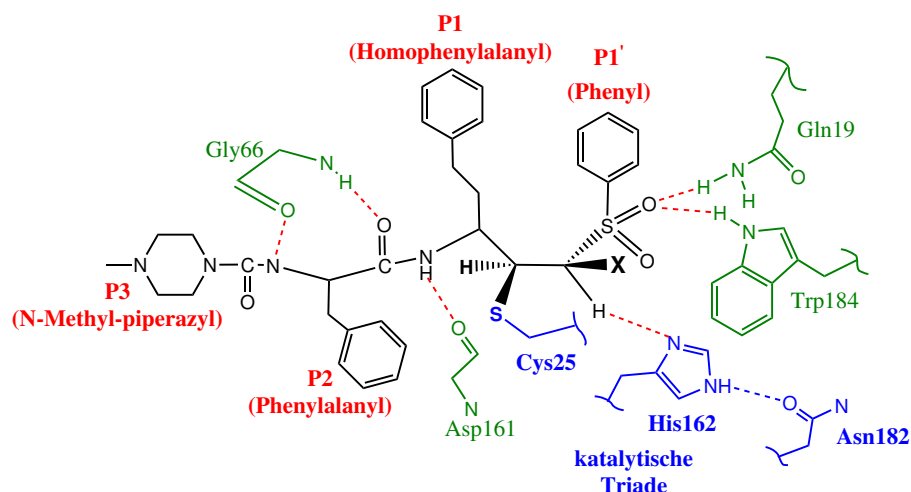


Abbildung 2.7: Schematische Darstellung der Besetzung des aktiven Zentrums von Rhodesain durch den VS-Inhibitor K11777 (schwarz). Die charakteristischen Wechselwirkungen des Inhibitors K11777 (X=H) mit den polaren Seitenketten der aktiven Tasche (grün) sind durch die roten Punktlinien dargestellt. Die katalytische Triade der Cysteinprotease Rhodesain ist in blau gezeigt. Die Substituenten des Inhibitors K11777 (X=H) sind entsprechend der Nomenklatur nach Berger und Schlechter^[109] beschriftet.

Die Tasche S1' ist mit der Phenyl-Vinylsulfon-Gruppe (P₁') besetzt. Die Taschen S1, S2 und S3 werden durch Homophenylalanyl-(P₁)-, Phenylalanyl-(P₂)- und N-Methyl-Piperazyl-(P₃)-Gruppen belegt. Die Doppelbindung des Inhibitors liegt somit direkt in dem scissile-bond-Bereich. Der Inhibitor K11777 besitzt keine EWG (Electron-Withdrawing Group) am α -VS-Schwefelatom (X=H). Die Phenyl-Gruppen der Substituenten P₁ und P₁' sind für Lösungsmittelmoleküle sehr leicht zugänglich. Man spricht hierbei vom *solvent-exposed* aktiven Zentrum des Rhodesain, welches für die meisten Cysteinproteasen ein Merkmal ist (Abbildung 2.5).

2.2.2 Mechanismus der Proteolyse durch Cysteinproteasen der Papain-Familie

Die Hydrolyse eines Substrat-Moleküls durch die spezifische Cysteinprotease erfolgt katalytisch in mehreren Schritten (Abbildung 2.8). Die Zwischenstufen der Gesamtreaktion werden durch die Enzymumgebung stabilisiert, sodass die in wässriger Lösung sehr langsam ablaufende Reaktion sehr schnell und spezifisch wird. Zunächst greift das Thiolat-Anion nukleophil das Carbonyl-Kohlenstoffatom der zu spaltenden Amidbindung an. Daraus resultiert das negativ geladene tetraedrische Intermediat (Geometrie 2 in Abbildung 2.8), das durch die Oxyanionentasche (*oxyanion hole*) stabilisiert wird. Diese Stabilisierung erfolgt über Wasserstoffbrückenbindungen zur Seitenkette des Gln19-Aminosäurerests und zu dem Proteinrückgrat des Cys25-Aminosäurerests. Unter der Eliminierung des C-terminalen Teils des Substrats setzt sich das Intermediat zu dem acylierten Enzym um. Im nächsten Schritt wird das Acyl-Enzym Wasser-vermittelt zu dem zweiten anionischen Intermediat umgesetzt (Geometrie 4 in Abbildung 2.8). Durch Abspaltung des N-terminellen Teil des Substrats erfolgt die Freisetzung des Enzyms (Abbildung 2.8).

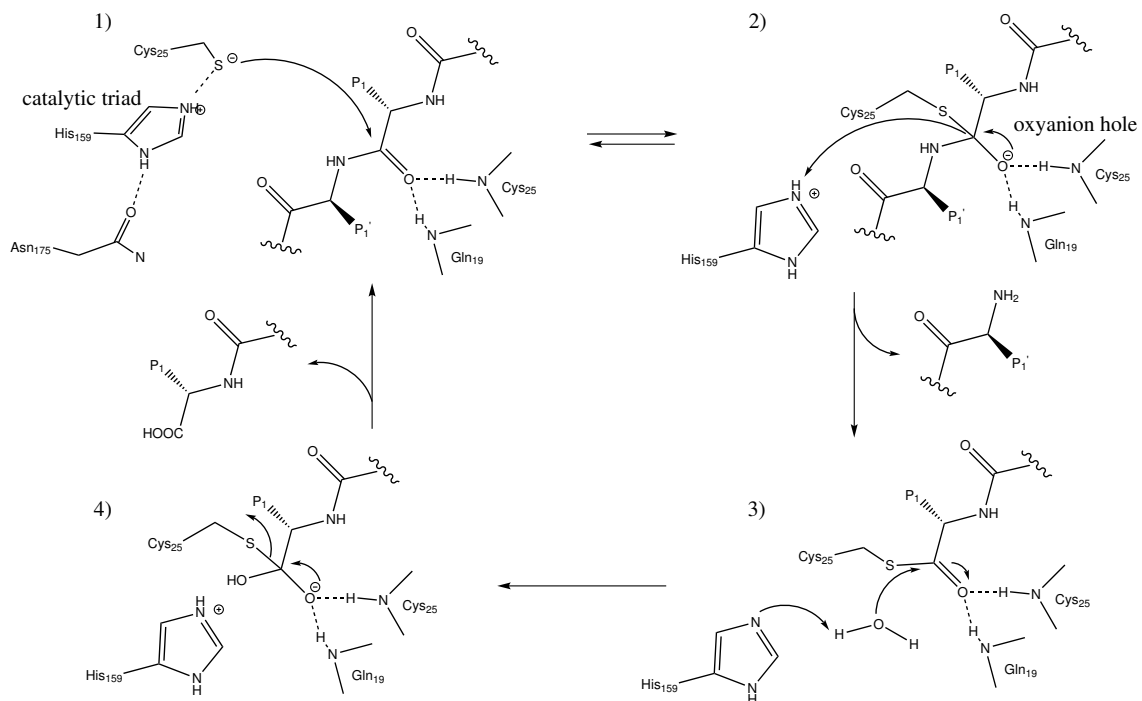


Abbildung 2.8: Molekularer Ablauf des katalytischen Mechanismus der Proteolyse der Cysteinprotease der Papain-Familie. Nummerierung der katalytischen Aminosäurereste entspricht der Protease Papain.

2.3 Mechanistische Routen der Inhibitoren für die Enzyme GMII und Rhodessin

2.3.1 Kovalente reversible Inhibitoren für die Glycosylhydrolasen

Die Inhibitoren der Glykosylhydrolasen können wie für alle anderen Targets in die nicht-kovalent wirkende und in die kovalent wirkende Inhibitoren eingeteilt werden. Der Einsatz der Ersten wurde bereits erwähnt und gehört nicht in den Fokus der vorliegenden Studie. Kovalent bindende Inhibitoren wurden bisher vorwiegend für retendierende und weniger für invertierende Glykosidasen entwickelt. Zum größten Teil werden aber die β -Glykosidasen inhibiert, sodass es insbesondere für α -Glykosidasen nur wenige kovalente Inhibitoren gibt.^[90] Man muss zwischen den irreversiblen Inhibitoren (Inaktivatoren)^[110] und solchen, deren kovalente Bindung zum Enzym sehr langsam wieder hydrolysiert werden kann, unterscheiden. Diese Inhibitoren werden *alternate-substrate*-Inhibitoren genannt. Obwohl diese mechanistisch betrachtet kovalent-reversibel wirken, werden sie vom Enzym letztlich umgesetzt und verbraucht, sodass höhere Konzentrationen notwendig sind. In die Gruppe der Inaktivatoren fallen photoreaktive *affinity labels* wie Diazirin-Derivate oder Arylazide, sowie Triazene und Diazomethylketone, die aufgrund ihrer inherenten chemischen Reaktivität mit nucleophilen Aminosäuren der Glykosidasen reagieren. Mechanismus-basierte Inhibitoren sind chemisch inert und werden erst durch die katalytische Maschinerie des Enzyms aktiviert. Diese wiederum können danach unterschieden werden, ob sie durch Hydrolyse ein chemisch reaktives Aglycon generieren oder, aktiviert durch Protonierung, den nukleophilen Aminosäurerest des aktiven Zentrums kovalent modifizieren. Zu letzteren gehören Epoxid- und Aziridin-Derivate von Kohlenhydraten, wie z.B. Conduritol B Epoxid (CBE; 1,2-Anhydro-myo-inositol) und der verwandte Naturwirkstoff Cyclophellitol. Neben diesen Epoxiden spielen Fluor-Derivate von Kohlenhydraten als kovalente Inhibitoren eine Rolle.^{[111][112][113]} Die Reversibilität der Hemmung ergibt sich bei diesen Fluor-Derivaten und genau so wie bei den oben genannten Epoxid-basierten Inhibitoren durch die Hydrolyse des kovalenten Enzym-Inhibitor-Intermediates. Die Abspaltung von Fluorid (bzw. die Ringöffnung des Epoxids) selbst ist jedoch irreversibel. Da nach der Hydrolyse des Intermediats Hydroxy-Derivate vorliegen, die selbst keine Hemmung mehr aufweisen, werden diese Inhibitoren ähnlich den *alternate-substrate*-Inhibitoren verbraucht, sodass aufgrund des Konzentrationsgradienten eine konstante Zufuhr des Inhibitors notwendig ist.

Die Kopfgruppe eines kovalent-reversiblen Inhibitors sollte Hin- und Rückreak-

tion ermöglichen und bereits eine möglichst hohe Affinität zum Target-Enzym besitzen. Die im folgenden Kapitel behandelten reaktiven Kopfgruppen der Inhibitoren der Mannosidase GM II stellen bicyclische Moleküle acetalartiger Natur dar, die mit den geeigneten Seitenketten, z.B. mittels molekularer Docking Methoden, zu den vollständigen Inhibitoren weiterhin verbessert werden können. Somit können diese Gerüste als Leitstrukturen (engl. *lead structures* der Inhibitoren der Mannosidase GM II betrachtet werden. Das bicyclische Acetal β -L-Anhydrogulose (Abbildung 2.9) stellt in der vorliegenden Arbeit die erste Leitstruktur zum reversiblen Inhibitor der Mannosidase GM II dar und wird im Folgenden als O,O-Acetal bezeichnet.¹ Eine verbesserte Modifikation der Leitstruktur wird im Folgenden als N,O-Acetal, entsprechend der Substitution des Sauerstoffatoms O_6 durch ein Stickstoffatom (Abbildung 2.9), genannt und im Zusammenhang mit der Inhibition der Mannosidase GM II diskutiert.

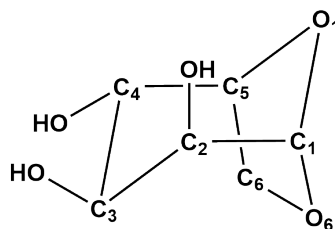


Abbildung 2.9: 2D-molekulare Darstellung des Liganden β -L-Anhydrogulose (O,O-Acetal) in der Sessel-Konformation.

Vorgeschlagener Mechanismus der Inhibitionsreaktion der Mannosidase GM II durch die Leitstruktur β -L-Anhydrogulose

Der Reaktionsmechanismus der kompetitiven kovalent-reversiblen Hemmung wurde ausgehend vom retendierenden Typ der Hydrolyse an Substraten abgeleitet. Hierbei ist die katalytische Maschinerie der Mannosidasen involviert, nämlich zwei katalytische Aminosäurereste (Säure-Base/Nukleophil-Paar) und ein assistierendes Wassermolekül. Der Mechanismus beginnt mit dem nukleophilen Angriff der katalytischen Base Carboxylat (Aspartat-Rest in der deprotonierten Form) auf das anomere Kohlenstoffatom des Inhibitors. Der zweite saure Aminosäurerest (Aspartat-Rest in der protonierten Form) protoniert die Abgangsgruppe OR (O_6 -Atom in der Abbildung 2.10) und initiiert die Ringöffnung durch den Bindungsbruch C_1-O_6 . Die Hypothese lautet, dass der Angriff des protonierten Aminosäurerests Wasser-vermittelt (ein oder mehrere Wassermoleküle) verläuft. Der Mechanismus kann wie folgt skizziert werden (Abbildung 2.10):

¹Anhydrogulose entspricht einem Monosaccharid-Molekül Gulose, in welchem nach der Dehydrierung ein Ringschluss folgt.

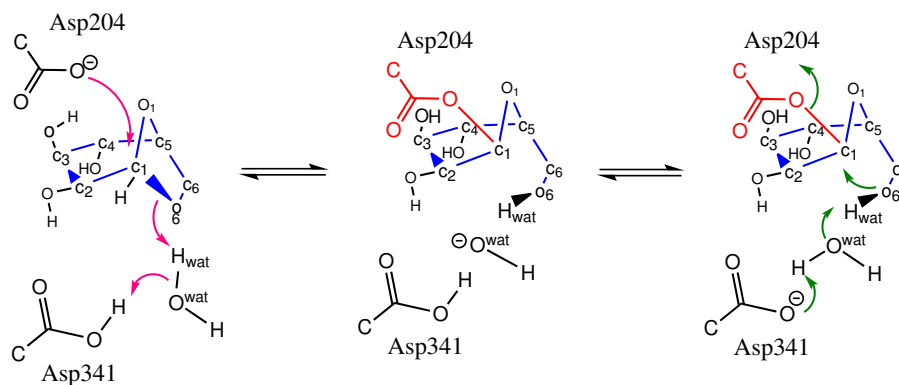


Abbildung 2.10: *Reaktionsmechanismus der Inhibition der Mannosidase GM II durch die Leitstruktur β -L-Anhydroglucose.*

Der Übergangszustand der Inhibitionsreaktion kann anlehnd an die Substratuntersuchungen durch Petersen *et al.*^[94] als Oxocarbenium-Ion-artige Geometrie angenommen werden (Abbildung 2.11). Die Berechnungen von Wannier-Orbitalen der Geometrie vom Übergangszustand des Substrats zeigten die partielle Ausbildung einer Doppelbindung C_1-O_1 . Demnach ist der Übergangszustand zu kurzlebig um experimentell nachgewiesen zu werden.

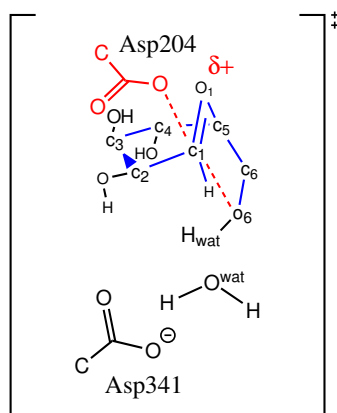


Abbildung 2.11: *Der Oxocarbenium-Ion-artige Übergangszustand.*

Im folgenden Teil der Arbeit werden die Berechnungen des Reaktionsmechanismus der Leitstruktur mit der aktiven Tasche der GM II vorgestellt, welche die Möglichkeit und die Eignung der reaktiven Kopfgruppe als potentieller Inhibitor von GM II evaluieren. Als erstes werden die Ergebnisse der Vorarbeiten gezeigt, die auf die geometrischen Eigenschaften der Leitstruktur im aktiven Zentrum der GM II (Abbildung 4.1) näher eingehen.

Der Hauptziel war die Entwicklung von Verbindungen der gemischten bicyclischen Acetale (des X,Y-Acetal-Typs, Abbildung 4.5) die kovalent, aber gleichzeitig reversibel eine chemische Reaktion mit der Bindungstasche der Mannosidase GM II ohne Abspaltungsprodukte eingehen. In diesem Fall würde kein Konzentrati-

onsgradient entstehen. Die Reversibilität der Inhibition begründet sich durch die ablaufende Hin- und Rückreaktion im aktiven Zentrum (Abbildung 2.10).

Die kovalent-reversiblen Inhibitoren wurden im Rahmen des in-house Protokolls (Abbildung 1.6) mit Hilfe der QM-Methode in Lösung (Schritt I: Screening nach der Reaktionsenergie möglicher X,Y-Acetale mit variablen X und Y) als auch der QM/MM-Methode im Enzym (Schritt II: QM/MM-Berechnungen im Enzym) für die ausgewählten geeigneten Kandidaten untersucht. Die Ergebnisse der hier aufgeführten erfolgreichen QM/MM-Berechnungen enthalten die Beschreibung der Optimierung der Umgebung der berechneten Reaktion (inklusive das Netzwerk der Wassermoleküle) mittels Serien von MD-Simulationen, als auch den Ansatz für die Berechnung der Reaktionspfade der bicyclischen Acetal-Inhibitoren im Enzym GM II mittels QM/MM-Berechnungen nach CI^[15]-NEB^{[12][14]}-Dimer^[24]-Methode.

2.3.2 Reversible Vinylsulfon-Inhibitoren für die Cysteinprotease Rhodensain

Cysteinproteasen gehören zu einem wichtigen Target im Bereich des Wirkstoffdesigns. Die Ursprünge der Entwicklungen der Inhibitoren für Cysteinproteasen gehen zurück auf die Forschungsaktivitäten durch Hanzlik^[114], Liu^[107] und später durch Palmer und Rasnick^{[115][116]}. In diesen Arbeiten wurden die ersten Peptidomimetika für die Inhibition des Papain vorgestellt. Diese Inhibitoren stellen niedermolekulare chemische Verbindungen dar, in denen die Michael-Akzeptor- und Vinylsulfon-(VS)-Kopfgruppen an den Peptidketten verankert sind. Durch die Untersuchungen mittels *Molekular-Modelling*-Methoden durch Rasnick und seine Mitarbeiter wurde gezeigt, dass eine Wasserstoffbrückenbindung (H-Bindung) zwischen dem Wasserstoffatom des katalytischen His-Aminosäurerestes in dem protonierten Zustand und einem der Sauerstoffatome der VS-Kopfgruppe charakteristisch ist. Laut Rasnick kann diese H-Bindung den Vinylsulfon-Rest so polarisieren, dass an dem β -VS-Kohlenstoff eine positive Partialladung entsteht, was den nukleophilen Angriff des deprotonierten Cysteinrests an dieses Kohlenstoffatom fördert (Abbildung 2.12). Die Ineffizienz der peptidomimetischen Vinylsulfone gegenüber der Serinproteasen erklärte er durch den neutralen Zustand des Serin-Histidin-Paares im aktiven Zentrum. Diese Arbeit betont, dass die Cysteinproteasen bei den niedrigeren pH-Werten (4,5-6,6) ihre Aktivität zeigen, wobei der katalytische Histidin-Aminosäurerest in seiner protonierten Form vorliegt. Demnach wird das zwitterionische Paar Cys25-His162 oft als die katalytische Maschinerie der Cysteinproteasen bezeichnet.^[115] Die peptidomimetischen Vinylsulfone (VS) reagieren nicht mit den katalytischen Resten der Serin-, Metallo- und Aspartylproteasen. Diese sind nur gegenüber der katalytischen Maschinerie der Cysteinproteasen aktiv, aber inaktiv gegenüber nicht-katalytischen Cysteinresten

und gegenüber dem Cys-Aminosäurerest des natürlichen Antioxidans Glutathion.^[115]

Die Doppelbindung der VS-Kopfgruppen ist deutlich weniger reaktiv als die Doppelbindungen der Ester-, Vinylketon-, oder Fluoromethylketongruppen. Fluoromethylketongruppen^{[117][118]} nehmen z.B. einen anerkannten Platz in der Chemotherapie^{[119][120]} ein. Hierbei wurde der erste Einsatz des K11777 Moleküls (N-Methyl-Piperazyl-Phenylalanyl-Homophenylalanyl-(Phenyl)-Vinylsulfon) in einer Maus, die mit der Chaga-Krankheit infiziert war, als weniger toxisch beschrieben. Der peptidomimetische Vinylsulfon-(VS)-Inhibitor K1 1777^[4] ist ein selektiver kovalenter irreversibler Inhibitor des Enzyms Rhodesein und zeigt eine Hemmung im mittleren nanomolaren Bereich.

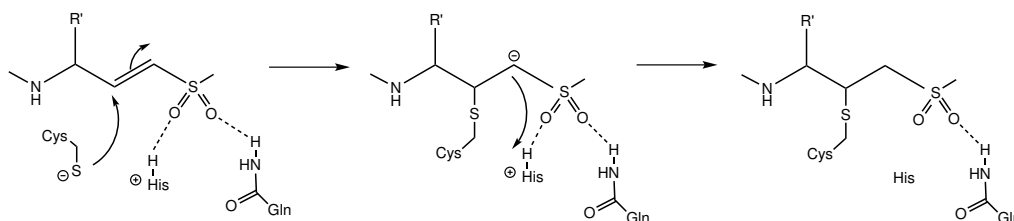


Abbildung 2.12: Charakteristiken der Enzym-Inhibitor-Wechselwirkungen erläutert durch Rasnick et al^[116]: Irreversible Additionsreaktion der Cysteineproteasen an der Doppelbindung des VS-Inhibitors.

Durch Rasnick wurde zudem die erste Vermutung zu der irreversiblen Hemmung auf der mechanistischen Basis vorgeschlagen. Demnach soll die Deprotonierung des Additionsproduktes durch den His-Aminosäurerest aufgrund der großen Differenz des pK_a -Wertes unmöglich sein, sodass die Rückreaktion (Freisetzung des Enzyms) somit blockiert wird. Der postulierte Mechanismus beginnt mit der Addition des Thiolat-Ions des katalytischen Cysteins an die Doppelbindung der VS-Kopfgruppe des Inhibitors, bei der sich das anionische Intermediat (Abbildung 2.13) bildet. Der protonierte His162-Aminosäurerest gibt sein Proton an das Intermediat im zweiten Schritt ab.^[115]

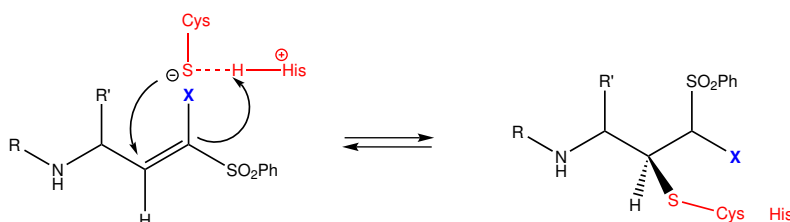


Abbildung 2.13: Schematische Darstellung der reversiblen Additionsreaktion durch das Einführen eines elektronenziehenden Substituenten ($X=CN, Hal$) in die α -Stellung des VS-Inhibitors.

Ziel dieses Teils der Arbeit war es, anhand der bereits verfügbaren QM-Berechnungen in der Arbeitsgruppe Prof. Bernd Engels^[51] und der frei zugänglichen Kristallstruktur des irreversiblen VS-Inhibitors K1 1777 im Komplex mit Rhodesain (PDB-ID:2P7U^[4]) die neuen QM- (als Screening oder Stufe I des in-house Protokolls) und die QM/MM-Berechnungen (als Enzym-Berechnungen in den Stufen II und IV des in-house Protokolls, Abbildung 1.6) zu den potentiellen kovalent-reversiblen VS-Inhibitoren des Enzyms Rhodesain durchzuführen (Abbildung 2.13). Dies beinhaltet die Berechnungen der Reaktionsprofile der Inhibitionsreaktion und somit die Aufklärung des reversiblen Verhaltens der neuen Inhibitoren.^[5]

Das Arbeitsgebiet *Molecular Modelling* hat sich bereits in 90-er Jahren des letzten Jahrhunderts etabliert. Seitdem nimmt es aufgrund immer steigender Rechengeschwindigkeit moderner Prozessoren sowie Grafikleistungen einen rasanten Aufschwung. Man versteht darunter die Berechnung, Darstellung und Analyse von realistischen, dreidimensionalen Molekülstrukturen und ihren physikochemischen Eigenschaften^[30]. Der Bereich der *Computational Chemistry*, in deren Fokus Berechnungen zu chemischen Fragestellungen stehen, begann seine rasante Entwicklung bereits Ende der 70-er Jahre des letzten Jahrhunderts^[121]. Dabei konnten zunächst nur die physikochemischen Eigenschaften von sehr kleinen Molekülen mit hoher Präzision vorhergesagt werden.^[122] Für große Protein-Ligand-Systeme wurden Verfahren entwickelt, die den interessierenden Bereich, z.B. die Bindestelle oder das katalytische Reaktionszentrum, quantenmechanisch behandeln. Die Umgebung wird dagegen klassisch mittels Kraftfeldverfahren approximiert und an das Reaktionszentrum gekoppelt. Diese hybriden QM/MM^{[11][10]}-Methoden erreichten im 21. Jahrhundert eine besondere Anerkennung in Form des Nobelpreises für Chemie (2013).^{[122][123]}

Computergestützte Methoden (auch Computermethoden^[30]), die in der vorliegenden Arbeit eingesetzt wurden, um Inhibitionsmechanismen in biochemischen Systemen zu verstehen, werden im folgenden Unterabschnitt vorgestellt.

3.1 Born-Oppenheimer-Näherung

In quantenmechanischen Ansätzen^{[121][122][124]} wird die elektronische Struktur von Molekülen, z.B. Molekülstruktur inklusive Hybridisierung, Elektronendichteverteilung sowie molekulare Eigenschaften, berechnet. Wenn die Grundzustandseigenschaften im Vordergrund stehen, wird die Lösung der zeitunabhängigen Schrödingergleichung (SGL) (Gleichung 3.1) verwendet, um insbesondere die Gesamtenergie eines Moleküls E , den niedrigsten Eigenwert des Gesamt-Hamiltonians \widehat{H} , zu bestimmen.

$$\widehat{H}\Psi = E\Psi \quad \text{3.1}$$

Moleküle und Festkörper werden quantenmechanisch durch Vielteilchenwellenfunktionen für Kerne und Elektronen beschrieben:

$$\begin{aligned} \psi_{el} &= \psi(x_1, \dots, x_n; X_1, \dots, X_N) \\ x_i &= (\hat{r}_i, s_i), \\ X_j &= (\hat{R}_j, S_j) \end{aligned} \quad \text{3.2}$$

Dabei bezeichnen \hat{r}_i und s_i mögliche Positionen und Spinquantenzahlen für die Elektronen, R_I und S_I entsprechend für die Kerne: Die Gesamtheit dieser Wellenfunktionen bilden einen Hilbertraum. Tatsächlich benötigt wird nur der Unterraum der Wellenfunktionen, die symmetrisch/antisymmetrisch gegen Austausch ununterscheidbarer Teilchen mit ganzzahligem/halbzahligem Spin sind.

Für den Gesamt-Hamiltonian, welcher ein hermitescher Operator ist, müssen die Lösungen, die in der Form von Wellenfunktionen ϕ gegeben sind, orthogonal und normiert sein (orthonormal). Diese Randbedingung für die Wellenfunktionen wird durch das Kronecker-Delta δ_{ij} -Symbol beschrieben.

$$\begin{aligned} \int \phi_i^* \hat{H} \phi_j dr &= \int \phi_j \hat{H}^* \phi_i^* dr \\ \int \phi_i^* \phi_j dr &= \int \phi_j \phi_i^* dr = \delta_{ij} \end{aligned} \quad \mathbf{3.3}$$

$$\begin{aligned} \delta_{ij} &= 1, i = j \\ \delta_{ij} &= 0, i \neq j \end{aligned}$$

Der Gesamt-Hamiltonian \hat{H} (nicht-relativistisch) besteht aus den Operatoren der kinetischen Energie der Kerne \hat{T}_N und der Elektronen \hat{T}_n , sowie den Operatoren der potentiellen Energie der Kern-Elektron-Anziehung \hat{V}_{Nn} , die Elektron-Elektron- \hat{V}_{nn} sowie die Kern-Kern-Abstoßung \hat{V}_{NN} (Gleichung 3.4). Für ein Molekül aus n Elektronen (Summe über die kleinen Indizes i, j) und N Atomkernen (Summe über die großen Indizes I, J) lässt sich der Gesamt-Hamiltonian in atomaren Einheiten schreiben als Gleichung 3.4.

$$\hat{H} = \underbrace{-\sum_{I=1}^N \frac{\nabla_I^2}{2M_I}}_{\hat{T}_N} - \underbrace{\sum_{i=1}^n \frac{\nabla_i^2}{2}}_{\hat{T}_n} - \underbrace{\sum_{I=1}^N \sum_{i=1}^{n-1} \frac{Z_I}{r_{Ii}}}_{\hat{V}_{Nn}} + \underbrace{\sum_{i=1}^n \sum_{j>i}^n \frac{1}{r_{ij}}}_{\hat{V}_{nn}} + \underbrace{\sum_{I=1}^N \sum_{J>I}^N \frac{Z_I Z_J}{R_{IJ}}}_{\hat{V}_{NN}} \quad \mathbf{3.4}$$

Dabei ist M_I das Verhältnis zwischen Kernmasse des Atoms I und der Masse eines Elektrons, Z_I ist die Ordnungszahl des Atoms I und r_{ij} der Abstand zwischen den Elektronen i und j . Die Operatoren für die kinetische Energie aller Teilchen, sowie der Elektronen als auch der Atomkerne, enthalten den Operator ∇^2 für die zweite Ableitung nach allen Raumkoordinaten des jeweiligen Teilchens:

$$\begin{aligned} \nabla_E^2 &= \left(\frac{\partial^2}{\partial x_E^2} + \frac{\partial^2}{\partial y_E^2} + \frac{\partial^2}{\partial z_E^2} \right) \\ \nabla_A^2 &= \left(\frac{\partial^2}{\partial X_A^2} + \frac{\partial^2}{\partial Y_A^2} + \frac{\partial^2}{\partial Z_A^2} \right) \end{aligned} \quad \mathbf{3.5}$$

Die Gesamt-SGL wird im Rahmen der Born-Oppenheimer-(BO)-Näherung auf das elektronische Problem reduziert. In der Beschreibung des Gesamt-Hamiltonians

wird der elektronische Hamiltonian \widehat{H}_{el} , der die Bewegung der Elektronen beschreibt, zunächst ohne Näherungen eingeführt (Gleichung 3.6, Gleichung 3.8). Durch die Transformation zum Massenzentrum des Moleküls wird die Form des Gesamt-Hamiltonians durch den Operator \widehat{H}_{mp} , der die Massenspolarisationseffekt berücksichtigt (Gleichung 3.7, M ist die Gesamtmasse der Atomkerne), ergänzt.^[121] Der Operator \widehat{H}_{el} hängt von den Kernpositionen durch die Operatoren \widehat{V}_{Nn} und \widehat{V}_{NN} ab. Die elektronischen Eigenfunktionen ψ_{el} (Gleichung 3.8) sind die Funktionen der Elektronenkoordinaten $r = (x, y, z)$ und auch die Funktionen der beliebigen Werten der Kernkoordinaten $R = (X, Y, Z)$.

$$\widehat{H} = \widehat{T}_N + \widehat{H}_{el} + \widehat{H}_{mp} \quad 3.6$$

$$\widehat{H}_{mp} = -\frac{1}{2M} \left(\sum_i^n \nabla_i^2 \right) \quad 3.7$$

$$\begin{aligned} \widehat{H}_{el} &= \widehat{T}_n + \widehat{V}_{nn} + \widehat{V}_{Nn} + \widehat{V}_{NN} \\ \psi_{el} &= \psi(r_1, \dots, r_n; R_1, \dots, R_N) \end{aligned} \quad 3.8$$

Das elektronische Problem ist exakt lösbar unter Annahme, dass für jeden Wert der Kernkoordinate ein kompletter Satz elektronischer Schrödingergleichungen aufgestellt werden kann (adiabatische Separationsannahme, Gleichung 3.9):

$$\widehat{H}_{el}(R)\psi_i(r, R) = E_{el}^i(R)\psi_i(r, R), i = 1, 2, \dots, \infty \quad 3.9$$

Die exakte Gesamt-Wellenfunktion $\Psi(R, r)$ kann in eine orthonormale Basis, z.B. ein kompletter Satz der elektronischen Wellenfunktionen $\psi_i(R, r)$ mit den Elektronenkoordinaten $r = (x, y, z)$, entwickelt werden, wobei die Entwicklungskoeffizienten $\chi_{N,i}(R)$ Funktionen der Kernkoordinaten sind:

$$\Psi(R, r) = \sum_i^\infty \chi_{N,i}(R)\psi_i(R, r) \quad 3.10$$

Das Einsetzen der Wellenfunktion aus der Gleichung 3.10 in die Gesamt-SGL, resultiert Gleichung 3.1 der Gesamt-SGL in adiabatischer Separationsannahme:

$$\sum_i^\infty \left(\widehat{T}_N + \widehat{H}_{el} + \widehat{H}_{mp} \right) \chi_{N,i}(R)\psi_i(R, r) = E \sum_i^\infty \chi_{N,i}(R)\psi_i(R, r) \quad 3.11$$

$$\sum_i^{\infty} \left(- \sum_{I=1}^N \frac{1}{2M_I} \nabla_I^2 + \widehat{H}_{el} + \widehat{H}_{mp} \right) \chi_{N,i}(R) \psi_i(R, r) = E \sum_i^{\infty} \chi_{N,i}(R) \psi_i(R, r)$$

$$\sum_i^{\infty} \left(\nabla_N^2 + \widehat{H}_{el} + \widehat{H}_{mp} \right) \chi_{N,i}(R) \psi_i(R, r) = E \sum_i^{\infty} \chi_{N,i}(R) \psi_i(R, r) \quad \mathbf{3.12}$$

$$\sum_i^{\infty} \left\{ \begin{array}{l} \nabla_N^2 \chi_{N,i}(R) \psi_i(R, r) + \\ \widehat{H}_{el} \chi_{N,i}(R) \psi_i(R, r) + \widehat{H}_{mp} \chi_{N,i}(R) \psi_i(R, r) \end{array} \right\} = E \sum_i^{\infty} \chi_{N,i}(R) \psi_i(R, r)$$

Unter Berücksichtigung der Wirkung des Operators der kinetischen Energie der Kerne (∇_N^2) auf das Produkt der Wellenfunktionen $\chi_{N,i}(R) \psi_i(R, r)$, sowie des Operators \widehat{H}_{el} auf seine exakten Lösungen $\psi_i(R, r)$, ergibt sich die folgende Ableitung zur Gesamt-SGL:

$$\sum_i^{\infty} \left\{ \begin{array}{l} \psi_i(R, r) (\nabla_N^2 \chi_{N,i}(R)) + 2(\nabla_N \chi_{N,i}(R)) (\nabla_N \psi_i(R, r)) + \chi_{N,i}(R) (\nabla_N^2 \psi_i(R, r)) + \\ \chi_{N,i}(R) E_i \psi_i(R, r) + \chi_{N,i}(R) \widehat{H}_{mp} \psi_i(R, r) \end{array} \right\} =$$

$$= E \sum_i^{\infty} \chi_{N,i}(R) \psi_i(R, r) \quad \mathbf{3.13}$$

Aufgrund der Orthonormalität der Basis der elektronischen Wellenfunktionen kann mit $\psi_i^*(R, r)$ von links multipliziert werden. Nach Integration über alle Elektronenkoordinaten resultiert die Gleichung 3.14, in der drei Terme (Integrale) für die Kopplungen der verschiedenen elektronischen Zustände verantwortlich sind: Dies sind die nicht-adiabatischen Kopplungsterme erster und zweiter Ordnung sowie die Massenspolarisation.

$$\nabla_N^2 \chi_j(R) + E_j \chi_j(R) + \sum_i^{\infty} \left\{ \begin{array}{l} 2 \langle \psi_j(R, r) | \nabla_N | \psi_i(R, r) \rangle (\nabla_N \chi_{N,i}(R)) + \\ \langle \psi_j(R, r) | \nabla_N^2 | \psi_i(R, r) \rangle \chi_{N,i}(R) + \\ \langle \psi_j(R, r) | \widehat{H}_{mp} | \psi_i(R, r) \rangle \chi_{N,i}(R) \end{array} \right\} = E \chi_{N,j}(R) \quad \mathbf{3.14}$$

Bei der Untersuchung der photochemischen Reaktionen in Molekülen müssen die beteiligten elektronischen Zustände berücksichtigt werden (nicht-adiabatisches Bild). In der adiabatischen Näherung werden die nicht-adiabatischen Kopplungselemente mit $j \neq i$ vernachlässigt. Die diagonalen nicht-adiabatischen Kopplungselemente erster Ordnung sind gleich Null, es sei denn sie sind räumlich entartete Wellenfunktionen. Bei dieser Näherung wird nur ein elektronischer Zustand oder eine elektronische Potentialfläche für die gesamte Wellenfunktion berücksichtigt.

$$\left(\widehat{T}_N + E_j(R) + \langle \psi_j(R, r) | \nabla_N^2 | \psi_j(R, r) \rangle + \langle \psi_j(R, r) | \widehat{H}_{mp} | \psi_j(R, r) \rangle \right) \chi_{N,i}(R) = E \chi_{N,j}(R) \quad \mathbf{3.15}$$

Nach Vernachlässigung der Massenspolarisation nimmt die SGL die folgende Form an:

$$\left(\widehat{T}_N + E_j(R) + \langle \psi_j(R, r) | \nabla_N^2 | \psi_j(R, r) \rangle\right) \chi_{N,i}(R) = E \chi_{N,j}(R) \quad 3.16$$

In der Born-Oppenheimer-Näherung wird der Term der diagonalen Korrektur $U(R) = \langle \psi_j(R, r) | \nabla_N^2 | \psi_j(R, r) \rangle$ vernachlässigt und die resultierende Gleichung nimmt die übliche Form der SGL an, wobei die elektronische Energie die Rolle der potentiellen Energie spielt:

$$\left(\widehat{T}_N + E_j(\widehat{R})\right) \chi_{N,i}(\widehat{R}) = E \chi_j(\widehat{R}) \quad 3.17$$

Lösung der Gleichung 3.17 für die Kernwellenfunktionen führt zu den Energieniveaus der molekularen Rotation und Vibration und somit zu den Eigenschaften der molekularen Spektroskopie.

Im Bild der BO-Näherung bewegen sich die Atomkerne eines Moleküls auf einer Potentialfläche, welche aus der elektronischen SGL (Gleichung 3.19) resultiert. Die Vernachlässigung der diagonalen Korrektur lässt sich durch die relativ kleinen Beiträge zu der Form der resultierenden Potentialfläche begründen: Das Verhältnis zwischen den Größen der diagonalen Korrektur und der elektronischen Energie $E_j(R)$ ist vergleichbar einem Faktor der Massen von einem Elektron und einem Kern. In der B-O-Näherung (Vernachlässigung der diagonalen Korrektur und der Massenspolarisation) wird zudem kein Unterschied zwischen den Kernmassen berücksichtigt. In der adiabatischen (oder auch B-O-Näherung) Näherung werden die Kerne und die Elektronen als gekoppelte Subsysteme betrachtet und das Elektronenproblem wird für feste Kernpositionen gelöst:

$$\Psi = \Psi_{el}(x_1, \dots, x_n; \bar{R}_1, \dots, \bar{R}_N) \bullet \Theta(R_1, \dots, R_N) \quad 3.18$$

$$\begin{aligned} \left[- \sum_{A=1}^N \frac{1}{2M_A} \nabla_A^2 + E_{el} \right] \Theta(R_1, \dots, R_N) \bullet \Psi_{el}(x_1, \dots, x_n; \bar{R}_1, \dots, \bar{R}_N) \\ = E_{Gesamt} \Theta(R_1, \dots, R_N) \bullet \Psi_{el}(x_1, \dots, x_n; \bar{R}_1, \dots, \bar{R}_N) \end{aligned} \quad 3.19$$

Trotz der BO-Näherung ist eine geschlossene Lösung der elektronischen SGL nur für einige Modellsysteme, z.B. Wasserstoffatom möglich. Für Mehrelektronensysteme ist man dagegen grundsätzlich auf Näherungen angewiesen, denn es bleibt nach wie vor ein Problem vieler wechselwirkender Elektronen in einem gegebenen äußeren Potential zu lösen. Dies geschieht mit Hilfe einer zweiten Näherung, die mit Hilfe eines effektiven Einteilchenpotentials ein Vielteilchenproblem als ein Einteilchenproblem betrachten lässt: Das Hartree-Fock-Verfahren. Etwas umfor-

multiert bekommt der elektronische Hamilton-Operator eine vereinfachte Form:

$$\widehat{H}_{el} = - \sum_i^n \widehat{h}_i + \sum_{i,j>i} \widehat{g}_{ij} + \widehat{V}_{NN} \quad \mathbf{3.20}$$

$$\text{mit } \widehat{h}_i = \frac{1}{2} \nabla^2 - \sum_A^N \frac{Z_A}{|r_i - R_A|}$$

Im Rahmen aller Näherungen stellt man die Wellenfunktion als ein Produkt aus Einteilchenfunktionen (Molekülorbitale \equiv MO) dar. Die aufgrund des Pauli-Prinzips notwendige Antisymmetrisierung erreicht man durch die Darstellung als Slaterdeterminante (Gleichung 3.21). Da die Atomorbitale den Spin des Elektrons berücksichtigen müssen, werden diese als Spinorbitale χ_i in die Slaterdeterminante geschrieben (Gleichung 3.22). Diese setzen sich zusammen aus einer Ortsfunktion $\varphi_k(r_1)$ und einer Spinfunktion α bzw., β zusammen.

$$\Phi_{el}(x_1, \dots, x_n) = \frac{1}{\sqrt{n!}} \begin{vmatrix} \chi_i(x_1) & \chi_j(x_1) & \dots & \chi_h(x_1) \\ \chi_i(x_2) & \chi_j(x_2) & \dots & \chi_h(x_2) \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \chi_i(x_n) & \chi_j(x_n) & \dots & \chi_h(x_n) \end{vmatrix} \quad \mathbf{3.21}$$

$$\chi(x_1) = \varphi_k(r_1) \bullet \begin{cases} \alpha(1) & m_s = 1/2 \\ \beta(1) & m_s = -1/2 \end{cases} \quad \mathbf{3.22}$$

Die Gesamtenergie einer Slaterdeterminante (Gleichung 3.23) lässt sich mit Hilfe der Permutationsoperatoren herleiten, auf die nicht näher eingegangen wird.^[121] Stattdessen werden die Verfahren betrachtet, die zu dem Erwartungswert der Energie eines Vielteilchensystems führen.

$$E_{Gesamt} = \sum_i^n h_i + \frac{1}{2} \sum_{ij}^n (J_{ij} - K_{ij}) + V_{NN} \quad \mathbf{3.23}$$

3.2 Hartree-Fock

3.2.1 Fock-Gleichungen

Zu einem ersten relevanten Verfahren gelangt man, wenn man im Rahmen einer Eindeterminantennäherung den Erwartungswert der Energie des elektronischen Hamiltonians minimiert (Gleichung 3.24).

$$\frac{\partial}{\partial \chi_i} \langle \Phi_{el} | \widehat{H}_{el} | \Phi_{el} \rangle = 0 \quad \mathbf{3.24}$$

Die HF-Orbitale müssen die Randbedingungen der orthonormierten Funktionen (orthogonal und normiert) erfüllen (Gleichung 3.25).

$$\langle \chi_i | \chi_j \rangle = \delta_{ij} \begin{cases} \langle a | a \rangle = \langle \beta | \beta \rangle = 1 \\ \langle a | \beta \rangle = \langle \beta | a \rangle = 0 \end{cases} \quad \text{3.25}$$

Nach der Erstellung der orthonormalen Basis, die im nächsten Unterabschnitt näher gezeigt wird, erhält man ein System gekoppelter Integro-Differential-Gleichungen, die Fock-Gleichungen (Gleichung 3.26), deren Lösung die optimalen Molekülorbitale χ_i mit den Orbitalenergien ϵ_i liefert.

$$f(1)\chi_i(1) = \epsilon_i\chi_i(1) \quad \text{3.26}$$

Fock-Operator $f(1)$ ist ein effektiver Einelektronen-Operator. In den Fock-Gleichungen werden Einelektronen- und Zweielektronen-Terme, (Gleichung 3.27) aufgestellt.

$$\begin{aligned} \widehat{F}_i \equiv f(1) &= \widehat{h}_i + \sum_{j>i}^n (\widehat{J}_j - \widehat{K}_j) \\ &= \widehat{h}(1) + \sum_{j>i}^n (\widehat{J}_j - \widehat{K}_j) \\ &= \widehat{h}(1) + V_{HF}(1) \end{aligned} \quad \text{3.27}$$

Die ersten sind durch den Einelektronen-Operator \widehat{h}_i bestimmt (Gleichung 3.20). Zwei-Elektronen-Terme V_{HF} beschreiben die Wechselwirkungen zwischen Elektron 1 im Orbital ϕ_i und dem Elektron 2 im Orbital χ_j und werden mittels Coulomb- und Austausch-Integralen berechnet (Gleichungen 3.28-3.31).

Analysiert man die Fock-Gleichung, so erkennt man, dass die Elektronen im Rahmen dieser Eindeterminantennäherung nicht explizit miteinander wechselwirken. Vielmehr spürt im Rahmen dieser Näherung jedes Elektron nur das gemittelte Feld aller anderen Elektronen. Das Coulomb-Integral $\widehat{J}_i(1)$ beschreibt die repulsive Elektron-Elektron-Wechselwirkung als eine Coulomb-Wechselwirkung des Elektrons 2 mit dem gemittelten Potential $J_i(1)$ aller möglichen Koordinaten des Elektrons 1, gewichtet mit der Aufenthaltswahrscheinlichkeit $|\phi_i(1)|^2$, wie in Gleichung 3.29 gezeigt ist.

$$\widehat{J}_i(1)|\chi_j(2)\rangle = \underbrace{\langle \phi_i(1) | \widehat{g}_{12} | \phi_i(1) \rangle}_{\widehat{J}_i(1)} |\chi_j(2)\rangle \quad \text{3.28}$$

$$\sum_{ij>i} \widehat{J}_i(1)\chi_j(2) = \sum_{ij>i} \left[\int \phi_i^*(1) \frac{1}{r_{12}} \phi_i(1) dr_1 \right] \chi_j(2) = \sum_{ij>i} \left[\int \frac{1}{r_{12}} |\phi_i(1)|^2 dr_1 \right] \chi_j(2) \quad \text{3.29}$$

Das Austausch-Integral \widehat{K}_i entsteht durch die Antisymmetrieforderung der Wellenfunktion. Als Operator wirkt \widehat{K}_i auf die Elektronen und tauscht die Label zweier Orbitale, wie in Gleichung 3.30 gezeigt ist. Somit enthält der Fock-Operator die Fermi-Korrelation, welche die Korrelation der Elektronen gleichen Spins beschreibt und den physikalischen Effekt namens das Fermi-Loch berücksichtigt.

$$\widehat{K}_i(1)|\chi_j(2)\rangle = \langle \phi_i(1)|\hat{g}_{12}|\chi_j(1)\rangle \underbrace{|\phi_i(2)\rangle}_{\text{Austausch}} \quad 3.30$$

$$\sum_{ij>i} \widehat{K}_i(1)\chi_j(2) = \sum_{ij>i} \left[\int \phi_i^*(1) \frac{1}{r_{12}} \chi_j(1) dr_1 \right] \phi_i(2) \quad 3.31$$

Unter Verwendung des Fock-Operators minimiert man die Gesamtenergie. Diese kann nicht exakt bestimmt werden, da die Elektron-Elektron-Abstoßung mit Hilfe der Orbital-Näherung beschrieben wird. Die Lösung muss iterativ erfolgen, da man zum Aufstellen der in der Fock-Gleichung auftretenden Coulomb- und Austausch-Operatoren bereits die Form der Orbitale (also die Lösung) kennen muss. Dieser Ansatz heißt Hartree-Fock-(HF)-Verfahren.

3.2.2 Kanonische Form der Lösungen im Rahmen des HF-Verfahrens

Die Optimierung der Orbitale muss aufgrund der Orthogonalität-Randbedingung (zwei Nebenbedingungen, Gleichung 3.25) mittels des Lagrangeschen Multiplikatorverfahrens erfolgen. Man führt die Funktion L ein, die bei sehr kleinen Änderungen der Orbitale stationär verbleibt (Gleichung 3.32), wobei die λ_{ij} Lagrange-Multiplikatoren sind.^[121]

Das Variationsprinzip besagt, dass die optimalen Orbitale die Bedingung $\delta L = 0$ erfüllen:

$$L = E - \sum_{ij} \lambda_{ij} (\langle \phi_i | \phi_j \rangle - \delta_{ij}) \quad 3.32$$

$$\delta L = \delta E - \sum_{ij} \lambda_{ij} (\langle \delta \phi_i | \phi_j \rangle + \langle \phi_i | \delta \phi_j \rangle) = 0$$

Unter Berücksichtigung des Fock-Operators als ein Energieoperator kann die Änderung der Lagrangeschen Funktion δL folgend geschrieben werden:

$$\delta L = \sum_i^n (\langle \delta \phi_i | \widehat{F}_i | \phi_i \rangle + \langle \phi_i | \widehat{F}_i | \delta \phi_i \rangle) - \sum_{ij} \lambda_{ij} (\langle \delta \phi_i | \phi_j \rangle + \langle \phi_i | \delta \phi_j \rangle) = 0 \quad 3.33$$

Verwendet man die komplex-konjugierten Eigenschaften des Fock-Operators und formt man die obige Gleichung so um, dass man zwei komplex-konjugierte Terme erhält (Gleichung 3.34), erkennt man, dass die Bedingung für die Lagrangesche

Funktion $\delta L = 0$ erfüllt werden kann, wenn beiden Terme $\langle \delta\phi |$ - oder $\langle \delta\phi |^*$ Null sind):

$$\delta L = 0 = \underbrace{\sum_i^n \langle \delta\phi_i | \widehat{F}_i | \phi_i \rangle - \sum_{ij}^n \lambda_{ij} \langle \delta\phi_i | \phi_j \rangle}_{\langle \delta\phi |} + \underbrace{\sum_i^n \langle \delta\phi_i | \widehat{F}_i | \phi_i \rangle^* - \sum_{ij}^n \lambda_{ij} \langle \delta\phi_j | \phi_i \rangle^*}_{\langle \delta\phi |^*} \quad \text{3.34}$$

Durch die erneute Anwendung der komplex-konjugierten Eigenschaften der Wellenfunktion für die letzten zwei Terme (d.h. für den $\langle \delta\phi |^*$ -Term in Gleichung 3.34) kann die Gleichung etwas umgeformt werden:

$$\delta L = 0 = \underbrace{\sum_i^n \langle \delta\phi_i | \widehat{F}_i | \phi_i \rangle - \sum_{ij}^n \lambda_{ij} \langle \delta\phi_i | \phi_j \rangle}_1 + \underbrace{\sum_i^n \langle \delta\phi_j | \widehat{F}_j | \phi_j \rangle - \sum_{ij}^n \lambda_{ji}^* \langle \delta\phi_i | \phi_j \rangle}_2 \quad \text{3.35}$$

Durch die Differenzbildung zwischen den beiden Termen (Term 1 und 2 in Gleichung 3.35), kann die Gleichung in der folgenden Form dargestellt werden:

$$\sum_{ij}^n (\lambda_{ij} - \lambda_{ji}^*) \langle \delta\phi_i | \phi_j \rangle = 0 \quad \text{3.36}$$

Die Lagrangesche Multiplikatoren λ_{ij} müssen hermitesch sein, damit die Funktion L reel bleibt: $\lambda_{ij} = \lambda_{ji}^*$. Aus diesem Grund kann der endgültige Satz der Hartee-Fock-Gleichungen wie folgt formuliert werden:

$$\widehat{F}_i \phi_i = \sum_j^n \lambda_{ij} \phi_j \quad \text{3.37}$$

Diese Gleichungen können mittels einer unitären Transformation vereinfacht werden.

$$\phi' = \mathbf{U} \phi \quad \text{3.38}$$

Man erhält einen Satz der *pseudo*-Eigenwertgleichungen:

$$\widehat{F}_i \phi'_i = \epsilon_i \phi'_i \quad \text{3.39}$$

Die kanonischen Molekülorbitale ϕ' sind die optimalen MOs, die Eigenfunktionen des Fock-Operators sind. Diese sind über das ganze Molekül delokalisiert und damit lässt sich die chemische Bindung nicht erklären. Nachdem die kanonischen MOs als die optimalen Molekülorbitale in einem iterativen Verfahren bestimmt wurden (self-consistent field (SCF)-Orbitale), kann ein Satz lokalisierter Molekülorbitale erhalten werden. Dies lässt sich durch die Anwendung von Rotationsmatrizen realisieren. Die lokalisierten Orbitale geben die chemischen

Charakteristiken der Atome in Molekülen richtig wieder, sodass eine Doppelbindung von einer Einfachbindung unterscheidbar wird.

Da die Lagrangeschen Multiplikatoren die Erwartungswerte des Fock-Operators sind, kann man diese als MO-Energien interpretieren (Gleichung 3.40). Dies ist auch anhand der *pseudo*-Eigenwertgleichung ersichtlich: Die kanonischen Molekülorbitale ϕ' sind auch diejenigen Orbitale, die die Matrix der Lagrange-Multiplikatoren diagonalisieren ($\hat{\lambda}_{ii} = \epsilon_i$ und $\hat{\lambda}_{ij} = 0$).

$$\langle \phi'_i | \widehat{F}_i | \phi'_i \rangle = \epsilon_i \langle \phi'_i | \phi'_i \rangle = \epsilon_i \quad 3.40$$

$$\epsilon_i = \langle \phi_i | \widehat{F}_i | \phi_i \rangle = h_i + \sum_j^n (J_{ij} - K_{ij}) \quad 3.41$$

Die Gesamtenergie E_{Gesamt} (Gleichung 3.23) ist nicht einfach die Summe der Orbitalenergien ϵ_i , denn der Gesamt-Hamiltonian entspricht auch nicht der Summe der Fock-Operatoren. Der Fock-Operator \widehat{F}_i ist ein effektiver Einelektronen-Operator, welcher die kinetische Energie eines Elektrons und dessen Anziehung zu allen Kernen $\hat{h}(1) = \hat{h}_i$, als auch die Abstoßung zu allen anderen Elektronen über Coulomb- $\widehat{J}_j(1)$ und Austausch-Operatoren $\widehat{K}_j(1)$ beschreibt (Gleichung 3.27). Da die Elektron-Elektron-Abstoßung mittels des Fock-Operators durch die Summe über alle MOs doppelt berücksichtigt und die Kern-Kern-Abstoßung nicht einbezogen wird (Formel 3.27), muss die Gesamtenergie wie folgt (Gleichung 3.42) korrigiert werden:

$$E_{\text{Gesamt}} = \sum_i^n \epsilon_i - \frac{1}{2} \sum_{ij}^n (J_{ij} - K_{ij}) + V_{\text{NN}} \quad 3.42$$

Im Rahmen des Hartree-Fock-(HF)-Verfahrens kann man die Form der MOs direkt optimieren. Dieser zentrale Ansatz heißt *Linear Combination of Atomic Orbitals* (LCAO). Hier stellt man jedes MO als lineare Kombination von Atomorbitalen (AO) χ_a dar und optimiert nur noch die Koeffizienten c_{ai} .

$$\phi_i = \sum_{a=1}^{\text{AOBasis}} c_{ai} \chi_a(1) \quad 3.43$$

Die Hartree-Fock-Gleichungen können folglich geschrieben werden:

$$\widehat{F}_i(1) \sum_{a=1}^{\text{AOBasis}} c_{ai} \chi_a(1) = \epsilon_i \sum_{a=1}^{\text{AOBasis}} c_{ai} \chi_a(1) \quad 3.44$$

Wird die Fock-Gleichung von links mit $\chi_b^*(1)$ multipliziert und über dr_1 integriert, erhält man die Roothaan-Hall-Gleichungen für closed-shell Systeme ($k \equiv \text{Anzahl}$

von closed-shell AOs in der Basis).

$$\sum_{a=1}^k \int \chi_{\beta}^*(1) \widehat{F}_i(1) c_{ai} \chi_a(1) dr_1 = \epsilon_i \sum_{a=1}^k \int \chi_{\beta}^*(1) \chi_a(1) dr_1 \quad 3.45$$

Sie lassen sich sehr effizient als Matrixgleichungen schreiben und lösen. Die Überlappmatrix $S_{a\beta}$ wird definiert durch:

$$S_{a\beta} = \int \chi_{\beta}^*(1) \chi_a(1) dr_1 = \langle \chi_a | \chi_{\beta} \rangle \quad 3.46$$

Die Fock-Matrix wird ebenso definiert durch:

$$F_{a\beta} = \int \chi_{\beta}^*(1) \widehat{F}_i(1) c_{ai} \chi_a(1) dr_1 = \langle \chi_a | \mathbf{F} | \chi_{\beta} \rangle \quad 3.47$$

Sie lässt sich in den Eielektronenterm mit den Elementen $H_{a\beta}^{core}$ und den Zweielektronenterm mit den Elementen $G_{a\beta}$ aufteilen. Die Koeffizienten lassen sich in Form einer quadratischen Matrix C zusammenfassen:

$$C = \begin{pmatrix} c_{1,1} & c_{1,2} \cdots c_{1,k} \\ c_{2,1} & c_{2,2} \cdots c_{2,k} \\ c_{k,1} & c_{k,2} \cdots c_{k,k} \end{pmatrix} \quad 3.48$$

In der Matrixschreibweise lassen sich die Roothaan-Hall-Gleichungen ebenfalls als eine *pseudo*-Eigenwertgleichung darstellen:

$$\mathbf{FC} = \mathbf{SCE} \quad 3.49$$

Die Matrix \mathbf{E} ist diagonal und beinhaltet alle kanonischen Orbitalenergien ϵ_i . Da die Überlappmatrix \mathbf{S} nicht die Einheitsmatrix ist, kann das Problem nicht durch die Diagonalisierung der Fock-Matrix gelöst werden. Zunächst muss die Basis in die orthonormale Basis transformiert werden. Dies kann durch die symmetrische Orthogonalisierung oder kanonische Orthogonalisierung der Basis durchgeführt werden. Beide Prozeduren transformieren die Überlappmatrix in die Einheitsmatrix, sodass die finalen Roothaan-Hall-Gleichungen der Form

$$\mathbf{F}'\mathbf{C}' = \mathbf{C}'\mathbf{E} \quad 3.50$$

dem Standard-Eigenwertproblem entsprechen, welches durch die Matrixdiagonalisierung (unitäre Transformation einer Hermiteschen Matrix) gelöst wird. Hierbei arbeitet man mittels intermediärer Normierung (Gleichung 3.51) und Entwicklun-

gen der Koeffizienten der orthonormalen Basis (Gleichung 3.52)

$$F'_{ij} = \int \chi'_a{}^*(1) f(1) \chi'_b(1) dr_1 \quad 3.51$$

$$\psi_i = \sum_a^k C_{ai} \chi'_a \quad 3.52$$

Der transformierte Satz von Orbitalkoeffizienten \mathbf{C}' kann gemäß $\mathbf{C} = \mathbf{X}\mathbf{C}'$ zurücktransformiert werden. Da die Prozedur iterativ ist, werden die Zweielektronen-Integrale der neuen Orbitale und der transformierten Orbitale in jeder Iteration gespeichert. Um die Prozedur effizienter zu gestalten, wird folgendes formuliert. Die Matrix der neuen Koeffizienten \mathbf{C}' ist mit den alten \mathbf{C} durch eine \mathbf{X} -Matrix verknüpft, die eine inverse Matrix \mathbf{X} besitzt:

$$\begin{aligned} \mathbf{C}' &= \mathbf{X}^{-1} \mathbf{C} \\ \mathbf{C} &= \mathbf{X} \mathbf{C}' \end{aligned} \quad 3.53$$

Durch das Einsetzen des Ausdrucks für \mathbf{C} in die Gleichung 3.49 und Multiplikation von links mit \mathbf{X}^\dagger ergibt sich wie folgt für die Roothaan-Hall-Gleichungen:

$$(\mathbf{X}^\dagger \mathbf{F} \mathbf{X}) \mathbf{C}' = (\mathbf{X}^\dagger \mathbf{S} \mathbf{X}) \mathbf{C}' \mathbf{E} \quad 3.54$$

Durch die Definition der neuen Fock-Matrix als $\mathbf{F}' = \mathbf{X}^\dagger \mathbf{F} \mathbf{X}$ erhält man die lineare Roothaan-Hall-Gleichung:

$$\mathbf{F}' \mathbf{C}' = \mathbf{C}' \mathbf{E} \quad 3.55$$

Im Fall der symmetrischen Orthogonalisierung wählt man als \mathbf{X} -Matrix die inverse Quadratwurzel der \mathbf{S} -Matrix:

$$\begin{aligned} \mathbf{X} &= \mathbf{S}^{-1/2} \\ \phi' &= \mathbf{X}^{-1} \phi = \mathbf{S}^{1/2} \phi \end{aligned} \quad 3.56$$

$$\begin{aligned} \mathbf{S}' &= \mathbf{X} \mathbf{S} \mathbf{X}^\dagger = \mathbf{S}^{-1/2} \mathbf{S} \mathbf{S}^{-1/2} = \mathbf{S}^{-1/2} \mathbf{S}^{1/2} = \mathbf{S}^0 = \mathbf{1} \\ \mathbf{C}' &= \mathbf{X}^{-1} \mathbf{C} = \mathbf{S}^{1/2} \mathbf{C} \\ \mathbf{F}' &= \mathbf{S}^{-1/2} \mathbf{F} \mathbf{S}^{-1/2} \end{aligned} \quad 3.57$$

Die Lösung der Matrixgleichung kann auf die Rotation des Raums der besetzten Orbitale in den Raum der unbesetzten Orbitale zurückgeführt werden. Diese

Rotation lässt sich mittels der Matrix der unitären Transformation \mathbf{U} realisieren:

$$\begin{aligned}\phi' &= \mathbf{U}\phi = e^{\mathbf{X}}\phi \\ \mathbf{U}^\dagger\mathbf{U} &= (e^{\mathbf{X}})^\dagger(e^{\mathbf{X}}) = (e^{\mathbf{X}^\dagger})(e^{\mathbf{X}}) = \\ &= (e^{-\mathbf{X}})(e^{\mathbf{X}}) = 1\end{aligned}\tag{3.58}$$

In der Gleichung 3.58 ist die Matrix \mathbf{X} ($x_{ij} = -x_{ji}$) eine orthogonale Matrix, die die Rotationswinkel für alle Orbitalpaare enthält. Ihre Blocks, „besetzt“ - „besetzt“ und „unbesetzt“ - „unbesetzt“, ergeben Null-Elemente. In diesem Fall erscheint ebenfalls die Prozedur iterativ, da der Fock-Operator \mathbf{F} von der Form der Lösungen abhängig ist. Am Ende der Optimierung haben alle Außerdiagonal-Elemente des „besetzt“ - „unbesetzt“ Blocks der Matrix Nullwerte. Betrachtet man diese als die Gradienten der Energie, so verschwinden diese für den Fall des stationären Punktes (Energiminimum). Die einer solchen Rechnung zugrunde liegende AO-Basis bestimmt bei Weitem, wie genau eine Rechnung überhaupt werden kann. Mit der heutzutage verfügbaren Hard- und Software ist das Problem jedoch gering, da genügend große Basissätze verwendet werden können.

Für die Molekuldynamik-(MD)-Berechnungen oder Berechnungen großer Moleküle werden HF-Ansätze zum Teil zu teuer. Um zu effizienteren Ansätzen bei großen Systemen zu kommen, wird eine Vereinfachung vorgenommen. Hierzu parametrisiert man Terme der Fock-Gleichungen und fittet die Parameter an experimentelle oder theoretische Daten an. Da kein vollständig empirischer Ansatz vorliegt, aber immer noch die Schrödingergleichung gelöst wird, spricht man von *semi*-empirischen Verfahren. Hier gibt es eine Vielzahl von Ansätzen mit sehr unterschiedlichen Näherungsgraden.

Die fest etablierten Methoden zur Beschreibung chemischer Reaktionen (Bindungsbruch und Bindungsbildung) beruhen im Grunde auf Verbesserungen des HF-Ansatzes. Diese berücksichtigen die Elektron-Elektron-Korrelation in unterschiedlichem Maße (dynamische, statische und direkte Korrelation). Man unterscheidet zwischen Wellenfunktions- und Dichtefunktionaltheorie-(DFT)-basierten Methoden.

3.3 Dichtefunktionaltheorie

3.3.1 Kohn-Sham-Gleichungen

DFT beruht auf dem Hohenberg-Kohn-Theorem (1964), zu den grundlegenden Berechnungsansätzen gelangt man durch das Kohn-Sham-Verfahren (1965). Das Hohenberg-Kohn-Theorem beweist zwei grundlegende Zusammenhänge. Zunächst kann es zeigen, dass man für eine quantenmechanische Beschreibung gar nicht

die Wellenfunktion benötigt, sondern die Grundzustandseinelektronendichte $\rho(r)$. Sie erhält man aus der Wellenfunktion durch Integration über die Koordinaten von $(n-1)$ -Elektronen (Gleichung 3.59), d.h. sie hängt nur noch von 3 Variablen ab, während die Wellenfunktion von $3n$ Variablen ($n = \text{Anzahl der Elektronen}$) abhängt.

$$\rho_0(\vec{r}) = n \int d\vec{r}_2 \int d\vec{r}_3 \cdots d\vec{r}_n |\psi(\vec{r}_1, \vec{r}_2, \cdots, \vec{r}_n)|^2 \quad \mathbf{3.59}$$

Zusätzlich zeigt das Hohenberg-Kohn-Theorem, dass ein Funktional existiert, das die exakte Energie des Systems liefert, wenn man die exakte Dichte einsetzt. Unter Verwendung des gleichzeitig gültigen Variationsprinzips wird die Grundzustandsdichte durch Energieminimierung erhalten. Das Vielelektronenproblem der wellenfunktionsbasierten elektronischen SGL wird somit auf ein effektives Einelektronenproblem zurückgeführt.

Im Folgenden werden die Theoreme von Hohenberg und Kohn mathematisch betrachtet, welche besagen^[125]:

1. die Grundzustandseigenschaften eines Systems wechselwirkender Elektronen in einem externen Potential $V_{ext}(\vec{r})$, insbesondere die Grundzustandsenergie E_{GS} (Gleichung 3.60), sind eindeutige Funktionale der Grundzustandsdichte, $\rho_0(\vec{r})$. Das externe Potential $V_{ext}(\vec{r})$ ist (bis auf eine additive Konstante) durch die Elektronendichte $\rho_0(\vec{r})$ eindeutig bestimmt.
2. die Energie einer beliebigen Elektronendichte, $\rho_0(\vec{r})$ ist immer größer oder gleich der Grundzustandsenergie E_{GS} :

$$E_{GS} = E_{GS}[\rho_0(\vec{r})] \quad \mathbf{3.60}$$

$$E[\rho] \equiv \int V_{ext}(\vec{r})\rho(\vec{r})d\vec{r} + F[\rho_0(\vec{r})] \geq E_{GS} \quad \mathbf{3.61}$$

Für die Grundzustandsdichte, $\rho_0(\vec{r})$, ergibt die Definition der Energie unter der Verwendung des exakten universellen Funktionals, $F[\rho(\vec{r})]$, die Grundzustandsenergie, E_{GS} :

$$E_{GS} = \int V_{ext}(\vec{r})\rho_0(\vec{r})d\vec{r} + F[\rho_0(\vec{r})] \quad \mathbf{3.62}$$

Das erste Theorem von Hohenberg und Kohn besagt in anderen Worten, dass keine zwei verschiedenen externen Potentiale existieren, die zu der gleichen Elektronendichte führen. Der Beweis erfolgt durch *reductio ad absurdum*. Existieren zwei externe Potentiale $V_{ext}^{(1)}(\vec{r})$ und $V_{ext}^{(2)}(\vec{r})$ zur gleichen Elektronendichte $\rho(\vec{r})$, die sich um mehrere additive Konstanten unterscheiden, gelten zwei verschiedene Hamilton-Operatoren zu den verschiedenen Grundzustandswellenfunktionen $\Psi^{(1)}$

und $\Psi^{(2)}$, die auch verschiedene Erwartungswerte liefern :

$$\begin{aligned} H^{(1)} &= T + V_{ee} + V_{ext}^{(1)} \Rightarrow H^{(1)}\Psi^{(1)} = E_0^{(1)}\Psi^{(1)} \\ H^{(2)} &= T + V_{ee} + V_{ext}^{(2)} \Rightarrow H^{(2)}\Psi^{(2)} = E_0^{(2)}\Psi^{(2)} \\ \langle \Psi^{(1)} | H^{(1)} | \Psi^{(1)} \rangle &= E_0^{(1)} \neq E_0^{(2)} = \langle \Psi^{(2)} | H^{(2)} | \Psi^{(2)} \rangle \end{aligned} \quad \mathbf{3.63}$$

An dieser Stelle kann eine folgende Annahme getroffen werden: Eine der Funktionen wird als Ausgangsfunktion der anderen im Variationstheorem verwendet.

$$\begin{aligned} E_0^{(1)} &< \langle \Psi^{(2)} | H^{(1)} | \Psi^{(2)} \rangle \\ E_0^{(2)} &< \langle \Psi^{(1)} | H^{(2)} | \Psi^{(1)} \rangle \end{aligned} \quad \mathbf{3.64}$$

Der Erwartungswert des Operators V_{ext} unter Berücksichtigung der Definition der Dichte (Gleichung 3.59) ergibt:

$$\begin{aligned} \langle \Psi | V_{(ext)} | \Psi \rangle &= \int \int \cdots \int \int dr_1 dr_2 \cdots dr_n \Psi^* \left(\sum_{i=1}^n V_{(ext)}(r_i) \right) \Psi = \\ &= \sum_{i=1}^n \int dr_i V_{(ext)}(r_i) \int \int dr_1 \cdots dr_{i-1} dr_{i+1} \cdots dr_n \Psi^* \Psi = \\ &= \sum_{i=1}^n \frac{1}{n} \int dr_i V_{(ext)}(r_i) \rho(r_i) = \int dr \rho(r) V_{ext}(r) \end{aligned} \quad \mathbf{3.65}$$

Angenommen, dass $\rho^1(r) = \rho^2(r)$ (Gleichung 3.65), kann man für die beiden Anfangsfunktionen schreiben:

$$\begin{aligned} \langle \Psi^{(2)} | H^{(1)} | \Psi^{(2)} \rangle &= \langle \Psi^{(2)} | H + V_{ext}^{(1)} - V_{ext}^{(2)} | \Psi^{(2)} \rangle = E_0^{(2)} + \langle \Psi^{(2)} | V_{ext}^{(1)} - V_{ext}^{(2)} | \Psi^{(2)} \rangle \\ \langle \Psi^{(1)} | H^{(2)} | \Psi^{(1)} \rangle &= \langle \Psi^{(1)} | H + V_{ext}^{(2)} - V_{ext}^{(1)} | \Psi^{(1)} \rangle = E_0^{(1)} + \langle \Psi^{(1)} | V_{ext}^{(2)} - V_{ext}^{(1)} | \Psi^{(1)} \rangle \end{aligned} \quad \mathbf{3.66}$$

Für das Variationstheorem, welches in 3.64 die Wellenfunktionen $\Psi^{(1)}$ und $\Psi^{(2)}$ einbezieht, lässt sich daher Folgendes formulieren:

$$\begin{aligned} E_0^{(1)} &< E_0^{(2)} + \int dr \rho(r) [V_{ext}^{(1)} - V_{ext}^{(2)}] \\ E_0^{(2)} &< E_0^{(1)} + \int dr \rho(r) [V_{ext}^{(2)} - V_{ext}^{(1)}] \end{aligned} \quad \mathbf{3.67}$$

Das Zusammenfassen der letzteren Ungleichungen ergibt die finale Ungleichung:

$$E_0^{(1)} + E_0^{(2)} < E_0^{(2)} + E_0^{(1)}, \quad \mathbf{3.68}$$

welche widersprüchlich ist.

Leider macht das Hohenberg-Kohn-Theorem keine Aussage darüber, wie das Funktional aussieht, sodass nur genäherte Ausdrücke zur Verfügung stehen.

Einen sehr guten Ansatz liefert das Kohn-Sham-Verfahren. Hier teilt man das Funktional zunächst auf, was noch mathematisch exakt ist. Man benötigt ein Funktional für die kinetische Energie der Elektronen $T[\rho_0]$, sowie Funktionale für die Elektron-Kern- ($E_{Ne}[\rho_0]$) und Elektron-Elektron-Wechselwirkungen ($E_{ee}[\rho_0]$).

$$E_0[\rho_0] = T[\rho_0] + E_{ee}[\rho_0] + E_{Ne}[\rho_0] \quad \mathbf{3.69}$$

Das Funktional für die Elektron-Kern-Wechselwirkungen ergibt sich einfach aus dem zugehörigen Coulomb-Ausdruck. Das Funktional für die Elektron-Elektron-Wechselwirkungen unterteilt man in die zugehörigen Coulomb-Wechselwirkungen $J[\rho]$, was ebenfalls exakt ist und den Rest, der die Austauschwechselwirkung, $K[\rho]$ und die Korrelationseffekte umfasst. Der Austausch-Term ist ein nicht klassischer Beitrag durch die Antisymmetrie der Wellenfunktion, wie bereits im HF-Ansatz erwähnt wurde.

Der Term für kinetische Energie der Elektronen ist zunächst unbekannt. Während ein direkter Zusammenhang zwischen der kinetischen Energie und der Elektronendichte keine qualitative Beschreibung einer chemischen Bindung lieferte, zeigte der wellenfunktionsbasierte Ansatz (HF-Methode) tendenziell eine gute Übereinstimmung mit exakten Bindungsenergien. Die Idee von Kohn und Sham bestand nun darin, dass man für ein reales Molekül so ein derartiges Referenzsystem \mathbf{S} wählen kann, dessen kinetische Energie T_S exakt berechenbar ist und welches den gleichen Wert der Grundzustandsdichte wie das reale System aufweist. Das Referenzsystem \mathbf{S} stellt ein System aus nicht wechselwirkenden Teilchen dar, welches mittels einer Slaterdeterminante aus Einelektronenorbitalen bereits im Rahmen der Hartree-Fock Theorie beschrieben wurde. Zusammenfassend wird im Rahmen der DFT das Funktional für die kinetische Energie der Elektronen über das HF-Verfahren angenähert. Die daraus resultierenden Kohn-Sham-Gleichungen unterscheiden sich von den Fock-Gleichungen nur im Austausch-Korrelationsterm durch die Einführung der sogenannten Austausch-Korrelationsenergie $E_{XC}[\rho]$ (Gleichung 3.70).^[121]

$$\begin{aligned} F[\rho(\vec{r})] &= T_S[\rho(\vec{r})] + J[\rho(\vec{r})] + E_{XC}[\rho(\vec{r})] \\ E_{XC} &\equiv (T[\rho] - T_S[\rho]) + (E_{ee}[\rho] - J[\rho]) \end{aligned} \quad \mathbf{3.70}$$

Die Austausch-Korrelationsenergie beinhaltet nicht nur die nicht klassischen Beiträge der Elektronenwechselwirkung, sondern auch die Korrelationsbeiträge zur kinetischen Energie. Dieser Unterschied ergibt erstens eine Formulierung für ein effektives Potential, in dem Austausch- und Coulombkorrelationen berücksichtigt werden, und zweitens andere Orbitale als in der HF-Theorie. Da die Elektronendichte sich aus der Summe der Quadrate der entsprechenden Spinorbitale ermitteln lässt, werden die Spinorbitale aus den *Einelektronen-Kohn-Sham* (KS)-

Gleichungen selbstkonsistent ermittelt. Die Wiedereinführung von Wellenfunktionen erlaubt die exakte Berechnung der kinetischen Energie T_S für ein System nicht wechselwirkender Elektronen mit dem Hamilton-Operator \widehat{H}_S , der Wellenfunktion Ψ_S in einem effektiven Potential V_S :

$$\widehat{H}_S = -\frac{1}{2} \sum_i^N \nabla_i^2 + \sum_i^N V_S(\vec{r}_i) \quad 3.71$$

$$T_S = -\frac{1}{2} \sum_i^N \langle \phi_i | \nabla^2 | \phi_i \rangle \quad 3.72$$

$$V_S = \frac{\delta E_{pot}}{\delta \rho} = \frac{\delta (J[\rho] + E_{XC}[\rho] + E_{Ne})}{\delta \rho} \quad 3.73$$

$$\Psi_S = -\frac{1}{\sqrt{N!}} \det|\phi_1 \phi_2 \dots \phi_N| \quad 3.74$$

Die KS-Orbitale müssen ebenso wie die HF-Orbitale die Randbedingungen für die Wellenfunktionen (Orthogonalität, Gleichung 3.3) erfüllen. Verfahrenstechnisch eignet sich die Lagrangesche Methode zur Implementierung solcher Optimierungen.^[126] Durch Variation der Lagrangeschen Funktion L lässt sich ein Satz von KS-Gleichungen, in Analogie zu den HF-Gleichungen, schreiben.

$$L[\rho] = E_{DFT}[\rho] - \sum_{ij}^{\text{Orbitale}} \hat{\lambda}_{ij} (\langle \phi_i | \phi_j \rangle - \delta_{ij}) \quad 3.75$$

$$\widehat{h}_{KS} \phi_i = \sum_{ij}^{\text{Orbitale}} \hat{\lambda}_{ij} \phi_j \quad 3.76$$

$$\widehat{h}_{KS} = \frac{1}{2} \nabla^2 + \widehat{V}_{eff} \quad 3.77$$

$$\widehat{V}_{eff}(\vec{r}) = \widehat{V}_{Ne}(\vec{r}) + \int \frac{\rho(r')}{|r - r'|} dr' + \widehat{V}_{xc}(\vec{r}). \quad 3.78$$

Das effektive Potential enthält den Beitrag durch die Wechselwirkung mit den Kernen, die elektrostatische Coulomb-Abstoßung und das Austausch-Korrelationspotential. Das effektive Potential V_{eff} muss mit Hilfe einer adiabatischen Beziehung so gewählt werden, dass es die gleiche Grundzustandsdichte liefert, wie das wechselwirkende System. Das Austausch-Korrelationspotential wird als Funktional der entsprechenden Energie, d.h. als eine erste Ableitung definiert:

$$\begin{aligned} V_{xc}(r) &= \frac{\delta E_{xc}[\rho]}{\delta \rho(r)} \\ &= \epsilon_{xc}[\rho(r)] + \int \rho(r') \frac{\delta \epsilon_{xc}(r')}{\delta \rho(r)} dr'. \end{aligned} \quad 3.79$$

Mit Hilfe der unitären Transformation kann die Matrix aus \hat{n} -Multiplikatoren diagonalisiert werden, somit bekommt man die kanonischen KS-Orbitale. Die daraus resultierenden *pseudo*-Eigenwertgleichungen sind auch als KS-Gleichungen bekannt:

$$\widehat{h}_{KS}\phi_i = \epsilon_i\phi_i. \quad 3.80$$

Die Molekülorbitale ϕ werden durch die Basissatzentwicklung der Atomorbitale χ definiert:

$$\phi_i = \sum_a^{\text{Basis}} c_{a_i}\chi_a \quad 3.81$$

Das Variationsprinzip führt zu der Matrixgleichung der Atomorbitale. Die gegebene KS-Matrix \mathbf{h}_{KS} ist analog der Fock-Matrix.

$$\begin{aligned} \mathbf{h}_{KS}\mathbf{C} &= \mathbf{S}\mathbf{C}\epsilon \\ h_{a\beta} &= \langle \chi_a | \mathbf{h}_{KS} | \chi_\beta \rangle \\ S_{a\beta} &= \langle \chi_a | \chi_\beta \rangle. \end{aligned} \quad 3.82$$

3.3.2 Übersicht der Dichtefunktionale

Durch das Austausch-Korrelations-Potential werden sowohl Austausch- als auch Korrelationseffekte berücksichtigt, so dass die KS-Theorie prinzipiell exakt ist.

$$E_{XC}[\rho] = E_X[\rho] + E_C[\rho] = \int \rho(r)\epsilon_x[\rho(r)]dr + \int \rho(r)\epsilon_c[\rho(r)]dr \quad 3.83$$

Da jedoch das Austausch-Korrelationsfunktional in seiner expliziten Form nicht gegeben ist, ist die praktische Anwendung der KS-Theorie auf Näherungen dieses Terms angewiesen. Die Klassifikation der DFT-Methode wurde von Perdew als die Jakobs Leiter der DFT-Näherungen^{[127][128]} vorgeschlagen und teilt die Funktionale gemäß der Komplexität der Ausführung der DFT-Näherungen in fünf Ränge auf:

1. LDA/LSDA (lokale Dichtenäherung): $\rho / \rho_a, \rho_\beta$
2. GGA (Gradientennäherung): $\rho_a, \rho_\beta, \nabla\rho_a, \nabla\rho_\beta$
3. meta-GGA (Gradientennäherung inklusive 2-fache Ableitungen, plus Term der kinetischen Energie der Kohn-Sham-Orbitale): $\rho_a, \rho_\beta, \nabla\rho_a, \nabla\rho_\beta, \nabla^2\rho_\sigma, \tau_\sigma$
4. hyper-GGA (Gradientennäherung inklusive 2-fache Ableitungen, plus Term der kinetischen Energie der Kohn-Sham-Orbitale, plus exakter Austausch (HF-Austausch)): $\rho_a, \rho_\beta, \nabla\rho_a, \nabla\rho_\beta, \nabla^2\rho_\sigma, \tau_a, \tau_\beta, \epsilon_{x,\sigma}(r)$
5. RPA (nicht-lokale DFT: Gradientennäherung inklusive 2-fache Ableitungen, plus Term der kinetischen Energie der Kohn-Sham-Orbitale, plus exak-

ter Austausch (HF-Austausch), plus Berücksichtigung virtueller Orbitale):
 $\rho_a, \rho_\beta, \nabla\rho_a, \nabla\rho_\beta, \nabla^2\rho_\sigma, \tau_\sigma, \varepsilon_{x,\sigma}(r), \text{virt. } \psi_i$

Aufgrund der zahlreich vorhandenen Informationen zu dieser Thematik wird im Folgenden ein kurzer Überblick gegeben. Die einfachste Näherung für E_{XC} beruht auf der Annahme eines homogenen Elektronengases.^{[129][121]} In der sogenannten lokalen Dichtenäherung oder LDA (Local Density Approximation) wurde angenommen, dass die Dichte eine sehr langsam variierende bis konstante Funktion ist und ortsabhängig dem homogenen Elektronengas angenähert werden kann. In der LDA-Näherung wird ein Energieterm ε_{XC}^{unif} zur Beschreibung der Austausch-Korrelationseffekte verwendet, der nur von der Dichte abhängig ist (Gleichung 3.84). Die LSDA (Local Spin Density Approximation) ist eine Verallgemeinerung der LDA für die Elektronendichten mit unterschiedlichen α - und β - Anteilen. Für die geschlossenschaligen Systeme (engl. *closed-shell*) sind die beiden Ansätze identisch. Da die LSDA-Näherung annimmt, dass die Elektronendichte nur schwach variiert, lassen sich nur einige metallische Systeme (wie z.B. Natrium) mit diesem Ansatz sehr gut beschreiben.

$$E_{XC}^{LSDA}(\rho_a, \rho_\beta) = \int \rho \varepsilon_{XC}^{unif}(\rho_a, \rho_\beta) d^3r \quad \mathbf{3.84}$$

Funktionale dieser Generation sind mit Akronymen wie SVWN^{[130][131]} und PW^[132] vertreten. Das LDA-Funktional SVWN beinhaltet das Austausch-Funktional nach Slater (gezeigt in Gleichung 3.85^[129]) und das Korrelationsfunktional nach Vosko, Wilk und Nussair (VWN^[131]).

$$E_X^{Slater} = \int \rho(r) \varepsilon_x^{Slater}[\rho(r)] dr \quad \mathbf{3.85}$$

$$\varepsilon_x^{Slater} = -\frac{3}{4} \sqrt[3]{\frac{3\rho(r)}{\pi}}$$

Im Fall des LDA-Funktional PW wird das Korrelationsfunktional nach Perdew und Wang angenähert. Die analytische Form der Korrelationsfunktionale VWN und PW erscheinen als extrem komplexe analytische Interpolationen, bestehend aus den parametrisierten Funktionen der Spinpolarisation und zahlreichen Fit-Konstanten, explizite Form welcher in den angegebenen Literaturquellen zu finden ist.

Während mit Hilfe des LDA-Funktional gute Ergebnisse für die molekularen Eigenschaften wie Geometrieparameter oder Schwingungsfrequenzen erzielt werden können, sind die Berechnungen zu den Reaktionspfaden (Reaktionsbarrieren, Reaktionsenthalpien/relative Energien) nicht brauchbar. Die Beschreibung der Moleküle ist im Rahmen der LDA-Näherung durch einen systematischen Fehler charakterisiert, indem diese zu stark gebunden (engl. *overbinding*) erscheinen. Die

Überschätzung der Bindungsstärken ist darauf zurückzuführen, dass die Austauschenergie unterschätzt und die Elektronenkorrelation überschätzt wird.

Der zweite Rang der Dichtefunktionale, die Gradientennäherung oder GGA (Generalized Gradient Approximation), wird durch die neue Energiefunktion E_{XC}^{GGA} verkörpert, die nicht nur von der Dichte, sondern auch von ihren Gradienten $\nabla\rho_a, \nabla\rho_b$ abhängt.

$$E_{XC}^{GGA}(\rho_a, \rho_b) = \int \rho \varepsilon_{XC}^{GGA}(\rho_a, \rho_b, \nabla\rho_a, \nabla\rho_b) d^3r \quad 3.86$$

Geht man von schwach variierenden Elektronendichten aus, realisiert man in der Praxis die neue Energie E_{XC}^{GGA} als eine Taylorentwicklung um die konstante Referenzdichte. Letzteres ist bereits im Dichtefunktional ersten Ranges des homogenen Elektronengases gegeben. Daher stellt das LDA-Dichtefunktional den Term nullter Ordnung in der Gradientenentwicklung dar, wie zum Beispiel in einer bis zur zweiten Ordnung durchgeführten Expansion gezeigt wird^[127]:

$$E_{XC}^{GGA}(\rho_a, \rho_b) = E_{XC}^{LSDA} + \int \sum_{\sigma, \sigma'} C_{xc}^{\sigma, \sigma'}(\rho_a, \rho_b) \frac{\nabla\rho_\sigma \nabla\rho_{\sigma'}}{\rho_\sigma^{2/3} \rho_{\sigma'}^{2/3}} \quad 3.87$$

Die Gradientennäherung ergibt die Verbesserung der Fehler durch LDA/LSDA, vor allem in Bereichen der Berechnungen von Barrieren der chemischer Reaktionen und Dissoziationsenergien. Im Gegenteil zu LDA sind diese in keiner einzigen universellen Form vorhanden.

Die Methode der GGA-Weiterentwicklung ist in Bezug auf die Aufstellung der mathematischen Konstrukte des Dichtefunktionals nicht trivial. Die etablierte Methode zur Entwicklung ist die Testung der empirischen Dichtefunktionale. Der Empirismus der GGA ist vollkommen anders als die Verwendung von empirischen Parametern der semi-empirischen Methoden. Solche Dichtefunktionale werden durch das Anfitzen an die experimentelle Daten parametrisiert. Die sogenannten empirischen Dichtefunktionale beschreiben die molekularen Eigenschaften von Systemen, für die diese entwickelt wurden, wesentlich besser. Zum Beispiel das parameter-freie (nicht-empirische) PBE^[133] (Perdew-Burke-Ernzerhof) Dichtefunktional beschreibt sehr gut die organischen Reaktionen auf den Metalloberflächen. Die empirischen BLYP (Austauschterm nach Becke B88^[36] und Korrelationsterm nach Lee, Yang und Paar LYP^[37]) und B3LYP^{[36][37][134][135][131]} Dichtefunktionale liefern gute und sehr gute Ergebnisse für die organischen Reaktionen der Elemente der Hauptgruppen.^[121] Letzteres, das zum vierten Rang der Jacobs Leiter gehört, die Hyper-GGA-Approximation, wird weiter unten ausführlicher erörtert. Zu den Dichtefunktionalen zweiten Ranges gehören auch PW86^[136] (Perdew-Wang 1986), das parameterfreie PW91 (Perdew-Wang 1991), BVWN (Austauschterm B88 und Korrelationsterm VWN), OLYP (Austauschterm OPTX^[137]

und Korrelationsterm LYP) und die 2008 entwickelten Dichtefunktionale PBEsol^[138] (Perdew, Ruzsinszky) und SOGGA-(Second-Order-GGA)-Dichtefunktional M06-L^[139].

Die meta-GGA-Näherung der Dichtefunktionale oder die higher-order-GGA^[121] DFT verwendet die zweifache Ableitungen der Elektronendichte $\nabla^2 \rho_\sigma$ bei der Expansion der Austausch-Korrelationsterme (Gleichung 3.88). In der meta-GGA-Näherung wird zusätzlich die Abhängigkeit der meta-GGA-Energiefunktion $\varepsilon_{XC}^{meta-GGA}$ von der kinetischen Energie der Kohn-Sham-Orbitale τ_σ (Gleichung 3.89) involviert. Das einzige nicht-empirische Dichtefunktional dieses Ranges ist durch TPSS^[140] (entwickelt von Tao, Perdew, Staroverov und Scuseria) zugegen. Die anderen bekannten Dichtefunktionale des dritten Ranges sind BR^[141], B95^[142], VSXZ (Voorhis-Scuseria-eXchange-Correlation)^[143] und PKZB (Perdew-Kurth-Zupan-Blaha)^[144].

$$E_{XC}^{meta-GGA}(\rho_a, \rho_b) = \int \rho \varepsilon_{XC}^{meta-GGA}(\rho_a, \rho_b, \nabla \rho_a, \nabla \rho_b, \nabla^2 \rho_a, \nabla^2 \rho_b, \tau_a, \tau_b) d^3 r \quad 3.88$$

$$\tau_\sigma = \frac{1}{2} \sum_i^{occ} |\nabla \phi_{i\sigma}(r)|^2 \quad 3.89$$

Die hyper-GGA-Näherung oder die sogenannten Hybrid-Funktionale verbessern die GGA-Funktionale, indem die neue Funktion $E_{XC}^{hyper-GGA}$ zusätzlich von der exakten Austauschenergie $\varepsilon_{x,\sigma}(r)$ (Gleichung 3.91) abhängt.

$$E_{XC}^{hyper-GGA}(\rho_a, \rho_b) = \int \rho \varepsilon_{XC}^{hyper-GGA}(\rho_a, \rho_b, \nabla \rho_a, \nabla \rho_b, \tau_a, \tau_b, \varepsilon_{x,a}, \varepsilon_{x,b}) d^3 r \quad 3.90$$

$$\varepsilon_{x,\sigma}(r) = \frac{1}{2} \int \frac{\rho_x^\sigma(r, r')}{|r' - r|} d^3 r' = -\frac{1}{2\rho_x^\sigma} \int \frac{\sum_i^{occ} |\phi_{i\sigma}^*(r) \phi_{i\sigma}(r')|^2}{|r' - r|} d^3 r' \quad 3.91$$

In der Praxis wird in der Expansion für die hyper-GGA-Energie $E_{XC}^{hyper-GGA}$ ein Anteil an sogenannten exaktem Hartree-Fock-(HF)-Austausch-Energieterm zu dem Dichtefunktional GGA oder meta-GGA addiert. Dieser Anteil ist variabel und kann für die unterschiedlichen Fragestellungen geeignet gewählt werden. Allein durch den 20 %-igen Anteil an exaktem HF-Austausch können die Effekte der statischen Korrelation effektiv angenähert werden. Somit können sehr genaue Dichtefunktionale erstellt werden. Das populärste Dichtefunktional dieses Rangs stellt B3LYP^{[36][37][134][135][131]} dar. B3LYP ist eines der am häufigsten zitierten Dichtefunktionale für Berechnungen von Koordinationsverbindungen und Systemen mit offener Schale, wie z.B. in der Chemie der Übergangsmetalle. Das B3LYP-Dichtefunktional liefert sehr gute Ergebnisse für thermochemische Berechnungen.^[129] Hierzu wurden umfangreiche Referenzen auf der Grundlage der Gn-Theorie protokolliert, insbesondere durch die Berechnungen mit den Datenbanken G3 und G4.^[145] B3LYP gehört, wie bereits erwähnt, zu den empirischen

Dichtefunktionalen und wurde 1994 durch Stephens *et al.* vorgeschlagen. Die Form des B3LYP-Dichtefunktionalen wurde einmal wie eine Rezeptur folgend beschrieben: „take the exchange-correlation energy from the LSDA method, add a pinch (20 %) of the difference between the Hartree-Fock exchange energy E_{XC}^{KS} (well, in fact, this is Kohn-Sham exchange energy, because the Slater determinant wave function, used to calculate it, is the Kohn-Sham determinant, not the Hartree-Fock one) and the LSDA E_{XC}^{LSDA} . Then, mix well 72 % of Becke exchange potential E_X^{B88} ^[134] which includes the 1988 correction, then strew in 81 % of the Lee-Yang-Paar correlation potential E_C^{LYP} . You will like this homeopathic magic portion most if you conclude by putting in 19 % of the Vosko-Wilk-Nusair potential E_C^{VWN} “^[146]

$$E_{XC}^{B3LYP} = E_{XC}^{LSDA} + 0,2(E_{XC}^{KS} - E_{XC}^{LSDA}) + 0,72E_X^{B88} + 0,81E_C^{LYP} + 0,19E_C^{VWN} \quad \mathbf{3.92}$$

Die weiteren in der Literatur beschriebenen Dichtefunktionale dieses Ranges sind durch O3LYP^[121], PBE0^[147], HSE^[148], B97^[40] und TPSSH^{[149][150]} vertreten.

Die exakte Austauschenergie ist nicht lokal. Für die Berechnung mit einem Hybrid-Funktional bedeutet dies, dass es nicht nur von der Elektronendichte, sondern auch von der Dichtematrix abhängt. Dies resultiert in den erhöhten Kosten der Berechnung, wohingegen die nächsten Näherungen, wie z.B. RI-J für den Coulomb-Teil, vorgenommen werden müssen. Die Notwendigkeit der Anwendung von zusätzlichen Näherungen verhindert die Effizienz der Dichtefunktionale dieses Ranges. Aus diesem Grund haben die meta-GGA Dichtefunktionale zum Ziel, mindestens genau so gute Ergebnisse wie hyper-GGA zu erzielen und gleichzeitig die genannten Kosten der Berechnungen so gut wie möglich zu senken. In der Arbeitsgruppe D. G. Truhlar wurde eine neue Reihe von hybriden meta-GGA-Dichtefunktionalen entwickelt. Das meta-GGA Dichtefunktional M05-2X, das auch als Minnesota-2005-Funktional mit doppeltem HF-Austausch bekannt ist, zeigt sehr gute Ergebnisse für die Berechnungen der Thermochemie und Kinetik^[151] sowie bei der Beschreibung schwacher, nicht-kovalenter Wechselwirkungen, wie $\pi-\pi$ -Wechselwirkungen, Wasserstoffbrücken und Dispersionswechselwirkungen. Die darauffolgenden Entwicklungen der hybriden meta-GGA-Dichtefunktionale führen zu den Dichtefunktionalen M06-2X, M08-HX und M08-SO^[152]. Das Letztere erreicht die exakte Form der Austausch- und Korrelationsterme durch die zweite Ordnung (SO, Second Order) der Gradientenentwicklung der Dichte. Die Einschränkung in der Gradientenentwicklung zeigt, dass M08-HX die besseren Ergebnisse als M08-SO für die schwachen Wechselwirkungen liefert.

Der fünfte Rang stellt die sogenannten nicht-lokalen Dichtefunktionale dar. Die Funktionale namens RPA (generalized Random-Phase Approximation), wie z.B. OEP2^{[153][154]} (Optimized Effective Potential^[155]) und B2PLYP^[156], fordern im Input von Berechnungen nicht nur die besetzten Kohn-Sham-Orbitale, sondern

auch die nicht besetzten an. Die Berücksichtigung der virtuellen Orbitale richtet sich vor allem an die Problematik der Berechnungen an Systemen, in denen Dispersionseffekte eine große Rolle spielen.

3.4 Berücksichtigung der Lösungsmittelleffekte

Bis Anfang der Neunziger Jahre waren die quantenmechanischen Berechnungen auf Moleküle in der Gasphase beschränkt. Physikalisch betrachtet entsprechen solche Systeme dem Zustand eines idealen Gases im Vakuum. Die präparative Chemie dagegen beschäftigt sich meistens mit Prozessen in Lösung. Sowohl ein qualitativer als auch quantitativer Ablauf einer Reaktion kann davon abhängig sein, ob die Reaktion in der Gasphase oder in einer Lösung stattfindet. Beispielsweise kann die Produktverteilung der S_N -Reaktion durch die Polarität des Mediums gesteuert werden. Die Polarität des Lösungsmittels kann auch solvatochrome Effekte in der elektronischen Spektroskopie verursachen. Dabei handelt es sich um die Beeinflussung von Absorptionsbanden einer beobachteten Substanz durch das verwendete Lösungsmittel, welche sich darin äußern kann, dass die Intensität, Lage und auch die Form der Banden verändert wird. Deswegen ist es sehr relevant, Methoden zur Berücksichtigung der Effekte durch die Polarität des umgebenden Mediums zu verwenden. Grundsätzlich unterscheidet man zwischen den expliziten und impliziten Verfahren.^[157] Bei den expliziten Verfahren werden Lösungsmittelmoleküle berücksichtigt, während bei den impliziten Verfahren die Effekte des Lösungsmittels als die eines homogenen Mediums oder auch polarisierbaren Kontinuums behandelt werden.

Die expliziten Verfahren sind sehr genau und berücksichtigen „short range“-Wechselwirkungen oder die spezifischen Effekte der Solvatisierung, wie zum Beispiel Wasserstoffbrückenbindungen, van-der-Waals-Wechselwirkungen, Charge-Transfer-Wechselwirkungen und, neben weiteren Effekten, die Struktur der Koordinationssphäre des Lösungsmittels.^[157] Platziert man das gelöste Molekül in die Umgebung z.B. von Wassermolekülen, so dass die Moleküle sich nicht zu stark nähern und die Dichte der Wassermoleküle der Dichte des Wassers entspricht, kann das elektrostatische Potential und die Eigenschaften des gelösten Moleküls mit Berücksichtigung dieses elektrostatischen Potentials berechnet werden. Der Rechenaufwand der expliziten Verfahren wird sehr schnell sehr groß, wenn mehr als nur wenige Lösungsmittelmoleküle berücksichtigt werden sollen. Der Aufwand besteht zusätzlich darin, dass für die Berechnungen alle anderen möglichen Anordnungen wiederholt und statistisch ausgewertet werden müssen.

Die Kontinuumsmodelle verwenden dagegen das „reaction-field“-Konzept^[157], wobei „long-range“-Effekte berücksichtigt werden. Zu den „long range“- oder nicht-spezifischen Effekten der Solvatisierung zählen Polarisierung des Lösungsmittels

und Orientierung seiner Dipole um das gelöste Molekül. Im Rahmen des „reaction-field“-Konzepts betrachtet man das Lösungsmittel als ein homogenes polarisierbares Medium mit der Dielektrizitätskonstante ε . Das Gelöste (d.h. das gelöste Molekül) befindet sich in diesem Medium eingeschlossen in einem Hohlraum, welcher eine spherische oder ellipsoide Form besitzt. Die Oberfläche eines Hohlrums dient als Interface zur Berechnung der Solvenseffekte in diesem Modell verwendet und wird als „Solvent Accesible Surface“ (SAS) bezeichnet.^{[157][158]} Die gegenseitige elektrostatische Wechselwirkung zwischen dem Gelösten und dem polarisierbaren dielektrischen Medium ruft auf der SAS-Oberfläche eine sogenannte Abschirmungsladung hervor. Die Dichte der Abschirmungsladung $\sigma(\vec{r})$ liefert das gesamte elektrische Feld (die erste Ableitung des elektrostatischen Potentials) an der inneren Seite der SAS-Oberfläche am Punkt \vec{r} :^[158]

$$4\pi\varepsilon\sigma(\vec{r}) = (\varepsilon - 1)n(\vec{r})E^-(\vec{r}), \quad \mathbf{3.93}$$

wobei $n(\vec{r})$ der Normalvektor der Oberfläche und ε die Permittivität des Mediums ist.

Wird das Gelöste durch quantenmechanische Methoden beschrieben, muss die Antwort des dielektrischen Mediums auf die elektrischen Ladungen des Gelösten (wie z.B. partielle atomare Ladungen eines Moleküls) sowie die Antwort der Elektronenfunktion des Gelösten auf die Polarisation des Mediums berücksichtigt werden. Solche Berechnung erfordert eine iterative Vorgehensweise und wird Self-Consistent Reaction Field (SCRF) bezeichnet. In diesem Modell wird der Hamiltonian für das gelöste Molekül durch einen Zusatzterm, welcher dem elektrostatischen Potential des Gelösten ϕ_σ angenähert wird, ergänzt:

$$H = H_0 + \phi_\sigma \quad \mathbf{3.94}$$

Das **C**onductor-like **S**creening **M**odel (COSMO) gehört zur Klasse der Kontinuumsmodelle.^{[158][159]} Im COSMO-Modell wird SAS als Einhüllende von Kugeln um die einzelnen Atome mit ca. 20 % vergrößerten Van-der-Waals-Radien definiert. Das elektrostatische Potential wird in COSMO durch die partiellen atomaren Ladungen, die durch die Wellenfunktion bestimmt werden, realisiert. Bei kleinen Systemen sind für sphärische oder ellipsoide Kavitäten noch analytische Lösungen möglich. Hierbei wird SAS in Segmente mit konstanten Abschirmungsdichten σ_i zerlegt. Die Abschirmungsladung kann bei einer SAS mit m -Segmenten als m -dimensionaler Vektor $\vec{q} = (\vec{q}_1, \dots, \vec{q}_m)$ dargestellt werden.

Die Grundidee des COSMO-Modells ist, durch die einfachen Randbedingungen eines elektrischen Leiters, bei dem das Potential auf der SAS-Oberfläche null ist ($\Phi = 0$), eine einfachere Gleichung zu erhalten. Diese kann für den Fall des Dielektrikums mit einem Faktor skaliert werden. Das Gesamtpotential $\Phi = (\Phi_1, \dots, \Phi_m)$

auf der SAS kann in dieser Betrachtung wie folgt geschrieben werden:^[159]

$$\begin{aligned}\Phi &= BQ + Aq^* \\ &= \Phi^X + Aq^* = 0\end{aligned}\tag{3.95}$$

Wobei Φ^X das Potential ist, das von der Ladung Q_i eines gelösten Moleküls in einem Segment i an der Innenseite der Kavität herrührt. Die Matrix B ist nur von der Geometrie der SAS abhängig. Aq^* ist das Potential, das durch die Abschirmungsladungen q^* des Leiters auf der Oberfläche verursacht wird. A ist eine symmetrische Matrix der Coulomb-Wechselwirkungen, die durch Wechselwirkungen der Abschirmungsladungen q^* auf den Segmenten verursacht wird.

Nach der Anwendung der Grenzbedingung $\Phi = 0$, erhält man für den Fall $\epsilon_D = \infty$

$$q^* = -\frac{\Phi^X}{A}\tag{3.96}$$

Für reale Medien mit endlichen Dielektrizitätskonstanten wird ein Faktor $f(\epsilon)$ eingeführt:

$$q = f(\epsilon)q^*\tag{3.97}$$

mit

$$f(\epsilon) = \frac{\epsilon - 1}{\epsilon + x}\tag{3.98}$$

COSMO verwendet $x = 0,5$, wobei dieser Wert empirisch gefunden wurde.

Die endgültige Gleichung, die in den SCF-Zyklus implementiert wird, gibt die Relation zwischen der Abschirmungsladung und dem Potential bei einem bestimmten ϵ -Wert an:

$$Aq = -f(\epsilon)\Phi^X\tag{3.99}$$

Die Anwendungen der COSMO-Methode zeigen eine deutliche Abhängigkeit der Stabilität des untersuchten Systems von der Polarität des Mediums und der Ladungstrennung. Als Beispiel können theoretische Untersuchungen der neutralen und der zwitterionischen Geometrien von Glycin herangezogen werden.^[160] Experimentell konnte nachgewiesen werden, dass die zwitterionische Form in wässriger Lösung etwa 10 kcal/mol stabiler ist als die neutrale, wobei die neutrale Geometrie viel stabiler in der Gasphase als die dipolare zwitterionische Form ist. DFT-Berechnungen unter Verwendung des COSMO-Solvensmodells ergaben eine Energiedifferenz von 10,7 kcal/mol, was in guter Übereinstimmung mit den experimentellen Daten steht. Weiterhin wurde gezeigt, dass die zwitterionische Geometrie nur in der wässrigen Lösung Stabilität aufweist.

3.5 Hybride QM/MM-Methoden

3.5.1 Kraftfeldverfahren

Theoretische Untersuchungen an großen, komplexen Molekülen wie Biomolekülen befassen sich oft mit ihrer Struktur in einer wässrigen Lösung. Wenn die Zusammensetzung als tertiäre Struktur oder Aminosäuresequenz durch eine vorhandene Kristallstruktur bereits bekannt ist, können die Energien für die Geometrien, die den verschiedenen Konformationen, z.B. eines Enzyms, entsprechen, ermittelt werden. Die Kraftfeldverfahren^[121] (Molecular Mechanics, MM) wurden für solche Systeme entwickelt und mit Erfolg eingesetzt.^{[41][161][162][42][163][164]} Im Rahmen des MM-Verfahrens werden die Effekte des Lösungsmittels explizit durch die geeigneten Lösungsmittelmodelle für Wasser wie z.B. TIP3P^[165] und POL3^[166], und viele organische Lösungsmittel berücksichtigt. Die Gesamtenergie des Systems setzt sich in guter Näherung aus Beiträgen einzelner Atome, Atompaare etc. zusammen. In der Näherung des niedrigsten Levels wird angenommen, dass man kaum mehr als 3- oder 4-Atom-Wechselwirkungen braucht, und dass sie nur dann ungleich Null sind, wenn die wechselwirkenden Atome nicht zu weit voneinander entfernt sind. Der Energieterm wird als eine parametrisierte Funktion, deren Parameter nur davon abhängen, zu welchen Typen die wechselwirkenden Atome zugeordnet sind, angenähert:

$$E_{MM} = E_{\text{Bindungsstreckung}} + E_{\text{Winkeldeformation}} + E_{\text{Torsion}} + E_{\text{elektrostat}} + E_{\text{vdW}} \quad \mathbf{3.100}$$

Die einzelnen Beiträge zu der Gesamtenergie E_{MM} werden durch die Energien der Wechselwirkungen von Atompaaren (engl. additive two-body model^[162]) berücksichtigt und können wie folgt geschrieben werden:

$$\begin{aligned} E_{\text{Bindungsstreckung}} &= \frac{1}{2} \sum_{\text{Bindungen}} K_R (R_{ij} - R_{ij,eq})^2 \\ E_{\text{Winkeldeformation}} &= \frac{1}{2} \sum_{\text{Winkel}} K_\theta (\theta_{ij} - \theta_{ij,eq})^2 \\ E_{\text{Torsion}} &= \sum_{\text{Torsionswinkel}} \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\omega - \gamma)]^2 \\ E_{\text{elektrostat}} &= \sum_{\text{nichtgebundene Atompaare } i>j} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_D R_{ij}} \\ E_{\text{vdW}} &= \sum_{\text{nichtgebundene Atompaare } i>j} \left[\frac{A_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{R_{ij}^6} \right] \end{aligned} \quad \mathbf{3.101}$$

Die sogenannten bindenden Wechselwirkungen werden in einfachsten Näherungen durch die Parabel- und Kosinusfunktionen beschrieben. Die nicht-bindenden

Wechselwirkungen werden durch die Coulomb-Kraft als klassische Beschreibung der Elektrostatik und das Lennard-Jones-Potential für die schwachen Dispersionskräfte herangezogen. Die Parameter in den Ausdrücken für die Energiebeiträge (Kraftkonstanten K_r , K_θ und V_n) werden für die kleinere Moleküle mit den höheren *ab initio*-Methoden berechnet und auf die größeren Systeme, wie z.B. Enzyme, teilweise unverändert übertragen. Ähnliches gilt für die Parameter für die nicht bindenden Wechselwirkungen, van der Waals- A_{ij} und London-Kraft B_{ij} , die Dispersionswechselwirkungen zwischen einem Atompaar.^[167] Für die Zuordnung der Partialladung der einzelnen Atomtypen q_i und q_j sowie die Gesamtladung von Atomgruppen (wie z.B. Aminosäurereste, engl. *residues*) werden anspruchsvolle Methoden, die das Anfitzen auf das elektrostatische Potential erfordern, entwickelt.^{[162][168]}

Anwendungen von Kraftfeldverfahren für die Makromoleküle sind computertechnisch schnell, werden jedoch durch die Vernachlässigung der elektronischen Struktur in den meisten Untersuchungen der katalytischen Aktivität der Enzyme auch „schnell“ ungeeignet. Bei den meisten dieser Prozesse werden durch die katalytischen chemischen Reaktionen die Bindungen gebrochen und die neuen erzeugt. Die Beschreibung einer chemischen Reaktion ist nur mit den oben erläuterten quantenmechanischen Ansätzen, wie *ab initio* und DFT, akzeptabel und in sehr guter Näherung ziemlich genau. Da die katalytische Aktivität meistens räumlich an einem sehr kleinen Teil des Enzyms lokalisiert ist, wird dieser durch die Lösung des elektronischen Problems beschrieben, der Rest des Biomoleküls wird mit dem Kraftfeldverfahren behandelt.

3.5.2 QM/MM-Ansätze

Der Ansatz eines QM/MM^[9]-Verfahrens besteht in einer Einteilung des Gesamt-Hamiltonians \mathbf{H}_{Gesamt} und der resultierenden Energie E_{Gesamt} in drei Teile:

$$\begin{aligned}\mathbf{H}_{Gesamt} &= \mathbf{H}_{QM} + \mathbf{H}_{MM} + \mathbf{H}_{QM/MM} \\ E_{Gesamt} &= E_{QM} + E_{MM} + E_{QM/MM}\end{aligned}\tag{3.102}$$

Die ersten zwei Terme in der Gleichung 3.102 beziehen sich auf die Subsysteme QM- und MM-Teil des Gesamtsystems und werden im Rahmen dieser Rechenverfahren evaluiert. Der Kopplungsterm $H_{QM/MM}$ beschreibt Wechselwirkungen zwischen den QM- und MM-Subsystemen im Grenzbereich (engl. *boundary region*). Der QM-Teil wird in dem Rest des Gesamtsystems eingebettet beschrieben. Die Wahl des Einbettungssystems hängt davon ab, welche Wechselwirkungen, die die Kopplung beider Subsysteme aneinander beschreiben, in der QM/MM-Berechnung explizit berücksichtigt werden müssen. Der einfachste Fall ist die Beschreibung nicht-kovalenter Wechselwirkungen eines Liganden mit dem Protein

beispielsweise für Solvatationsfragen. Meistens gehen aber die Aminosäurereste eines aktiven Bereichs des Enzyms eine kovalente Bindung mit dem Liganden ein. In diesem Fall muss die kovalente Grenze zwischen dem QM- und MM-Bereichen mit koppelnden Bindungsstreckungs-, Winkeldeformations- und Torsionsbeiträgen beschrieben werden. Bei der Beschreibung der Ladungstransfereffekte zwischen einem Ligand und einem Protein ist eine gegenseitige Polarisierbarkeit zwischen den QM- und MM-Bereichen unerlässlich. Allgemein unterscheidet man zwischen der mechanischen, elektrostatischen und der polarisierbaren Art der Kopplung bei der QM/MM-Berechnung eines Gesamtsystems.

Die mechanische Einbettung (engl. *mechanical embedding*) des QM/MM-Verfahrens berücksichtigt in der Kopplung alle bindenden und nicht-bindenden Beiträge zwischen den Atomen der QM- und MM-Bereiche. An jedem der QM-Atome werden zusätzliche Kräfte durch die MM-Atome ausgeübt und umgekehrt. Hierbei spüren die Elektronen in ihren Wellenfunktionen keine Ladungen von den Atomen des MM-Bereichs. Den QM-Atomen werden stattdessen Partialladungen zugeteilt und die elektrostatischen Wechselwirkungen in der Grenzregion werden rein klassisch durch die Coulomb-Kräfte beschrieben. Die durch die Sterik verursachten nicht-bindenden Beiträge zwischen den Atompaaren berücksichtigt man mit Hilfe des Lennard-Jones Potentials:

$$\mathbf{H}_{QM/MM} = \sum_a^{MM\text{ Atome}} \sum_b^{QM\text{ Atome}} \frac{Q_a Q_b}{4\pi\epsilon R_{ab}} + \sum_a^{MM\text{ Atome}} \sum_b^{QM\text{ Atome}} \epsilon_{ab} \left[\left(\frac{r_{ab}}{r_{min,ab}} \right)^{12} - 2 \left(\frac{r_{ab}}{r_{min,ab}} \right)^6 \right] \quad 3.103$$

Partielle Ladungen der MM-Atome können anstatt klassisch direkt in dem Hamilton-Operator der QM-Atome einbezogen werden (Gleichung 3.104).

$$\mathbf{V}_{QM/MM} = \sum_a^{MM\text{ Atome}} \frac{Q_a}{|\mathbf{R}_a - \mathbf{r}_i|} \quad 3.104$$

Das entsprechende Matrixelement wird analog dem Ein-Elektronen-Matrixelement in dem Ausdruck der potentiellen Energie der Kern-Elektron-Wechselwirkung in dem HF-Formalismus \mathbf{V}_{ne} beschrieben:

$$\mathbf{V}_{ne} = \sum_a^{Kerne} \int \chi_a(1) \frac{Z_a}{|\mathbf{R}_a - \mathbf{r}_1|} \chi_\beta(1) d\mathbf{r}_1$$

$$\mathbf{V}_{QM/MM} = \sum_a^{MM\text{ Atome}} \int \chi_a(1) \frac{Q_a}{|\mathbf{R}_a - \mathbf{r}_1|} \chi_\beta(1) d\mathbf{r}_1 \quad 3.105$$

In diesem Fall üben Ladungen der MM-Atome die Kraft an den QM-Atomen aus, die die Wellenfunktion ändern. Somit ist die Wellenfunktion durch den MM-Bereich polarisiert und man nennt eine solche Kopplung die elektrostatische Einbettung (engl. *electronic or electrostatic embedding*).

Ein Fall der gegenseitigen Polarisierung, d.h. das elektrische Feld der Elektronen des QM-Bereichs beeinflusst auch die elektrischen Momente des MM-Bereichs (atomare Ladungen und Dipole), ist das höchste Level, mit dem man die Kopplung zwischen den QM- und MM-Bereichen beschreiben kann. Der erste Ansatz der sogenannten polarisierbaren Einbettung (engl. *polarizable embedding*) wurde von A. Warshel und M. Levitt im Jahr 1976 vorgeschlagen.^[169] Der gesamte elektrostatische Beitrag setzt sich zusammen aus den Beiträgen der Wechselwirkungen (WW) zwischen den Ladungen des QM-Bereichs und Dipolen des MM-Bereichs, Dipol-Dipol-Wechselwirkungen aus dem MM-Bereich und einem Beitrag der Verzerrung der Elektronenwolke (induzierter Dipol):

$$\begin{aligned}
 V_{\text{Gesamt,el}} = & - \sum_{i,j} \frac{Q_i(\bar{\mu}_j \cdot \bar{r}_{ij})}{r_{ij}^3} \quad (\text{Ladung} - \text{Dipol} - \text{WW}) \\
 & + \sum_{i>j'} \mu_j \left[\Delta \left(\frac{\bar{\mu}_{j'} \cdot \bar{r}_{j'j}}{r_{j'j}^3} \right) \right] \quad (\text{Dipol} - \text{Dipol} - \text{WW}) \\
 & + \frac{1}{2} \sum_j a_j |\bar{\epsilon}_j|^2 \quad (\text{induzierter Dipol} - \text{WW})
 \end{aligned} \tag{3.106}$$

Diese erste QM/MM-Berechnung enthielt bereits eine iterative Optimierung (SCF) eines lokalen elektrischen Feldes ϵ , und eine Näherung zu der Vereinfachung des SCF-Rechenverfahrens:

$$\begin{aligned}
 \bar{\epsilon}_j &= \sum_i \frac{Q_i \bar{r}_{ij}}{r_{ij}^3} - \sum_{j' \neq j} \Delta \left(\frac{\mu_{j'} \bar{r}_{j'j}}{r_{j'j}^3} \right) \\
 &\cong \sum_i \frac{Q_i \bar{r}_{ij}}{\epsilon(r) r_{ij}^3}
 \end{aligned} \tag{3.107}$$

mit

$$\bar{\mu}_j = a_j \epsilon_j = a_j \sum_i \frac{Q_i \bar{r}_{ij}}{\epsilon(r) r_{ij}^3} \tag{3.108}$$

Somit lässt sich die Gleichung 3.106 zu dem folgenden Ausdruck des elektrostatischen Energiebeitrags vereinfachen:

$$V_{\text{Gesamt,el}} = -\frac{1}{2} \sum_j \bar{\mu}_j \bar{\epsilon}_j \tag{3.109}$$

QM/MM-Berechnungen der Ladungstransferprozesse in Proteinen, die die Berechnung der elektronisch angeregten Zustände erfordern, können aktuell sehr

korrekt durchgeführt werden, da bei der Benutzung der polarisierbaren Kraftfelder wie AMOEBA^[170] mit den *ab initio*- oder DFT-Rechenverfahren eine gegenseitige elektrostatische Kopplung in der Grenzregion gewährleistet wird.^[171]

3.6 Verwendete Programmpakete

Das im Kapitel 1 erläuterte Konzept zur rationalen Entwicklung der maßgeschneiderten kovalent-reversibel hemmenden Inhibitoren (erwähnt im Folgenden als Protokoll) wurde unter der Verwendung folgender Programmpakete realisiert.

Die Untersuchungen auf der Stufe I des Protokolls durch die quantenmechanischen Berechnungen (Kapitel 3, Dichtefunktionaltheorie) in Lösung wurden mit dem Programmpaket TURBOMOLE^[35] durchgeführt. Hierbei wurden die Dichtefunktionale BLYP^{[36][37]} und B3LYP^{[135][134]} eingesetzt. Die Parameter des COSMO-Programms^[159] wurden standardmäßig für die wässrige Umgebung gewählt ($\epsilon = 78,39$).

Die Untersuchungen auf der Stufe II des Protokolls umfassen die Berechnungen der Reaktionspfade und Minimumenergiepfade (MEP)^[12] für die chemischen Reaktionen von Inhibitoren im Zielenzym^{[6][5][13]}. Ein Pfad minimaler potentieller Energie, der zwei Minima verbindet, stellt den Reaktionspfad einer chemischen Reaktion dar. In der vorliegenden Arbeit wird dieser auch als Reaktionsprofil oder Minimumenergiepfad (MEP)^[12] bezeichnet. Der letztere lässt sich durch die Nudged Elastic Band (NEB)-Methode^{[14][15]} und mit Hilfe von Potentialhyperflächen (PES)^[13] darstellen. Diese Berechnungen werden im Rahmen der Born-Oppenheimer-(BO)-Näherung, die die chemischen Umwandlungen darstellen lässt, behandelt. Die Minima dieser MEP und PES entsprechen den Geometrien von stabilen oder metastabilen chemischen Substanzen. Die Reversibilität der Inhibitoren wurde anhand der berechneten chemischen Reaktionen in Form von erstellten Reaktionsprofilen analysiert und diskutiert.

Alle Untersuchungen der Zielenzyme (Stufe II) beginnen mit den MD-Simulationen an den Enzym-Inhibitor-Komplexen und wurden mit dem Programmpaket AMBER 11^{[41][42]} durchgeführt. Das AMBER-Kraftfeld FF99SB^[161] wurde für die Beschreibung der Aminosäurereste der Proteine verwendet. Für die Beschreibung der Inhibitormoleküle wurde das AMBER-Kraftfeld GAFF (General AMBER Force Field)^[172] verwendet. Für alle Inhibitoren in allen nicht-kovalenten als auch kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplexen wurden Parameter mittels des in dem AMBER-Paket enthaltenden Programms Antechamber^{[173][172]} generiert. Hierbei wurde das AM1-BCC-Modell^[174] für die Ermittlung der Atom-Ladungen verwendet. Für die Erstellung der Kraftfeldparameter einer molekularen Einheit, die ein kovalentes Addukt aus dem Inhibitor und den angreifenden Aminosäureresten darstellt, wurde die Kompatibilität der Kraftfelder GAFF (für den Inhibitor-Rest)

und FF99SB (für den Aminosäurerest) innerhalb der LEaP-Anwendung^[173] des AMBER-Programmpakets verwendet. Die Enzym-Inhibitor-Komplexe wurden mit Hilfe der LEaP-Anwendung *SolvateCap*^[173] mit TIP3P^[165]-Wassermodell solvatisiert.

Alle produktiven MD-Simulationen (in Ergebnissen und Diskussionen als MD-Simulationen erwähnt) der Enzym-Inhibitor-Komplexe wurden in der Wassersphäre relevanter Schichtdicke, die ausreichend lang equilibriert wurde, durchgeführt. Die Equilibrierung der Wasserhülle wurde für eine ausreichende Simulationsdauer in mehreren Schritten durchgeführt. Diese gewährleisteten zum einen, die schrittweise Erwärmung des Enzyms im expliziten Solvens bis zur Temperatur von 300 K (Temperatur des lebenden Organismus).^[175] Zudem wurden an das Solvens Einschränkungsregeln in Form eines harmonischen Potentials angewendet, dessen Stärke (Kraft-Parameter) schrittweise sank und am Ende der Equilibrierung kein harmonisches Potential angewendet wurde.^[176] Nach der Equilibrierung wurden sogenannte produktive Molekulardynamik-(MD)-Simulationen bei konstanter Temperatur und Volumen (klassische Dynamik eines NVT-Ensembles)^[177] unter der minimalen Dauer von 5 ns durchgeführt. Die konstante Temperatur konnte mit Hilfe des Langevin-Thermostats^{[178][173]} gewährleistet werden. Für den konstanten Erhalt des Volumens wurde das sphärische Grenzpotential (Enzym im sogenannten Tröpfchenpotential, *SolvateCap*^[173]) angewendet.

Die Analyse und visuellen Charakterisierungen der MD-Simulationen wurden mit dem Programm VMD^[87] und in dem AMBER-Paket beinhalteten Hilfsprogrammen (xleap, ptraj, etc)^[173] ausgeführt.

Alle QM/MM-Berechnungen wurden mit dem CHEMSHELL^{[43][179]}-Programmpaket in Kombination mit dem TURBOMOLE^[35]-Programm der Version 6.5 durchgeführt. Die Atome des MM-Bereichs wurden mit Parametern des AMBER-Kraftfelds mit Hilfe des DL-POLY-Moduls^[180] von CHEMSHELL^{[43][179]} behandelt. Zur Ausführung aller Energie- und Gradientenberechnungen zur Geometrieoptimierung der Atome des aktiven Bereichs wurde das DL-FIND-Modul^{[21][181][43]} verwendet. Wechselwirkungen zwischen dem QM- und MM-Bereich wurden im Rahmen des elektrostatischen Embedding-Ansatzes^{[182][9][10][11][123]} beschrieben. Hierbei wurden die Bindungen der Grenzbereiche der QM- und der MM-Regionen mit Hilfe der Linkatome- und der Ladungsverschiebungs-Ansätze, wie es in CHEMSHELL^{[43][179]}-Programmpaket implementiert ist, behandelt.^[183]

II

Ergebnisse und Diskussion

Kapitel 4: Entwicklung kovalent-reversibler Inhibitoren für die humane Golgi- α -Mannosidase

4.1 *skew-Boot*-Konformation als die bioaktive Konformation der bicyclischen Acetal-Kopfgruppe

Zu Beginn der Untersuchungen wurde die Stabilität und Relevanz des nicht-kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplexes (E···I-Komplex) des Enzyms GM II und des bicyclischen Acetal-Inhibitors mit Hilfe klassischer Molekulardynamik-(MD)-Simulationen evaluiert. Als Startgeometrie des E···I-Komplexes (Abbildung 4.1, a) wurde die mit dem bicyclischen O,O-Acetal besetzte katalytische Tasche des Enzyms GM II, welche in den kristallographischen Daten unter der PDB-ID 3D4Y^[79] vorhanden ist, ausgewählt. Die Geometrie des O,O-Acetals wurde durch ein Docking-Experiment eruiert (Arbeitsgruppe Prof.Dr. J. Seibel^[16]). Hierbei handelt es sich um die ideale Sessel-Konformation des Pyranose-Ringes, die nach der Stoddard-Nomenklatur^{[184][185]} der ⁴C₁-Bezeichnung (Abbildung 4.2, a) entspricht. Die für diese Arbeit relevanten Konformationen sind in der Abbildung 4.2 dargestellt.¹

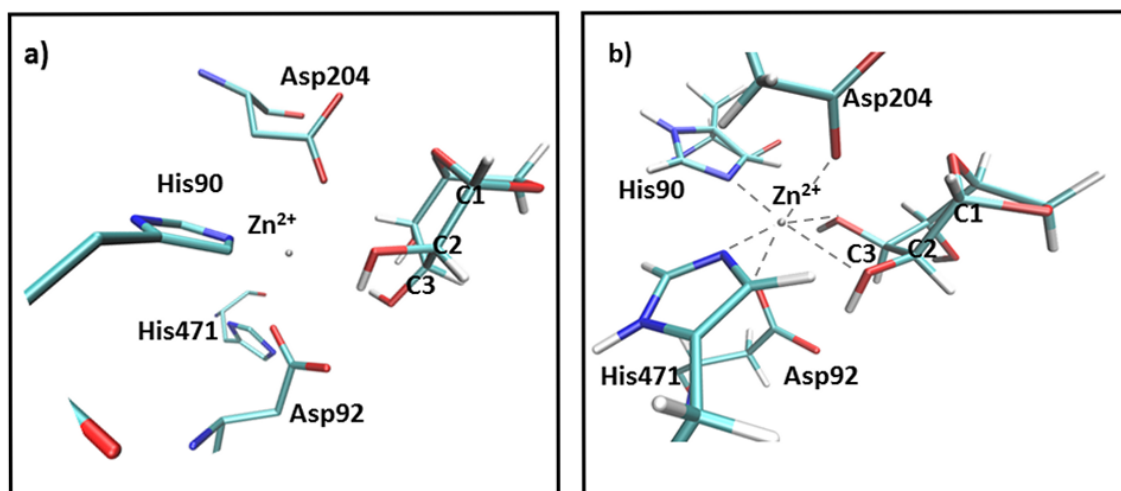


Abbildung 4.1: Vergleich der nicht-kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplexe a) vor der MD-Simulation (aus Docking): keine Koordination mit dem Zn-Dikation möglich und b) nach der MD-Simulation: Koordination des Liganden zum Zn-Dikation ist durch die Hydroxy-Gruppen der C2 und C3 Atome erreichbar.

Als Ergebnis der klassischen MD-Simulation wurde die neue Geometrie des E···I-

¹Alle möglichen Konformationen des Pyranose-Ringes und deren Transformationen nach der Stoddard-Nomenklatur können in der Arbeit der Arbeitsgruppe von Prof.Dr. Moremen K.W.^[186] nachgeschlagen werden.

Komplexes erhalten (Abbildung 4.1, b)). Die Geometrie des O,O-Acetal-Inhibitors zeichnet sich durch die verzerrte Boot-Konformation aus und wird im Weiteren als Twist-Boot-Konformation des O,O-Acetal-Inhibitors diskutiert. Nach der Stoddard-Nomenklatur liegt diese zwischen den Geometrien der korrekten Boot-Konformation ${}^{0,3}B$ und der schiefen Boot-Konformation, die sogenannten *skew-boat*-Konformation 1S_3 .

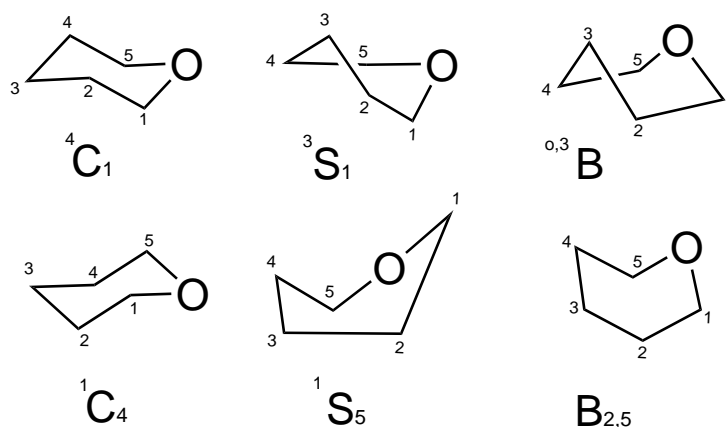


Abbildung 4.2: Die ausgewählten Geometrien der Konformationen des Pyranose-Ringes mit den Bezeichnungen der Geometrien nach der Stoddard-Nomenklatur. C: chair, B: Boot, S: skew-boat.

Die charakteristischen Bindungs- und Diederwinkel für die Inhibitoren O,O- und N,O-Acetal, die mit Hilfe der MD-Simulationen erhalten wurden, sind in Tabelle 4.1 aufgeführt.

Tabelle 4.1: Charakteristische Bindungs- und Diederwinkel der X,Y-Acetal-Inhibitoren (Abbildung 4.5), gemessen an den Geometrien der Enzym-Inhibitor-Komplexe.

Diederwinkel / Winkel	X,Y-Acetal-Inhibitor	
	O,O-Acetal	N,O-Acetal
O1/N-C5-C4-C3	-29,5	-6,4
O1/N-C1-C2-C3	3,6	18,1
O1/N-C5-C4	108,1	111,6
O1/N-C1-C2	113,5	115,9

Die Erkenntnisse über die verzerrten Geometrien der Inhibitoren O,O- und N,O-Acetal werden durch quantenchemische Berechnungen am Substrat des Enzyms GM II^[187] und an E-I-Komplexen einer parasitären α -Mannosidase der invertierenden Familie GH47 untermauert.^[188] Die Ersten zeigen, dass die Geometrie des

Übergangszustands der katalytischen Glycosylierung ebenfalls einer verzerren Boot-Konformation entspricht.^[187] Hierbei liegt diese zwischen den Geometrien – die ideale Boot-Konformation $B_{2,5}$ und die *skew*-Boot-Konformation 1S_5 – vor. Die Zweiten beschreiben einen ähnlichen wie bei GM II gefundenen E···I-Komplex, welcher die verzernte Geometrie des sechsgliedrigen Liganden in der Form ${}^{0,3}B / {}^1S_3$ ^[188] enthält. Die Untersuchungen an β -Mannase der retardierenden Familie GH26 weisen darauf hin, dass abhängig vom Ligand auch die gegenseitige Umwandlung zwischen $B_{2,5}$ - und 1S_5 -Konformationen möglich ist.^[189]

Analysiert man den nicht-kovalenten Enzym-Inhibitor Komplex mit dem Inhibitor in der Sessel-Konformation innerhalb des aktiven Zentrums der GM II, erkennt man eindeutig, dass das Gerüst des Inhibitors keine Kontaktstellen mit der Tasche aufweist (Abbildung 4.3). Die Metallbindung zwischen dem Zink-Dikation und den vicinalen Hydroxy-Gruppen des Inhibitors in der Twist-Boot-Konformation stellt den einzigen stabilisierenden Beitrag zu der nicht-kovalenten Bindung des nicht-kovalenten E-I-Komplexes dar und ist vollkommen kompetitiv der analogen Bindung zum Substrat.

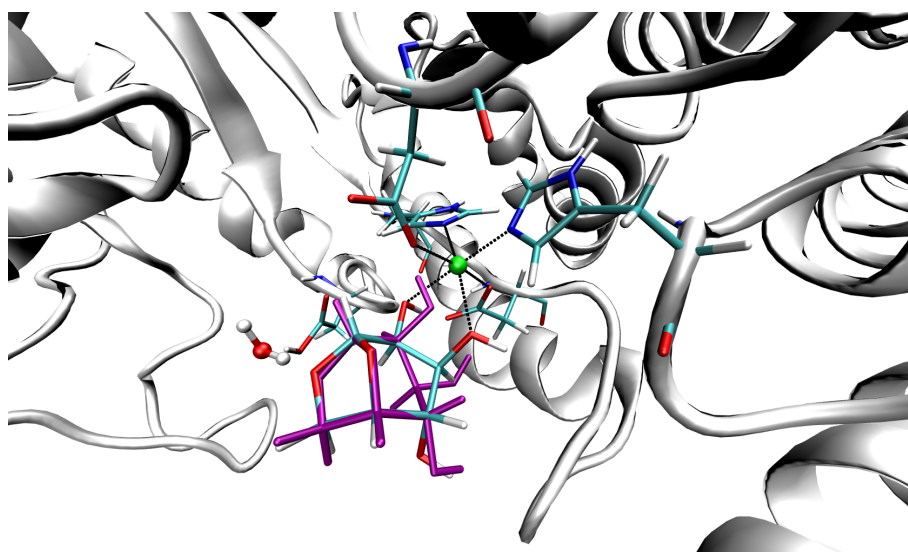


Abbildung 4.3: Vergleich der Konformationen des Inhibitors in der aktiven Tasche der GM II. Inhibitor in der Sessel-Konformation ist mit der Farbe „magenta“ hervorgehoben. Die Geometrie des Inhibitors in der Twist-Boot-Konformation und die Aminosäurereste des aktiven Zentrums sind mit Hilfe der CPK-Darstellung hervorgehoben. Die Metallbindungen (H-Bindungen) sind durch die Punkt-Linien angedeutet. Inhibitor in der Sessel-Konformation (magenta) sitzt nicht optimal in der Tasche, da die Metallbindungen zum Zink-Dikation (hell-grün) geometrisch gehindert sind.

Die QM/MM-Berechnungen am Enzym-Substrat-Komplex der dGM II durch Reilly *et al.*^[94] bestätigen die koordinative Bindung des Substrat-Modells zum Zink-Dikation durch die vicinalen Hydroxy-Gruppen. Diese koordinative Bindung trägt dazu bei, dass das katalytische Zentrum durch ein oktaedrisches Polyeder sta-

bilisiert wird. Die Übereinstimmungen mit den verwandten biologischen Systemen finden sich auch hier. Im Fall der invertierenden Glycosidase der Familie 47 im Komplex mit dem Substrat ist die ähnlich verzerrte Boot-Geometrie des Substratmoleküls durch die zweifache Koordinierung zu dem strukturellen² Calcium-Dikation nicht kovalent gebunden.^[188] Die Begünstigung zur oktaedrischen Anordnung der aktiven Tasche um das strukturelle Kation lässt sich durch die zusätzlichen nicht-kovalenten Wechselwirkungen zum Koordinationsmetall aufgrund der Verzerrung der Boot-Konformation in der Geometrie des Substrats erklären.^[188]

Diese in der Literatur gefundenen Ergebnisse bestärken die Wahl des O,O-Acetals als geeigneten Kandidaten für einen Inhibitor, der die humane GM II kompetitiv hemmt.

Die Gründe für die Ausbildung des E \cdots I-Komplexes in der energetisch ungünstigeren Konformation, wie im Folgenden gezeigt wird, können dahingehend erklärt werden. Im Fall des cyclischen O,O-Acetals ist der Einfluss des anomeren Effekts auf die Hydroxygruppen des Pyranose-Ringes verschwindend gering. Dagegen gewinnen die sterischen Faktoren eines Sechsrings an Bedeutung. Im Allgemeinen sind große Substituenten in der äquatorialen Position des gesättigten Sechsrings günstiger als in der axialen. Die cyclische β -L-Anhydrogulose in der Sessel-Konformation enthält zwei äquatoriale gegenüber nur einer einzigen äquatorialen Position in dem Twist-Boot Liganden. Die Änderung der Konformation von Boot zu Twist-Boot findet durch die partielle Ringinversion oder Ring-Flip des Sechsrings statt.^[190] Die letzte Konformation ist, wie bereits erklärt, weniger stabil, erlaubt aber die sechsfache Koordination des strukturellen Zink-Dikations. In der verzerrten Konformation kann der Inhibitor das Substratmolekül gut nachahmen. Das elektrophile Zentrum des Liganden (C1-Atom) und das nukleophile des Enzyms (Sauerstoff-Atom des Aspartat Asp204 Aminosäurerests) befinden sich räumlich sehr nahe. Als Folge kann aus diesem nicht-kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplex die chemische Reaktion zwischen dem C1-Atom des Liganden und dem Aspartat Asp204 Aminosäurerest stattfinden. Der Inhibitor β -L-Anhydrogulose befindet sich offensichtlich im nicht-kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplex in seiner bioaktiven Konformation.

Die Geometrie einer bioaktiven Konformation entspricht meistens nicht dem globalen Minimum auf der Potentialhyperfläche. Die Geometrien des O,O-Acetal-Inhibitors wurden in der Sessel- und in der Twist-Boot-Konformationen analysiert und die relative Energie zwischen den beiden ermittelt. Es wurden jeweils Sessel- und Twist-Boot-Geometrien des Liganden mit verschiedenen Methoden

²Ein Metall-Kation, welches durch die nicht-bindenden Wechselwirkungen in einer Tasche des Enzyms ein Koordinationspolyeder bildet, wird im Bereich der Biochemie als ein strukturelles Kation bezeichnet.

optimiert (Tabelle 4.2). Die Geometrieoptimierung der Twist-Boot-Geometrie mit Dichtefunktionalmethode BLYP^{[36][37]} in Kombination mit dem Basissatz TZVP^[38] resultiert in einer Sesselkonformation (Start: t-b, Ergebnis: s in Tabelle 4.2). In allen weiteren Optimierungen der Startgeometrie des Inhibitors in der Twist-Boot-Konformation wurde jeweils die Twist-Boot-Geometrie als Minimum erhalten. Dies lässt deutlich erkennen, dass die Twist-Boot-Konformation ein lokales Minimum darstellt und einer bioaktiven Konformation entspricht. Ändert sich die Geometrie von der Twist-Boot- zu der Sesselkonformation nicht (Start: t-b, Ergebnis: t-b in Tabelle 4.2), so ist die Differenz zwischen den Konformeren je nach Methode bei ca. -10 kcal/mol mit der BLYP^{[36][37]}/TZVP^[38]- und ca. -11 kcal/mol mit der Kraftfeld-Methode AMBER^{[41][42]} (mit Berücksichtigung der Solvenseffekte (Born Modell)) . Die höhere Stabilität der Sessel-Konformation gegenüber der Twist-Boot-Geometrie wurde mit Hilfe der Kraftfeld-Methode korrekt reproduziert. Dies trifft dagegen nicht zu, wenn das semi-empirische PM3-Potential zum Einsatz kommt. Ein analoges Erfolg-Misserfolg-Verhältnis ist für das BLYP Dichtefunktional zu beobachten, wobei die polaren Effekte des Lösungsmittels (Vakuum/COSMO^[159]) eine größere Rolle zu spielen scheinen. Werden durch die Optimierung nur die Hydroxy-Gruppen durch die Rotationen beansprucht, wie in der Startstruktur der Sessel-Geometrie, liegt diese kleine Änderung energetisch etwa unter einem kcal/mol (Abbildung 4.4).

Generell gehen die Vollacetale, d.h. nicht-cyclische Vollacetale, die Hydrolyse-spaltung ein. Deswegen muss der Aspekt der Hydrolysestabilität an dieser Stelle beleuchtet werden. Stabilität und Reaktivität der Saccharide wird grundsätzlich durch den anomeren Effekt des Tetrahydropyran-Rings gesteuert. Die cyclische β -L-Anhydrogulose ist nicht nur ein Kohlenhydrat, sondern ein bicyclisches Acetal. Das O6-Atom wird weder die axiale (der anomere Effekt ist hier nicht von Bedeutung) als auch die äquatoriale Position durch die fünffache Ringspannung einnehmen können. Da die C1-O6 Bindung nicht axial zu den freien Elektronenpaaren des O1-Atom steht, kann die Hydrolyse, d.h. eine freiwillige C1-O6-Bindungsspaltung durch den nukleophilen Angriff des Wassermoleküls erschwert stattfinden. Zusätzlich steht das axiale freie Elektronenpaar des O6-Atoms parallel oder anti-periplanar zur C1-O1-Bindung. Deswegen kann das freie Elektronenpaar des O6-Atoms in das tiefliegende antibindende Orbital der C1-O1-Bindung (σ^*) die Elektronendichte bereitstellen und das O,O-Acetal Molekül durch die stereoelektronischen Effekte zusätzlich stabilisieren.^[190]

Tabelle 4.2: Vergleich der Konformationen des Inhibitors mit Hilfe der Methodenvariation. ΔE ist die Differenz zwischen der optimierten Geometrie (**fett**) innerhalb der Methode. **s**: Sessel, **t-b**: Twist-Boot. *opt*: Geometrieoptimierung, *sp*: Energieberechnung.

Methoden	Geometrie		ΔE
	Start	Ergebnis	kcal/mol
QM(DFT)			
BLYP ^{[36][37]} /TZVP ^[38] //B3LYP/TZVP ^[38] (opt//sp)	s t-b	s s	-0,76
BLYP//B3LYP/ COSMO (opt//sp)	s t-b	s t-b	-6,68
B3LYP(opt)	s t-b	s t-b	-8,90
B3LYP(opt)/ COSMO	s t-b	s t-b	-6,68
B3LYP/TZVP//SCS-MP2	s t-b	s t-b	-10,52
B3LYP/TZVP//SCS-MP2/ COSMO	s t-b	s t-b	-8,13
Semi-Empirisch			
AM1	s t-b	s t-b	-6,1
PM3(opt)	s t-b	s t-b	1,7
MM(Kraftfeld)			
AMBER ^{[41][42]}	s t-b	s t-b	-7,7
AMBER(Born Modell) ^{[41][42]}	s t-b	s t-b	-11,1

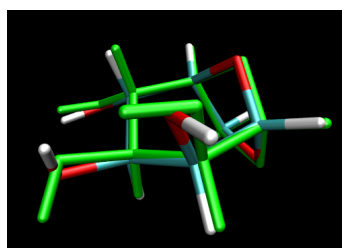


Abbildung 4.4: Liganden der Sessel-Konformation mit der Energiedifferenz von 0,76 kcal/mol in der Tabelle 4.2. CPK-Darstellung: Ligand aus der Docking-Berechnung (Startstruktur)^[16], grün: optimierter Ligand berechnet mit BLYP^{[36][37]}/TZVP^[38].

4.2 Reaktionsenergien der Inhibitoren für GM II (bicyclische Acetale) in Lösung

Die Entwicklung von kovalenten und reversiblen Inhibitoren (hier im Stadium als reaktive Kopfgruppen oder Leitstrukturen) des humanen Enzyms Golgi α -Mannosidase II (GM II) wurde im Rahmen des *in-house* Protokolls^{[6][5]} zum rationalen Wirkstoffdesign durchgeführt. Auf dem ersten Schritt dieser – QM-Modell-Berechnungen in wässriger Lösung – wurde die Thermodynamik der Inhibitionsreaktion (Gesamtreaktionsenthalpie) abgeschätzt. Das katalytische Aminosäure-Paar der Mannosidase GM II Asp312-Asp204 wurde im Rahmen des Standardverfahrens zum Acetat-Anion-Essigsäuremolekül-Paar angenähert. Unter Anwendung des Hess'schen Satzes in dieser Näherung lässt sich die Reaktionsenergie der Inhibition als ΔE_{Rx} , wie in Abbildung 4.5 skizziert, darstellen.

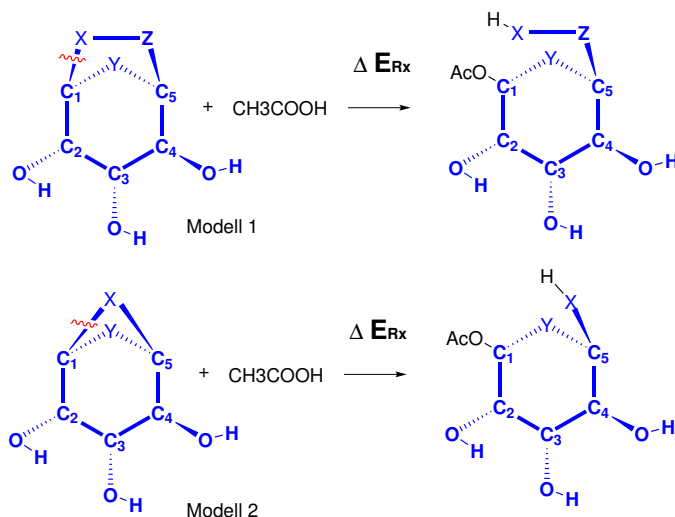


Abbildung 4.5: Molekulare Formeln der bicyclischen Acetal-basierten Inhibitoren (Modell 1 und Modell 2). Schematische Darstellung zur Berechnung der Reaktionsenergien ΔE_{Rx} (Thermodynamik) der Inhibitionsreaktion des Enzyms GM II untersucht auf dem Screening-Schritt QM-Modell-Berechnungen in wässriger Umgebung.

Dieses Modell für die Enzymreaktion mit dem bicyclischen Inhibitor stellt eine sehr gute Näherung in Lösung dar aufgrund der Tatsache, dass der minimale QM-Bereich einer QM/MM-Berechnung genau denselben Bereich darstellt: Den Inhibitor mit einem Acetat-Anion-Essigsäuremolekül-Paar. Das Letztere kann im Enzym als ein internes Puffersystem zur Protonübertragung betrachtet werden. Im QM-Modell werden die räumlichen Protonübertragungen nicht betrachtet, sondern nur die Produkt-Geometrie und die energetischen Beiträge zur Gesamtthermodynamik. Demzufolge wurden auf dem Screening-Schritt die Reaktionsenergien der Produktbildung ΔE_{Rx} , wie in der Abbildung 4.5 gezeigt, ermittelt.

Insgesamt wurden zwei Typen der Liganden - Modell 1 und Modell 2 - für die Reak-

tionsenergie in Lösung evaluiert (Abbildung 4.5). Im Modell 2 wurde der Fünfring durch den Vierring (Modell 1) substituiert um den Einfluss von Triebkraft der Ringöffnung des gespannten Ringes auf den Energiegewinn zu untersuchen (Tabelle 4.4). Der Screening-Schritt stellt in diesem Fall die Evaluierung der bicyclischen Inhibitoren in Abhängigkeit von X -, Y - Heteroatomen sowie Substituentenmuster am Atom X (Tabelle 4.3) auf die Reaktionsenergie mit dem Essigsäuremolekül dar. Die Reaktionsenergie des bicyclischen N,O-Acetal-Inhibitors wurde in zwei Protonierungszuständen ermittelt (Abbildung 4.6). Hierbei wurde die Relevanz der protonierten Form des N,O-Acetal-Inhibitors eindeutig gezeigt. Die Reaktionsenergien, die durch die QM-Modell-Berechnungen der Inhibitionsreaktion der GMII durch die β -L-Anhydrogulose-basierte Inhibitoren erhalten wurden, sind in der Tabelle 4.3 zusammengefasst.

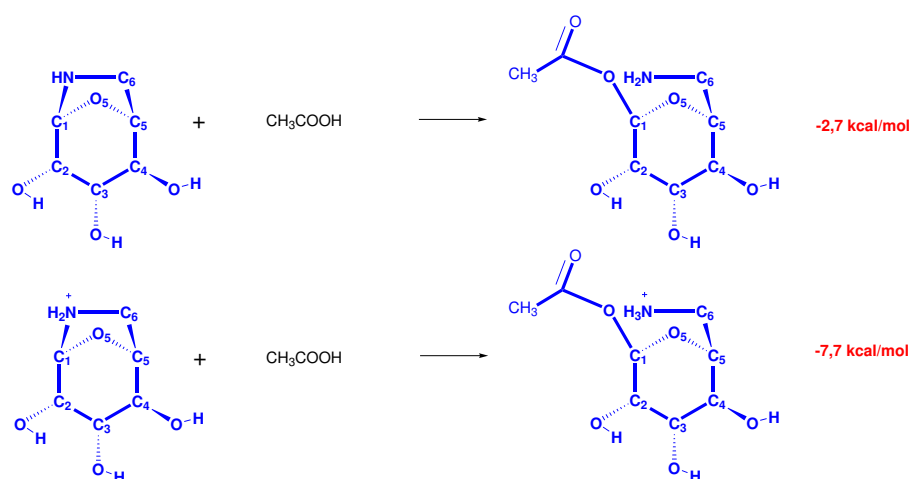


Abbildung 4.6: Schematische Darstellung zur Berechnung der Reaktionsenergien (Thermodynamik) der Inhibitionsreaktion des Enzyms GM II am Beispiel des bicyclischen N,O-Acetal-Inhibitors.

Obere Zeile: deprotonierte Form des Inhibitors, untere Zeile: protonierte Form des Inhibitors. Die Reaktionsenergien wurden mit $RI^{[33][34][35]}-BLYP^{[36][37]}/def-TZVP^{[39][38]}$ mit $COSMO^{[158][160]}$ ($\epsilon = 78,39$) berechnet.

Die Ergebnisse der Berechnungen für Modell 1 zeigen thermoneutrale und leicht endotherme bis leicht exotherme Reaktionsenergien und sagen eine reversible Hemmung des aktiven Zentrums der GM II durch die Leitstrukturen Nr. **7**, **9** und **14** vorher (Tabelle 4.3). Analoge Berechnungen an dem Modell 2 ergaben höhere Exothermie der Additionsreaktion (Energiegewinn) und somit die höhere Effektivität der Inhibition durch die Additionsreaktion für diesen Schritt des Protokolls. Der Test des Letzteren im aktiven Zentrum mit Hilfe der QM/MM-Methode ergab im Fall des O,O-Acetal-Inhibitors den Zusammenbruch des Produktes der Additionsreaktion. Die Geometrie des Ziel-Esters scheint im kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplex nicht stabil zu sein: Der Vierring wandelt sich hier

in zwei Carboxylgruppen um, wenn der katalytische Aspartatrest näher als 2,3 Å zum elektrophilen C₁ Atom des Inhibitors steht. Aus diesem Grund wurden die Inhibitor-Kandidaten des Modells 2 verworfen. Die Ergebnisse für das Modell 1 im Enzym wurden mit dem QM/MM-Ansatz untersucht und werden im nächsten Abschnitt erläutert.

Tabelle 4.3: Reaktionsenergien ΔE_{Rx} (in kcal/mol) der Additionsreaktion in wässriger Lösung mit variablen X, Y und Z Heteroatomen für das Modell 1. Die Berechnungen wurde jeweils mit RI^{[33][34][35]}-BLYP^{[36][37]} / def-TZVP^{[39][38]} durchgeführt unter Verwendung des impliziten Solvensmodells COSMO^{[158][160]} mit den Parametern für Wasser ($\epsilon = 78,39$).

Inhibitor- nummer	Substituent			ΔE_{Rx} in kcal/mol
	X	Y	Z	
1	O	O	CH ₂	0,2
2	S	S	CH ₂	5,0
3	O	S	CH ₂	-1,9
4	O	NH	CH ₂	-1,9
5	O	NH ₂ ⁺	CH ₂	4,5
6	NH	O	CH ₂	-2,7
7	NH ₂ ⁺	O	CH ₂	-7,7
8	HN	S	CH ₂	-0,7
9	NH ₂ ⁺	S	CH ₂	-5,5
10	NH	NH	CH ₂	-4,0
11	NH ₂ ⁺	NH	CH ₂	-2,8
12	NH ₂ ⁺	NH ₂ ⁺	CH ₂	3,4
13	N-CH ₃	O	CH ₂	1,3
14	HN ⁺ -CH ₃	O	CH ₂	-6,4
15	N-COH	O	CH ₂	-3,4

Tabelle 4.4: Reaktionsenergien ΔE (in kcal/mol) der Additionsreaktion in wässriger Lösung mit variablen Heteroatomen X und Y für das Modell 2. Die Berechnungen wurde jeweils mit RI^{[33][34][35]}-BLYP^{[36][37]}/def-TZVP^{[39][38]} durchgeführt unter Verwendung des impliziten Solvensmodells COSMO^{[158][160]} mit den Parametern für Wasser ($\epsilon = 78,39$).

Inhibitor- nummer	Substituent		ΔE_{Rx}
	X	Y	in kcal/mol
1'	O	O	-12,9
2'	S	NH	-2,0
3'	S	NCHO	-1,1
4'	NH	S	-7,7
5'	NCHO	S	-8,3
6'	NH	O	-15,1
7'	NCHO	O	-16,1
8'	O	NH	-11,7
9'	O	HCHO	-12,4

4.3 Reaktionsenergien der neuen Inhibitoren der Mannosidase GM II - bicyclische Acetal-Inhibitoren im Enzym

Die bisherigen Untersuchungen zur Inhibition der humanen Mannosidase GM II durch Verbindungen der bicyclischen X,Y-Acetale ergaben die potentiellen Kandidaten in einer wässrigen Lösung. Die Leitstruktur (O,O-Acetal-Inhibitor) ergab für die erste Stufe des Protokolls eine vollkommen thermoneutrale Reaktion mit dem Essigsäuremolekül. Der Inhibitor Nr. **7** (N,O-Acetal-Inhibitor) zeigte eine bessere Triebkraft in der wässrigen Lösung im Vergleich zu der Leitstruktur (siehe Abbildung 4.5 und Tabelle 4.3). Die QM/MM-Berechnungen für den MEP dieser zwei Kandidaten berücksichtigen den Einfluss der Enzymumgebung und überprüfen die thermodynamischen Daten auf Relevanz der Inhibition. Nicht nur die räumlichen Einflüsse der aktiven Tasche, sondern auch der explizite Einsatz der Wassermoleküle in der Inhibitionsreaktion wurde in diesem Teil der Arbeit berücksichtigt.

Die Untersuchung am System GM II unterteilt sich in zwei Teile. Im ersten Teil wurde der MEP des O,O-Acetal-Inhibitors, der als Leitstruktur im Zyklus der Inhibitorentwicklung diente, aufgestellt. Die Informationen über den Reaktionsverlauf der Leitstruktur im Enzym werden hier als Referenzdaten angesehen. Der zweite Teil präsentiert den MEP des Inhibitors Nr. **7** und Diskussion über den Reaktionsmechanismus durch einen direkten Vergleich mit dem Referenzsystem.

4.3.1 Ansätze und technische Details der Berechnungen

Die Berechnungen der MEP wurden für beide Inhibitoren (N,O- und O,O-Acetal-Inhibitor) konsistent ausgehend von einem nicht-kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplex, der eine Startgeometrie der Berechnungen darstellt, durchgeführt. Die Erstellung von Startgeometrien wurde mit Hilfe der MD-Simulation erzielt. Auf die technischen Details der QM/MM-Berechnungen und der MD-Simulationen wird im Folgenden detailliert eingegangen.

Technische Details der MD-Simulationen

Aufgrund der bedeutenden Größe der Kristallstruktur von GM II (PDB code: 3D4Y^[79]) mit 1016 Aminosäureresten wurde diese nicht komplett solvatisiert. Stattdessen wurde die Sphäre mit dem TIP3P^[165]-Wassermodell mit einem Radius von 24,0 Å um das C1-Atom des Inhibitors verwendet um die Solvens-Effekte der aktiven Tasche des Enzyms und deren direkte Umgebung explizit zu berücksichtigen. Die Wassersphäre wurde mit Hilfe des *solvateCap*-Befehls

des AMBER Tools 11^[173] innerhalb des AMBER-Programmpakets^[41] präpariert. Die sechs Aminosäurereste, die zum strukturellen Zink-Dikation koordinieren, bilden insgesamt das ladungsneutrale aktive Zentrum: die Histidinaminosäurereste His90 und His471 sind in der neutralen und die Aspartataminosäurereste Asp204 und Asp92 in der deprotonierten Form gesetzt. Der Aspartataminosäurerest Asp341 wurde entsprechend der beschriebenen Reaktionsroute in seiner protonierten Form eingesetzt (Abbildung 2.10). Sechs Natrium Kationen wurden dem System hinzugefügt, um es ladungsneutral zu behandeln. Der Inhibitor wurde unter Verwendung des General-Amber-Force-Field-(GAFF^[191])-Kraftfelds des AMBER Kraftfeld-Pakets (Version 11)^[41] parametrisiert. Hier wurde zur Ladungsbeschreibung AM1-BCC, eine semiempirische Methode, gewählt.^[172] Das Zink-Dikation wurde als strukturgebendes Metall innerhalb des nichtbindenden Modells behandelt.^[192] Es werden keine bindenden Parameter eines Metall-Ions mit den Akzeptor-Atomen der koordinierenden Aminosäureresten berücksichtigt. Dies entspricht einer Beschreibung nur über nicht-bindende Wechselwirkungen (die van-der-Waals- und die Coulomb-Wechselwirkungen) in der Kraftfeldbeschreibung. Folgende Parameter wurden von Hoops *et al.* in der Beschreibung des Lennard Jones Potentials verwendet: Van der Waals Radius $R = 1,10 \text{ \AA}$ und die Tiefe des 6-12 Potentials $\epsilon = 0,0125 \text{ kcal/mol}$.^[193]

Die Prozedur der MM-Berechnungen, inklusive die MD-Simulation, wurde in mehreren Schritten durchgeführt. Nach einer Minimierung des System mit 200 *steepest descent* und 300 *conjugate gradient* Schritten ohne Fixierungen (auch *constraints*)³ wurde eine Equilibrierung des Systems unter folgenden Bedingungen durchgeführt: das NVT Ensemble^[177] mit der Langevin Dynamik für die Temperaturkontrolle (Langevin-Thermostat)^{[178][194]}. Die Prozedur für die Equilibrierung der Solvathülle entspricht dem State of the Art aus der Literatur.^{[175][176][177][195]} Hierbei wurde während des schrittweisen Aufheizens des gesamten Systems auf die Temperatur von 300 K ein harmonisches Potential auf die Schweratome des Proteins und den gesamten Inhibitor angewendet.^[196] Dabei wurde die Kraftkonstante mit jedem der insgesamt acht Schritte so lange verkleinert, bis im letzten, neunten Schritt keine Einschränkung der molekularen Bewegung vorlag (im ersten der Schritte dürfen sich lediglich Solvens- und Gegenion-Teilchen bewegen). Der letzte Schritt einer solchen Equilibrierung, welche eine Dauer von 100 ps (= 0,1 ns, 50 000 MD-Schritte, mit Dauer 2 fs pro Schritt) besaß, zeigte sehr stabile Geometrien bezüglich der Änderungen im System. Um die Equilibrierung zu finalisieren, simuliert man im Regelfall anschließend noch zusätzlich 1 ns. Im finalisierenden Schritt wurde allerdings ein Artefakt an dem neutralen As-

³Berechnungen durch Petersen *et al.*^[94] verwenden Fixierungen an den Atomen des Proteins und Substrats in den ersten Schritten der Minimierung um zunächst die Solvens-Moleküle zu optimieren.

partataminosäurerest Asp341 beobachtet: der Hydroxy-Rest der Carboxylgruppe zeichnete sich durch einen uncharakteristischen Winkel aus (Abbildung 4.7). Der artifizielle Winkel des Aspartatrests Asp341 wird vermutlich durch die Wasserstoffbrückenbindungen zu den Aminosäureresten Asp92 und Tyr269 verursacht, da das Auffüllen der aktiven Tasche mit Wassermolekülen mit Hilfe des Standard-Algorithmus des AMBER Kraftfeld-Pakets in der Regel nicht optimal ist. Die in diesem Schritt entstandene Geometrie des E-I-Komplexes enthält kein Wassermolekül zwischen dem Aspartataminosäurerest und dem Inhibitor, anders wie es mit dem Enzym-Substrat-Komplex bekannt ist. Die dadurch entstehende aktive Tasche ist ebenfalls artifiziel, denn die Anordnung des Aspartatrests Asp341 kann die Protonübertragung nicht unterstützen. Somit verliert der „protonierte“ Aspartataminosäurerest die Funktionalität als Protonquelle oder Säure im katalytischen Säure/Base-Mechanismus.

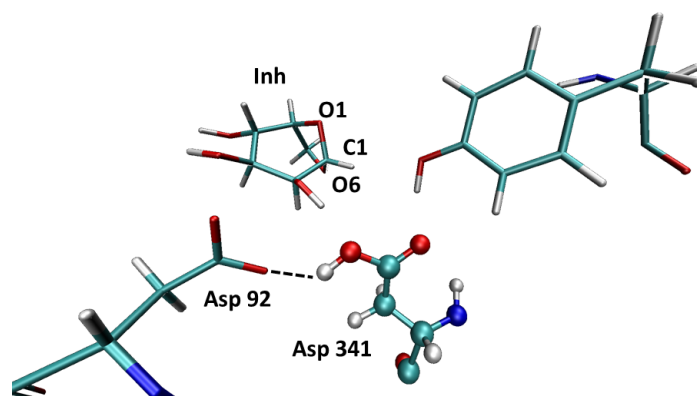


Abbildung 4.7: Artefakt des Aspartataminosäurerests Asp341 aufgrund der direkten Wasserstoffbrücke zwischen den Aspartataminosäureresten Asp92 und Asp341.

Die Artefaktbildung lässt sich durch die misslungene Equilibrierung erklären. Die Wassermoleküle der hydrierten Startgeometrie konnten nicht nahe genug dem aktiven Zentrum angeordnet werden und wurden in dieser für den Mechanismus ungünstigen Anordnung weiter in der Simulation zeitlich entwickelt. Um dieses Problem zu lösen, wurde eine MD-Simulation durchgeführt, die ein optimales Netzwerk aus Wassermolekülen in aktivem Zentrum ausbildet und gleichzeitig günstige Wechselwirkungen zu den Aspartatresten zeigt. Hierbei wurde an den naheliegenden Wassermolekülen und Aspartatresten des aktiven Zentrums die *rst*-Option des Kraftfeldes angewendet (Siehe Skript 6.1 in Kapitel 6 Anhänge). Die molekularen Parameter werden durch das harmonische Potential um den angegebenen Gleichgewichtswert relaxiert^{[197][196]}. Die Wassermoleküle der aktiven Seite wurden somit dazu forciert, sich so anzuordnen, dass die Artefakt verursa-

chende direkte Wasserstoffbrücke zum Asp92 durch die Kette aus Wassermolekülen verlängert wurde. Beispiele sind im Anhang gezeigt (Siehe Listing 6.1). Um die unterschiedlichen Resultate zu illustrieren, können die Abbildungen 4.7 und 4.16 vergleichend betrachtet werden. In einem weiteren MD-Durchlauf wurde noch ein Wassermolekül so umorientiert, dass die wasservermittelnde Ringöffnung durch den basischen Aspartataminosäurerest Asp341 möglichst günstig ablaufen kann (Abbildung 2.10). Anschließend wurde das System lokal optimiert (10 000 Schritte) unter Verwendung der MM-Beschreibung. Die so vorbereitete Startgeometrie wurde für die QM/MM-Berechnungen verwendet.

Der vorbereitende Schritt zur Erstellung der Startgeometrie des nicht-kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplexes der Mannosidase GM II mit dem Inhibitor Nr. **7** (N,O-Acetal) startet mit dem Austausch des Sauerstoffatoms O6 durch die positiv geladene NH^+ -Gruppe. In diesem Fall erfolgt die Ringöffnung nicht durch das Sauerstoffatom, wie es für den O,O-Acetal-Liganden plausibel erscheint, sondern durch das Wasserstoffatom des N,O-Acetal-Ligandes. Dieser Schritt erfordert eine komplette Umorientierung der in der direkten Nähe zum Inhibitor stehenden Wassermoleküle aufgrund der veränderten Polarität am C1-Atom des Inhibitors (Abbildung 4.10). Diese Änderung ist besonders für die Wassermoleküle wichtig, die zwischen dem basischen Aspartataminosäurerest Asp341 und dem Wasserstoffatom des N,O-Acetal-Ligandes liegen und einen simultanen Protontransfer nach Grotthuss während der Ringöffnung des Acetal-Inhibitors, d.h. wasservermittelt, unterstützen konnten.

Technische Details der QM/MM-Berechnungen

Die Berechnung des Minimumenergiepfades (MEP) der Inhibitionsreaktion von dem nicht-kovalenten (Edukt) zu dem kovalenten (Produkt) E-I-Komplex wurde mit verschiedenen Ansätzen durchgeführt. Die schematische Darstellung der Edukte und Produkte der modellierten Inhibitionsreaktion ist in der Abbildung 4.8 dargestellt. Die Reaktion beinhaltet eine komplexe Umwandlung bestehend aus der Bindungsbildung OD2-C1 und dem Bindungsbruch C1-O6 im Ligand. Gleichzeitig oder direkt anschließend muss der gespaltene X,Y-Acetal-Inhibitor durch die Bindungsbildung O6-H gesättigt werden. Das Wasserstoffatom H, welches in Abbildung 4.8 rot hervorgehoben ist, wird hierbei wasservermittelt von dem Aspartataminosäurerest Asp341 auf das O6-Atom des Liganden übertragen (ein wasservermittelter Protontransfer). Wasservermittelt bedeutet, dass die bestehenden O-H-Bindungen gebrochen werden und die neuen O-H-Bindungen der Wassermoleküle geknüpft werden, wie es mit Pfeilen und Strich-Linien in der Abbildung 4.8 gezeigt wird. Der erste Ansatz beinhaltet sukzessive Berechnungen der Geometrien auf der Potentialhyperfläche (PES) von der Edukt-Situation bis hin zur Produkt-Situation.

Die Informationen über den Protontransfer in der Inhibitionsreaktion der Mannosidase GM II durch die bicyclischen Acetal-Inhibitoren hinsichtlich des Netzwerkes der katalysierenden Wassermoleküle, ob ein oder mehrere Wassermoleküle dabei beteiligt sind, waren zum Zeitpunkt des Starts der Untersuchungen nicht vorhanden. Aus diesem Grund wurde die QM/MM-Berechnung des Reaktionsprofils vom nicht-kovalenten zum kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplex zunächst in Abhängigkeit von einer Reaktionskoordinate, die den nukleophilen Angriff des Atoms OD2 des katalytischen Aspartataminosäurerests Asp204 an das elektrophile Atom C1 des Inhibitors beschreibt, durchgeführt. Hierbei wurde der Protontransfer vom basischen Aspartataminosäurerest Asp341 über ein Wassermolekül (**Wat1**) berücksichtigt. Die Abbildung 4.8 zeigt den QM-Bereich der erst durchgeführten QM/MM-Berechnung vom Edukt zum Produkt (schematische Darstellungen) der Inhibitionsreaktion. Die zunächst erhaltenen Reaktionswege sind in den Abbildungen 4.12 und 4.13 gezeigt. Ein wichtiges Ergebnis der ersten Berechnungen zeigt, dass die berechnete Geometrie des Produkts das Netzwerk aus zwei Wassermolekülen für den Protontransfer enthält. Das zweite Wassermolekül (**Wat2**) wurde dann im nächsten Schritt der Untersuchungen explizit berücksichtigt, indem es in die QM-Beschreibung mit aufgenommen wurde (Abbildung 4.9). Die Geometrie des Eduktes, die ein optimiertes Wassernetzwerk aus zwei Wassermolekülen enthält, wurde durch die Erstellung des Reaktionsprofils erhalten, das sein Startpunkt bei folgendem Bindungsabstand (Reaktionskoordinate $d(\text{OD2-C1})$) **2,4 Å** hat. Zusätzlich wurde der Beschreibung der Startgeometrie des E-I-Komplexes eine produktähnlichere Konfiguration bezüglich der Anordnung von aktiven Wassermoleküle gewählt. Eine detaillierte Erläuterung ist im Abschnitt zu den Ergebnissen zu finden. Um das Reaktionsprofil zu erhalten (Abbildung 4.19) wurde ein *relaxed-scan*^[179] mit dem Programmpaket CHEMSHELL^[43] durchgeführt. Die hier verwendeten Skripte sind im Anhang zu finden unter Listing 6.3 und Listing 6.4. Das Reaktionsprofil wurde auf dem Theorielevel BLYP^{[36][134][40][37]}/def-TZVP^{[39][38]} erhalten. Anschließend wurde die Energieberechnung (SP, *single point*) der optimierten Geometrien mit B3LYP^{[36][134][40][37]}/def-TZVP^[38] durchgeführt. Für die Berechnung der Reaktion als Minimumenergiepfad (MEP) vom gezielt erhaltenen Edukt hin zum stabileren Produkt wurde aufgrund der Komplexität der Reaktionskoordinate die CI^[15]-NEB^{[12][14]}-Methode gewählt (Skripte der Berechnung sind in Anhänge als Listing 6.5 und 6.6 gezeigt). Als Ergebnis dieser Berechnung wurden die Geometrien, die auf dem Reaktionspfad liegen (Abbildung 4.22), erhalten. Die Analyse der Geometrien ist in dem nachfolgenden Abschnitt gezeigt. Die NEB-Methode wurde in Kombination mit dem CI-Algorithmus (*climbing image*^[20]) und einer nachfolgenden Optimierung mit Hilfe des Dimer^{[22][23]}-Algorithmus (CI-NEB-Dimer^[24]-Methode) angewendet, um den Übergangszustand (ÜZ-Geometrie) zu erfassen.

Der gefundene Übergangszustand wurde mit Hilfe einer Frequenzberechnung hin untersucht.^[198] Die hier angewendeten Skripte sind im Anhang zu finden unter Listing 6.7 und 6.8).

Der zweite Ansatz zur Auffindung des MEP bestand in der Berechnung einer 3-dimensionalen PES für die Inhibitionsreaktion. Diese PES diente zudem zur Überprüfung der Richtigkeit der Ergebnisse, die mittels der NEB-Methode erarbeitet wurden. Hierbei wurde der Protontransfer über zwei Wassermoleküle in allen Geometrien zu Beginn der Optimierung durch die Bindungsabstände O-H, die auf 1,10 Å festgelegt wurden, definiert. Die Definition der Startgeometrien ist im Schema 4.9 dargestellt. Entsprechend dem Schema 4.9 wurden die Bindungen zu 1,10 Å verkürzt (Änderung von Situation 2 zu Situation 3). Die Positionen der Sauerstoffatome der Wassermoleküle wurden dabei nicht geändert, sondern die Positionen der Wasserstoffatome. Die beiden Reaktionskoordinaten - Bindungen OD2-C1 und O6-H - wurden schrittweise von der Situation im kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplex (**E-I-K**) zu der Situation im nicht-kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplex (**E· · I-K**) variiert. Anschließend wurden die definierten Geometrien in Abhängigkeit von den zwei fest gehaltenen oben genannten Reaktionskoordinaten optimiert. Alle anderen Reaktionskoordinaten wurden als eine zu optimierende Freiheitsgrade behandelt. Die so erhaltene 3-dimensionale Potentialhyperfläche ist in Abbildung 4.26 dargestellt. Die hier angewendete Methodik des kontrollierten Protontransfers zeigt, dass ein 3-dimensionaler Scan mit einem wasservermittelten Protontransfer in einer sehr guten Übereinstimmung mit den MEPs, die durch die CI-NEB-Dimer^{[15][14][23][24]}-Methode berechnet wurden, steht. Die vorher durchgeführten Test-Berechnungen (siehe in Anhängen die Abbildung 6.9) ohne die explizite Behandlung des Protontransfers zeigen, dass dieser nicht simultan bei der Verkürzung der Bindung O-C1 stattfindet und somit nicht standardmäßig erfasst werden kann.

Die QM/MM-Geometrieoptimierungen der Startgeometrie wurden zur Ermittlung der notwendigen Größe des QM-Teils mit unterschiedlichen Definitionen der QM-Teile durchgeführt. Es hat sich gezeigt, dass die QM/MM-Beschreibung der chemischen Reaktion in Mannosidase GM II durch ein QM-Teil ohne das strukturgebende Zink-Dikation technisch unmöglich ist. Solche Berechnungen ergaben Konvergenzfehler und Destruktion des QM/MM-Systems. Der korrekt gewählte QM-Bereich umfasst somit die Aminosäurereste, die zu dem strukturgebenden Zink-Dikation koordinieren, als auch Zn-Dikation selbst. Die Ergebnisse werden im Folgenden gezeigt und diskutiert.

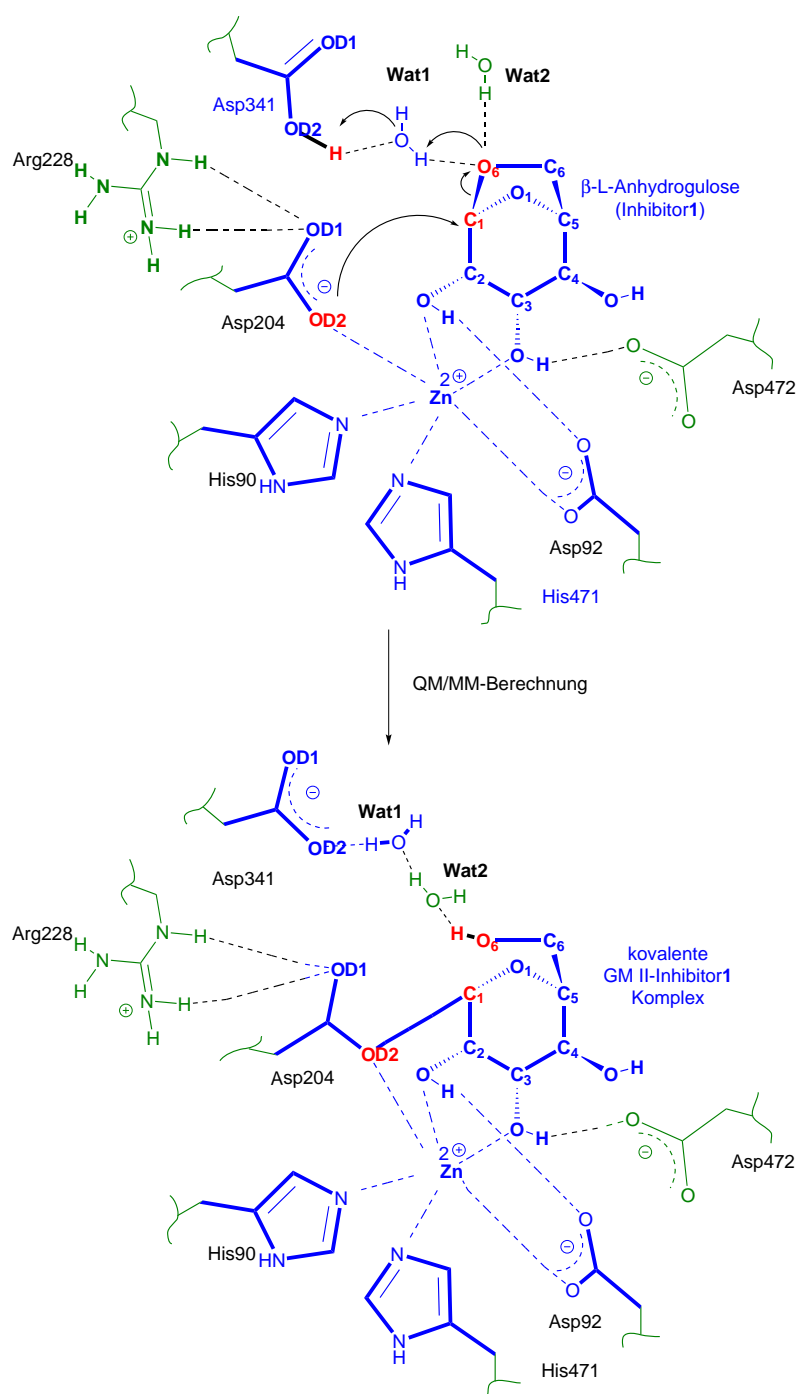


Abbildung 4.8: Schematische Darstellung der aktiven Tasche von Mannosidase GM II zu den technischen Details der QM/MM-Berechnungen ausgehend von dem nicht-kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplex. Der QM-Teil ist blau, der MM-Teil grün gezeichnet. Die bei den Reaktionskoordinaten $d(\text{OD2-C1})$ und $d(\text{O6-H})$ beteiligten Atome (Näheres siehe Text) sind rot gekennzeichnet.

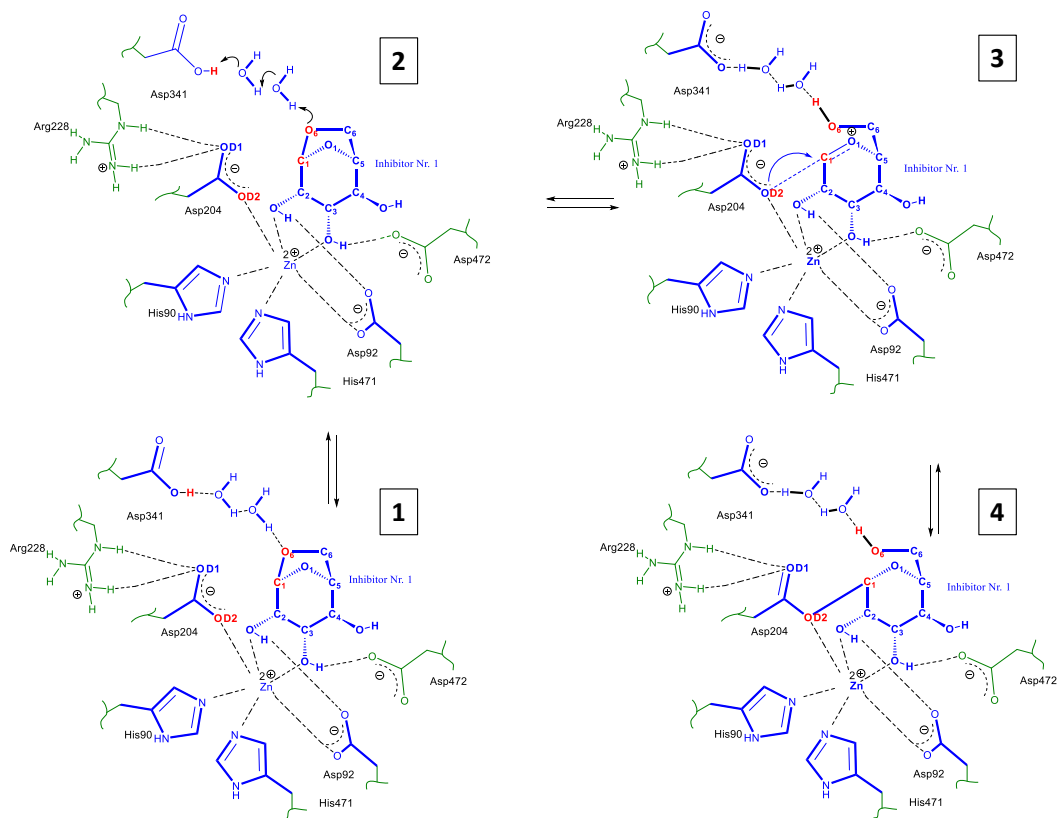


Abbildung 4.9: Schematische Darstellung des Reaktionsmechanismus D_NA_N ^[25] für die Inhibitionsreaktion der Mannosidase GM II mit dem Inhibitor Nr. 1. Zwei Wassermoleküle (ein Netzwerk der Wasserstoffbrückenbindungen) leiten den Protonentransfer ein. 1: der nicht-kovalente Enzym-Inhibitor-Komplex. 2: Weg des Protonentransfers. 3: Übergangszustand mit dem OCl-Charakter. 4: der kovalente Enzym-Inhibitor-Komplex. Der QM-Teil ist blau, der MM-Teil grün gezeichnet. Rot: Atome der Reaktionskoordinaten.

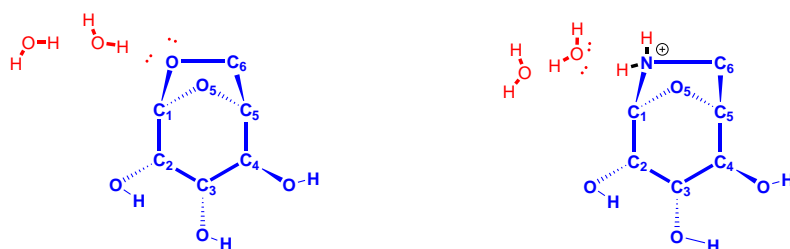


Abbildung 4.10: Schema für die Änderung der Wasserumgebung für den Übergang von dem O,O-Acetal- zu dem N,O-Acetal-Inhibitor im aktiven Zentrum der Mannosidase GM II. Links: O,O-Acetal-Inhibitor. Rechts: N,O-Acetal-Inhibitor.

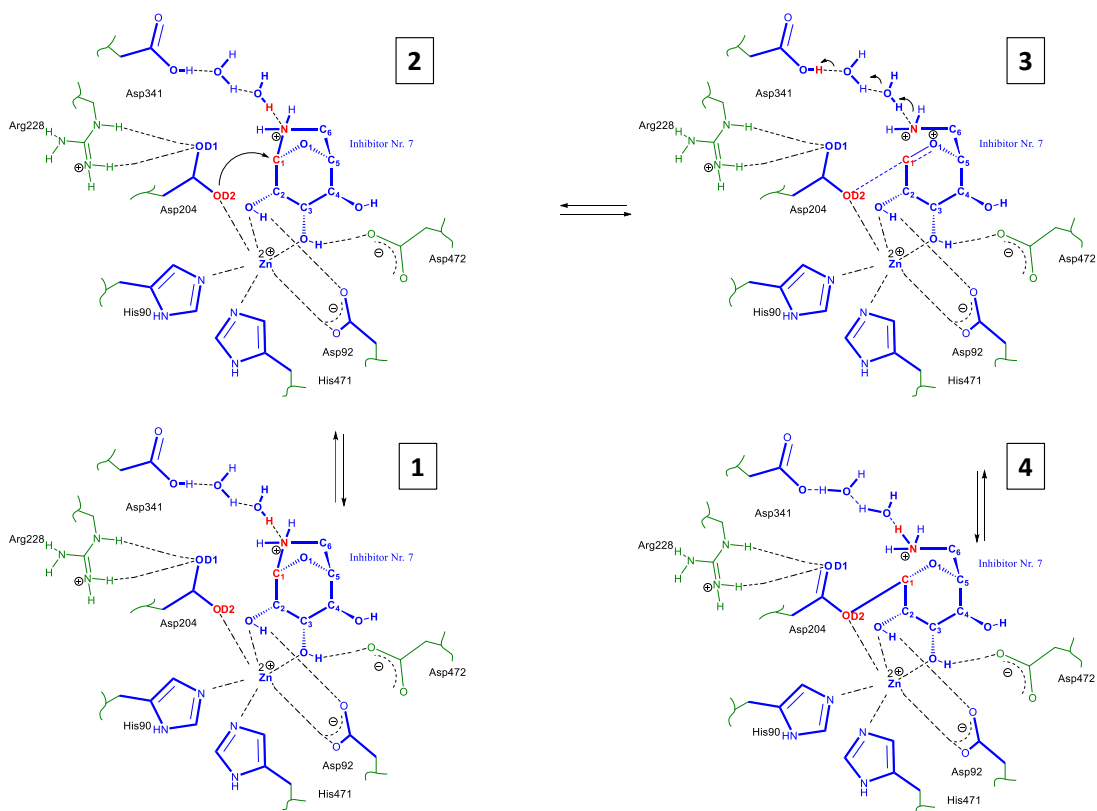


Abbildung 4.11: Schematische Darstellung des Reaktionsmechanismus für die Inhibitionsreaktion der Mannosidase GM II mit dem Inhibitor Nr. 7. Zwei Wassermoleküle (ein Netzwerk der Wasserstoffbrückenbindungen) unterstützen den Protontransfer. 1: der nicht-kovalente Enzym-Inhibitor-Komplex. 2: Der nukleophile Angriff des katalytischen Aspartataminosäurerests Asp204. 3: Weg des Protontransfers und Ausbildung des Übergangszustandes mit dem OCI-Charakter. 4: der kovalente Enzym-Inhibitor-Komplex. Der QM-Teil ist blau, der MM-Teil grün gezeichnet. Rot: Atome der Reaktionskoordinaten.

4.3.2 Ergebnisse und Diskussion

Berechnungen des Reaktionspfades des Inhibitors 1

A). Vorarbeiten

Dieser Abschnitt beschreibt die Ergebnisse zur Berechnung des Protontransfers unter Berücksichtigung nur eines expliziten Wassermoleküls (**WAT1**) im QM-Bereich (Abbildung 4.12). Dieser Schritt der Arbeit stellt die erforderlichen Vorarbeiten zur Darstellung von Geometrien der stationären Punkte des Reaktionsprofils dar, d.h. die finalen Geometrien des Produkts und des Edukts der Inhibitionsreaktion.

Betrachten wir als erstes für den O,O-Acetal-Inhibitor (Inhibitor Nr. **1** mit X=O, Y=O) einen 2-dimensionalen Schnitt durch die Potentialhyperfläche für die Variation folgender Reaktionskoordinate Bindungsabstand $d(\text{OD2-C1})$ (Abbildung 4.12). Dieser ist eine Zusammenfassung mehrerer *relaxed-scan*-Berechnungen für die Variation nur einer Reaktionskoordinate, deren Reihenfolge mit Hilfe der Abbildungen 4.13 und 4.14 nachverfolgt werden kann. Die Berechnungen des Reaktionspfades in mehreren Schritten ergeben zunächst eine Reihe von Reaktionsprofilen mit einer sukzessiv sinkenden Barriere der Reaktion. Diese variiert von 17 bis 5,5 kcal/mol.

Das Reaktionsprofil mit der höchsten Barriere von ca. 17 kcal/mol (Datenreihe 3, Abbildung 4.12) stellt einen Reaktionsweg dar, der als ein Reaktionspfad ohne Wasserkatalyse bezeichnet werden kann. Die Gründe dafür sind folgende: Die Geometrie der Barriere ($d(\text{OD2-C1}) = 2,2 \text{ \AA}$) zeigt keine Beteiligung des Wassermoleküls bei der Ringöffnung, denn durch die nächste Verkürzung der Bindung $d(\text{OD2-C1})$ zu $2,1 \text{ \AA}$ findet die Ringöffnung des Fünfrings durch die Substitutionsreaktion instantan statt. Während der Geometrieoptimierung dieser Geometrie ändern die Wassermoleküle ihre Koordinaten drastisch durch Rotation und Translation, sodass die Input- und Output-Geometrien sich im Grunde bezüglich des Wassermolekül-Netzwerkes ändern. Der Weg des Protons von Geometrie zu Geometrie kann bei solchen abrupten Wasserumlagerungen nicht nachvollzogen werden. Der physikalisch nachgewiesene Weg des Protons in einer wässrigen Lösung findet stattdessen nach Grotthuss statt. Dabei werden die H-Brückenbindungen in einem Kettenmechanismus in einem ausgebildetem Wassermolekül-Netzwerk lediglich gebrochen und neu geknüpft, ohne dass sich die Moleküle erneut umlagern müssen. Der Protontransfer wird somit durch das Umklappen von O-H-Bindungen zwischen den Geometrien beweisbar. Dass die hochenergetische $2,2 \text{ \AA}$ -Geometrie am ungünstigsten ist, kann durch die fehlende Stabilisierung der Wassermoleküle erklärt werden. Im Vergleich dazu ist die Geometrie mit $d(\text{OD2-C1}) = 2,3 \text{ \AA}$ auf dem selben Konturplot bereits durch eine

günstige H-Brücke zwischen Wassermolekülen mit ca. 12 kcal/mol relativer Energie um ca. 5 kcal/mol energetisch günstiger. Insgesamt erscheint die Geometrie bei **2,2 Å** zu starr zu sein, um die notwendigen günstigen Wasserstoffbrücken zwischen dem Inhibitor, zwei Wassermolekülen und dem OD2-Atom des Aspartataminosäurerests Asp341 so auszubilden, dass der Weg des Protons zum Produkt über die verfolgbare Protonwanderung nach Grotthuss stattfinden kann. Hierfür eignet sich die **2,3 Å**-Geometrie, wie es in Folgendem gezeigt wird, deutlich besser.

Die Datenreihen überlappen ab dem Bindungsabstand $d(\text{OD2-C1})$ von **2,1 Å** (eine offene durch die Hydrolyse und die Ringöffnung, produkt-ähnliche Geometrie des Enzym-Inhibitor-Komplexes) und führen monoton zu dem stabilen Produkt. In diesem Reaktionsprofil, das zunächst mit einer groben Reaktionskoordinatenänderung von 0,2 Å durchgeführt wurde, wurde die Geometrie des kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplexes (Produkt) erhalten. Diese Geometrie des Produkts enthält zwei Wassermoleküle (**WAT1** und **WAT2**), die die Wasserstoffbrückenbindungen untereinander und zum Inhibitor sowie dem Aspartataminosäurerest Asp341 aufweisen. Da solche Wechselwirkungen signifikant zur Stabilität beitragen, wurde somit die finale Geometrie des Produkts identifiziert. Die Reaktionsbarriere erscheint dagegen auf diesem Schritt der Arbeit stark überschätzt.

Betrachten wir als Nächstes die Konturplots, die zur Verfeinerung der Reaktionsbarriere führen. Die Geometrie mit dem Bindungsabstand $d(\text{OD2-C1}) = \mathbf{2,3 \text{ \AA}}$ der Datenreihe 3 (Legende 3, grün in Abbildung 4.13) wurde durch die Optimierung der **2,3 Å**-Geometrie des ersten Reaktionsprofils erhalten. Die Startgeometrie dieser Geometrieoptimierung wurde wie folgt modifiziert: Das Wasserstoffatom wurde produkt-ähnlich translativ positioniert. Das bedeutet, dass das H-Atom eine kurze Distanz von ca. 1 Å, d.h. „eine Bindung“, mit dem O6-Atom des Inhibitors und nicht mit dem OD2-Atom Aspartataminosäurerests Asp341 in der zu optimierenden Geometrie aufweist. Das Ergebnis dieser Geometrieoptimierung bei nur einer fest gehaltenen Reaktionskoordinate ($d(\text{OD2-C1})$ von **2,3 Å**) ist die produkt-ähnliche **2,3 Å**-Geometrie (der Fünfring ist offen, Protontransfer hat stattgefunden, Abbildung 4.12, grün). Dadurch konnte die Energie der **2,3 Å**-Geometrie (Geometrie mit der fest gehaltenen Reaktionskoordinate $d(\text{OD2-C1}) = \mathbf{2,3 \text{ \AA}}$) von ca. 12 bis auf ca. 7 kcal/mol relativ zu der Geometrie des Eduktes begünstigt werden.

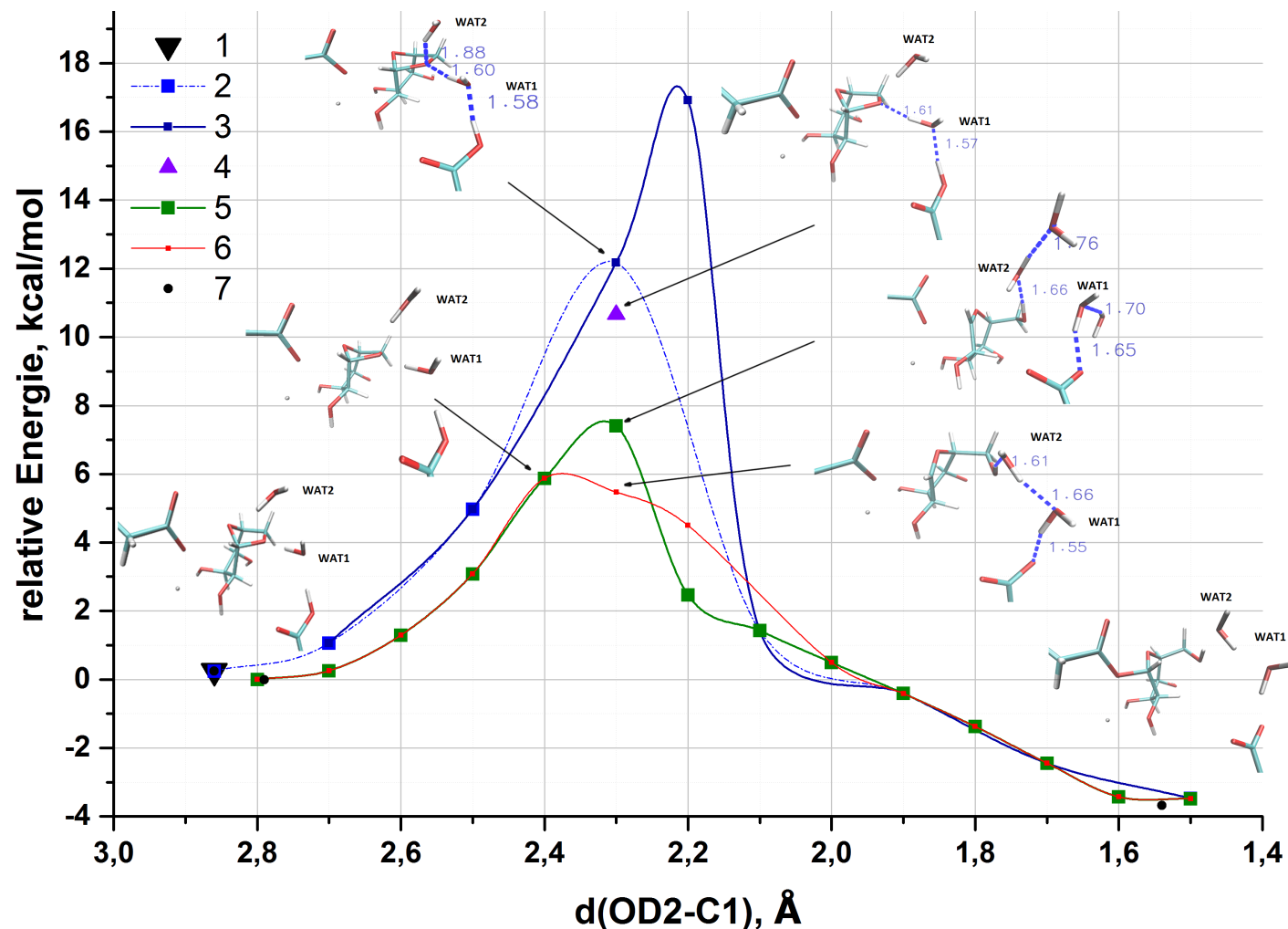


Abbildung 4.12: Datenreihen zur Darstellung des Reaktionsprofils der Additionsreaktion zwischen dem Inhibitor Nr. **1** und den katalytischen Aminosäureresten der GM II. 1: Startgeometrie der QM/MM-Berechnung. 2, 3 und 4: relaxed-scan-Berechnungen mit der edukt-ähnlichen Barriere (bicyclisches Acetal). 5 und 6: relaxed-scan-Berechnungen mit der protonierten produkt-ähnlichen Geometrie der Barriere. 7: lokale Minima des Edukts (der nicht-kovalente Enzym-Inhibitor-Komplex, lokales Minimum der Geometrie mit $d(\text{OD2-C1})=2,8$ Å) und des Produkts (der kovalente Enzym-Inhibitor-Komplex, lokales Minimum der Geometrie mit $d(\text{OD2-C1})=1,5$ Å).

Durch die sukzessive Verlängerung des Bindungsabstands $d(\text{OD2-C1})$ der Geometrie mit **2,1 Å** der Datenreihe 1, die produkt-ähnlich ist, wurde eine neue Datenreihe 4 (Legende 4, blau in Abbildung 4.13) erhalten. In diesem Fall wurde ein Reaktionspfad ohne Protontransfer ausgehend von dem Produkt zu dem neuen nicht-kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplex berechnet. Der Inhibitor liegt hier als β -L-Gulose in der offenkettigen Form des Inhibitors, vor. Da die Untersuchungen mit Hilfe der Docking-Methode auf der cyclischen Geometrie des Inhibitors basieren, ist der erhaltene Reaktionspfad irrelevant. Die relative Energie des nicht-kovalenten Komplexes mit dem offenkettigen Gulose-Inhibitor liegt zudem ca. 10 kcal/mol energetisch höher als solche mit dem cyclischen Anhydrogulose-Inhibitor.

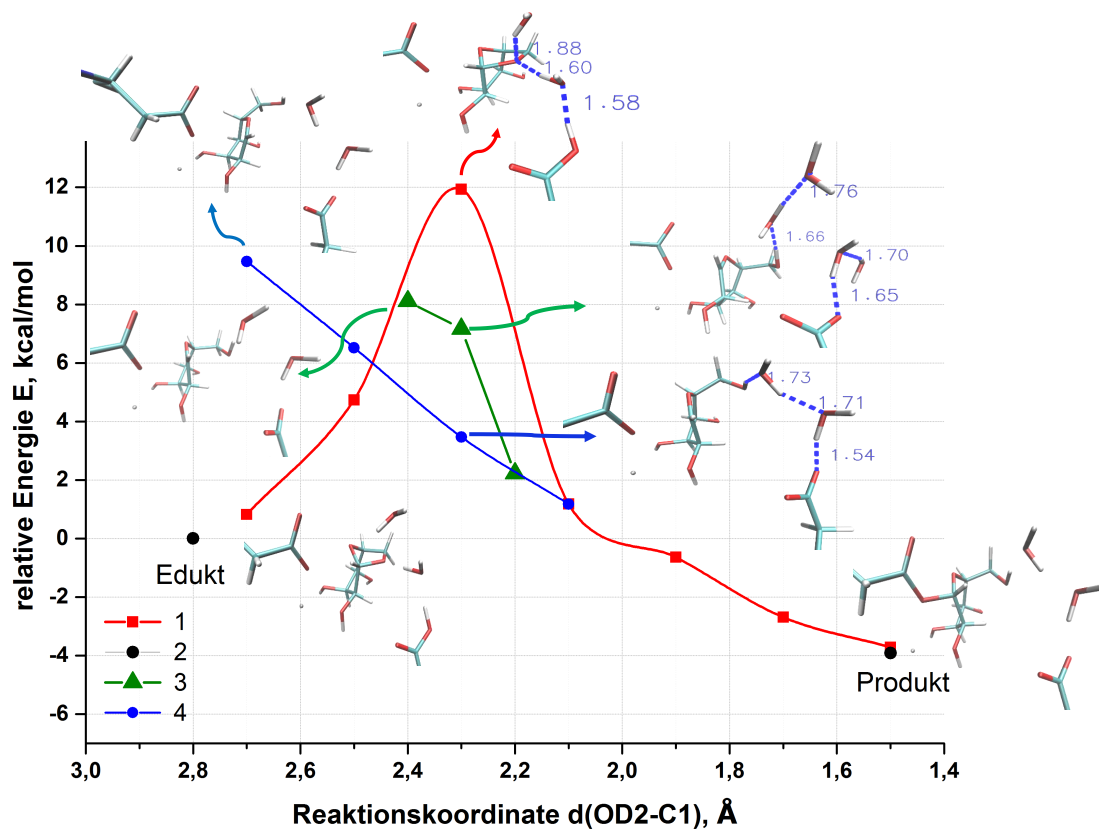


Abbildung 4.13: Reaktionsprofil der Additionsreaktion zwischen dem Inhibitor Nr. **1** und den katalytischen Aminosäureresten der GM II. In der *QM*-Beschreibung wurde jeweils ein Wassermolekül explizit berücksichtigt.

Betrachten wir stattdessen, wie die Geometrie mit der festen Reaktionskoordinate $d(\text{OD2-C1}) = 2,3 \text{ Å}$ weiter optimiert werden kann. Ausgehend von der Geometrie mit dem Bindungsabstand $d(\text{OD2-C1}) = 2,4 \text{ Å}$ der Datenreihe 3 wurde die Geometrie mit dem Bindungsabstand von **2,4 Å** der Datenreihe 4 (Legende 4, gelb), die ca. 2 kcal/mol energetisch günstiger ist, erhalten (Abbildung 4.14). Dabei wur-

den alle in dem Protontransfer beteiligten Wasserstoffatome edukt-ähnlich positioniert. Die zu verkürzenden O-H-Bindungen wurden zu den Atomabständen von 1,07 Å geändert und während der Geometrieoptimierung als die sekundären Reaktionskoordinaten behandelt (d.h. diese Bindungen werden uneingeschränkt durch die Energieminimierung optimiert). Die resultierende Geometrie ähnelt der Geometrie des Edukts: Der Inhibitor besitzt einen geschlossenen Fünfring, der Protontransfer hat noch nicht stattgefunden (gelb, Abbildung 4.14 und rot, Abbildung 4.12).

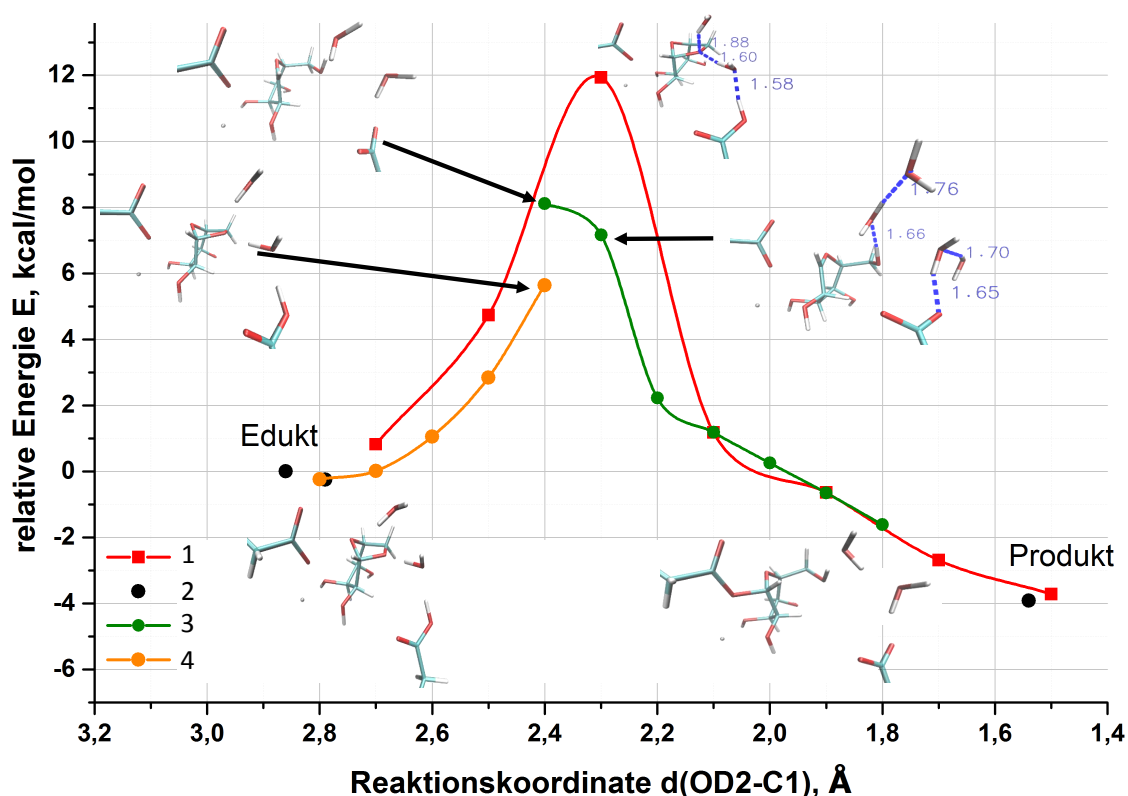


Abbildung 4.14: Reaktionsprofil der Additionsreaktion zwischen dem Inhibitor Nr. **1** und den katalytischen Aminosäureresten der GM II. Die Energien sind relativ zu dem „Edukt“ berechnet.

Ausgehend von der Geometrie mit dem Bindungsabstand $d(\text{OD2-C1}) = 2,4 \text{ \AA}$ der Datenreihe 4 (Legende 4, gelb, Abbildung 4.14) wurde eine neue Geometrie mit dem Bindungsabstand von $2,3 \text{ \AA}$ (Legende 6, rot, Abbildung 4.12) erhalten. Diese Geometrie eine ist energetisch am tiefsten liegende Geometrie und eine solche, die zunächst visuell – denn in dieser Berechnung das Wassermolekül WAT2 nicht explizit berücksichtigt ist – die Protonübertragung zum Aspartataminosäurerest Asp341 über zwei Wassermoleküle **WAT1** und **WAT2** impliziert. Hierbei zeigt diese Geometrie, die für diese günstige Anordnung der nicht-bindenden Wech-

selwirkungen zwischen den beiden Wassermolekülen untereinander und zu den anderen Teilnehmern der Reaktion, dem Inhibitor (O6-Atom) und dem Aspartaminosäurerest Asp341 (OD2-Atom) charakterisiert ist, eine weitere Absenkung der relativen Energie um 2 kcal/mol (Abbildung 4.15).

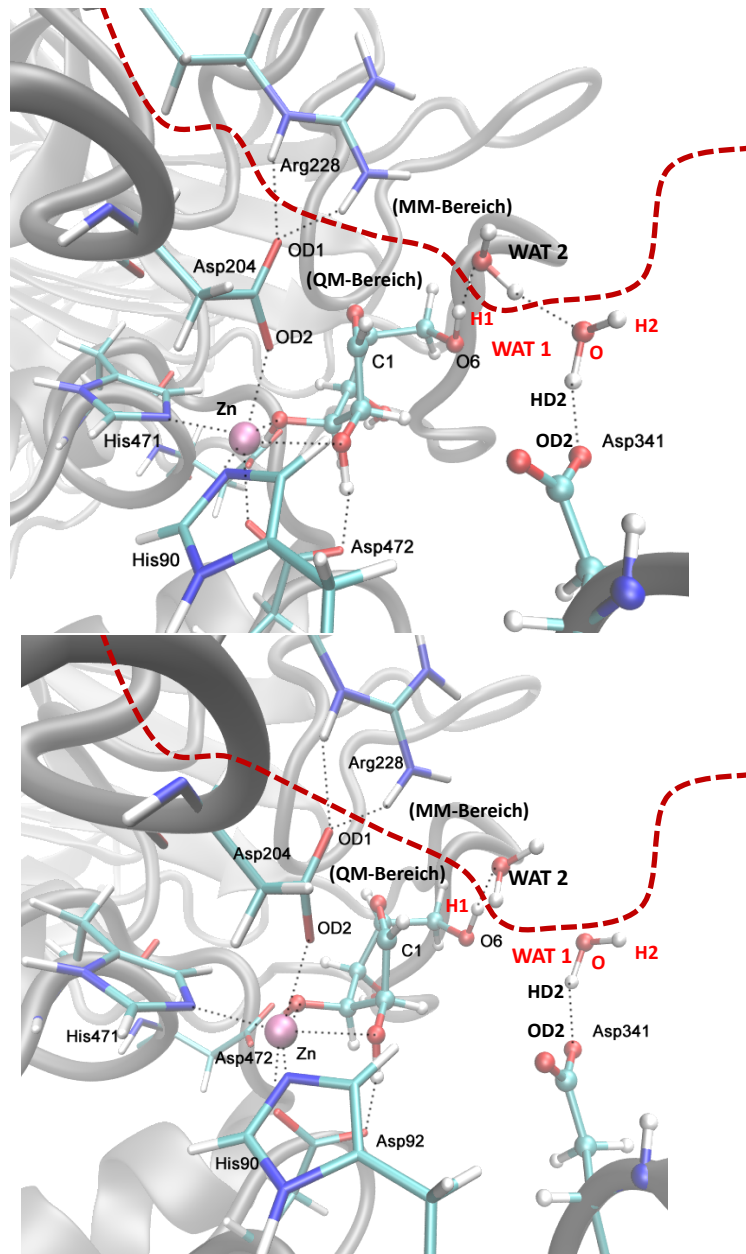


Abbildung 4.15: Vergleich von **2,3 Å**-Geometrien mit den unterschiedlichen relativen Energien. Oben: 5,5 kcal/mol, unten: 7,5 kcal/mol.

Ergebnisse dieser ersten QM/MM-Berechnungen zum Erstellen des Reaktionsprofils zeigen, dass besonders Geometrien mit dem Bindungsabstand $d(\text{OD2-C1})=2,3 \text{ \AA}$ außerordentlich sensitiv in Bezug auf die geometrische Anordnung der Wassermoleküle sind. Auf die vier verschiedenen Geometrien mit dem Bindungs-

abstand $d(\text{OD2-C1})$ von **2,3 Å** wurde bereits in der Abbildung 4.12 hingewiesen. Die günstigere Anordnung eines der Wassermoleküle zu dem bicyclischen Acetal-Inhibitor (H-Brücke) lässt die Barriere der Ringöffnungsreaktion wesentlich sinken. Je nach Anordnung der beiden Wassermoleküle in der Tasche (molekulare Abbildungen zu den Geometrien in Datenreihen 3 und 4, Abbildung 4.12) wurden Barrieren mit ca. 12 und 11 kcal/mol ermittelt. Die beiden Geometrien zeigen für den Bindungsabstand $d(\text{OD2-C1}) = \mathbf{2,3 \text{ Å}}$ edukt-ähnliche Geometrien, in welchen der Fünfring geschlossen ist. Durch die Geometrie-Optimierungen der offenen, produkt-ähnlichen Geometrien der Barriere wurden diese mit ca. 7,5 und ca. 5,5 kcal/mol erhalten (Vergleich in der Abbildung 4.15). Während die energetisch am höchsten liegende Struktur mit einer Unterbrechung der H-Brücken im Wasser-Netzwerk charakterisiert ist, kann für den Verlauf mit einer niedrigeren Barriere eine sehr vorteilhafte Anordnung der Wasserstoffbrücken zwischen den beiden Wassermolekülen gefunden werden.

Betrachten wir als Nächstes die zum Übergangszustand nahen Geometrien und die Geometrien des Eduktes und Produktes im Vergleich mit solchen aus der Literatur. In der Literatur sind allerdings nur die Substrat-Komplexe der Mannosidase GM II charakterisiert (Tabelle 4.5).^[94] Der erste Zustand **TS** des Substrats stellt einen Übergangszustand (ÜZ) dar, in welchem der Bindungsabstand $d(\text{C1-O6})$, die sogenannte *scissile bond*, auf den Wert von 2,0 Å langgestreckt und die Bindungslänge $d(\text{OD2-C1})$ auf den Wert von 2,9 Å verkürzt sind (Tabelle 4.5). Der Bindungsabstand $d(\text{OD2-C1})$ beträgt im Edukt (nicht-kovalenter Enzym-Substrat-Komplex) 3,25 Å. Die bisher hier gezeigten Berechnungen für das System GM II (Enzym-Inhibitor Komplex mit der β -L-Anhydrogulose) zeigen, dass das lokale Minimum auf der Seite des Eduktes (nicht-kovalenter Enzym-Inhibitor-Komplex) eine Geometrie mit einem Bindungsabstand $d(\text{C1-OD2})$ von ca. 2,8 Å darstellt (Tabelle 4.6).^[94] Dieser Wert in der Geometrie des Enzym-Inhibitor-Komplexes ist somit kürzer im Vergleich zu der Geometrie des Enzym-Substrat-Komplexes. Im Gegensatz zu dem Zustand **TS**, der für das System GM II nicht gefunden wurde, findet sich eine gute Übereinstimmung der berechneten Geometrien für die Barriere der berechneten Inhibitionsreaktion mit dem zweiten Übergangszustand **P'** des Enzym-Substrat-Komplexes. Der Zustand **P'** repräsentiert einen Übergangszustand mit dem maximalen Charakter eines Oxocarbenium-Ions (OCI).^[94] Die Autoren führen dies auf die Ausbildung einer partiellen Doppelbindung zwischen den Atomen C1 und O1 zurück.^[94] Das C1-Atom des OCI wird durch die sp^2 -Hybridisierung charakterisiert ($d(\text{C1-O1}) = 1,29 \text{ Å}$). Die Bindungslänge $d(\text{C1-O1})$ in der Geometrie der niedrigsten Barriere (Tabelle 4.6) stimmt exakt mit der des **P'**-Zustands (1,29 Å) überein. Weitere Geometrien, die eine Übereinstimmung durch OCI aufweisen, sind ebenfalls wie die niedrigste Barriere durch einen stattgefundenen Protontransfer charakterisiert (molekulare Darstellungen in Abbildung

4.13).

Insgesamt wurden sehr gute Übereinstimmungen für die Geometrien der Edukte, Produkte und der niedrigsten Barriere mit der **P'**-Übergangszustand-Geometrie erzielt. Die wichtigsten Bindungsparameter der Geometrien der Enzym-Substrat-Komplexe sind in der Tabelle 4.5 dargestellt. Der Vergleich von Bindungsparametern für die berechneten Enzym-Inhibitor-Komplexe kann mit Hilfe der Tabelle 4.5 durchgeführt werden.

Tabelle 4.5: *Charakteristische Bindungslängen in Edukt-, Barriere- und Produkt-Geometrien der Substrat-Komplexe von Petersen et al.^[94]*

Geometrie	OD2-C1	C1-O6	C1-O1
Edukt	3,25	1,53	1,41
TS	2,93	2,00	1,32
P'	2,56	2,57	1,29
Produkt	1,50	3,47	1,41

Tabelle 4.6: *Charakteristische Bindungslängen in Edukt-, Produkt-Geometrien und Geometrien nahe der Barriere (Abbildung 4.12) berechnet für den Inhibitor Nr. 1.*

Geometrie	OD2-C1	C1-O6	C1-O1
Edukt	2,79	1,50	1,41
d(OD2-C1)=2,3 Å, E~7 kcal/mol	2,30	2,71	1,29
d(OD2-C1)=2,3 Å, E~5 kcal/mol	2,30	2,78	1,29
d(OD2-C1)=2,4 Å, E~8 kcal/mol	2,40	2,64	1,29
d(OD2-C1)=2,4 Å, E~6 kcal/mol	2,40	1,57	1,40
Produkt	1,54	3,47	1,39

Andere wichtige geometrische Übereinstimmungen der berechneten Geometrien der Enzym-Inhibitor-Komplexe mit den in der Literatur beschriebenen Enzym-Substrat-Komplexen betreffen die Wasserstoffbrücken zwischen dem Enzym Mannosidase GM II und den Hydroxy-Gruppen der β -L-Anhydrogulose. Die Hydroxy-Gruppe des C2-Atoms (Inhibitor- und Substrat-Molekül) bildet eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Aspartataminosäurerest Asp92, die auch in den berechneten Geometrien entlang der Reaktionspfade beobachtet wurde. Zusätzlich findet sich die Wechselwirkung mit dem Aspartataminosäurerest Asp472 wieder (Salzbrücke bei Substrat-Komplexen). Diese wurde in den erhaltenen Geometrien der Enzym-Inhibitor-Komplexe in Form einer stabilisierenden Wasserstoffbrückenbindung zwischen Inhibitor und Enzym charakterisiert.

Petersen und Mitarbeiter ordnen den katalytischen Mechanismus der Hydrolyse als Reaktion des Typs D_NA_N ein, d.h. als Erstes findet die Dissoziation (D) der glycosidischen Bindung statt und dann die Ausbildung einer kovalenten Bindung (A=Addition) zwischen dem Substrat und dem nucleophilen Aminosäurerest. Die nucleophilen Substitutionsreaktionen des Typs D_NA_N ^[25] werden oft durch eine assistierende Wirkung der Abgangsgruppe initiiert (D), die vollkommen oder teilweise stattfinden kann, bevor das Nukleophil angreift (A). Die Zuordnung der Substrat-Hydrolyse zeigt eine gute Übereinstimmung mit dem Hammond-Postulat, da der erste Übergangszustand **TS** eine edukt-ähnliche Geometrie aufweist. In der bisher gezeigten Berechnung zu der Inhibition wurde dagegen eine **P'**-ähnliche Geometrie der Barriere gefunden, die produkt-ähnlich ist. Damit diese Zuordnung nach dem Hammond-Postulat konform ist, sollte die chemische Reaktion der Hemmung endergonisch sein. Dies ist ein Hinweis darauf, dass entweder das Produkt oder das Edukt der Reaktion erneut optimiert werden sollte. Der monotone Verlauf des Reaktionspfades hin zum Produkt mit dem Protonentransfer über zwei Wassermoleküle liefert wesentlich niedrigere Werte der relativen Energie. Deswegen sollte die Geometrie des Edukts, die zwei ähnlich angeordneten Wassermoleküle enthält, erneut berechnet und die Thermodynamik der Gesamtreaktion erneut evaluiert werden. Die genaue Ermittlung eines Übergangszustandes erfordert am Ende der Berechnungen eine Normalmoden-Analyse für eine mögliche ÜZ-Geometrie (Frequenzberechnung).

Durch den Vergleich der Datenreihen 5 und 6 wird ersichtlich, dass die tatsächliche Barriere zwischen den Energiewerten 5,5 und 6 kcal/mol liegen sollte. Diese Werte entsprechen den Bindungsabständen $d(\text{OD2-C1}) = 2,3 \text{ \AA}$ und $2,4 \text{ \AA}$. Um die Barriere zu finden, muss die $2,4 \text{ \AA}$ -Geometrie so optimiert werden, dass die beiden Wasserstoffmoleküle **WAT1** und **WAT2** als ein Netzwerk, ähnlich wie in der $2,3 \text{ \AA}$ -Geometrie angeordnet sind.

Die ersten Berechnungen des Reaktionsprofils der Additionsreaktion zwischen dem Inhibitor **1** und den katalytischen Aminosäureresten der Mannosidase GM II resultieren in einer leicht exothermen Reaktion von -3,7 kcal/mol und einer relativ kleineren Barriere von ca. 6 kcal/mol. Aus diesen Werten lässt sich zunächst folgern, dass die Inhibitionsreaktion auch rückwärts zu den Edukten durchlaufen und somit eine reversible Reaktion vorhergesagt werden kann.

B). Auffinden der Geometrie des Eduktes für den Inhibitor Nr. 1

Die Geometrie des Produkts (der kovalente Enzym-Inhibitor-Komplex) enthält ein Netzwerk aus zwei angeordneten Wassermolekülen, die die Ringöffnung katalysieren. Bisher wurde nur eins davon in dem QM-Teil der QM/MM-Berechnungen explizit berücksichtigt. Um den Protonentransfer nach Grotthus darstellen zu können, benötigt man die Geometrie des nicht-kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplexes, welche so einem Protonenübergang konform ist. Deswegen wurde die Berechnung des Reaktionspfades erneut mit zwei explizit berücksichtigten Wassermolekülen im QM-Bereich durchgeführt. Das wichtigste Ergebnis dieser Berechnung ist die Geometrie des nicht-kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplexes, der durch die Protonenübertragung zu dem Produkt der Reaktion führt (Abbildung 4.16).

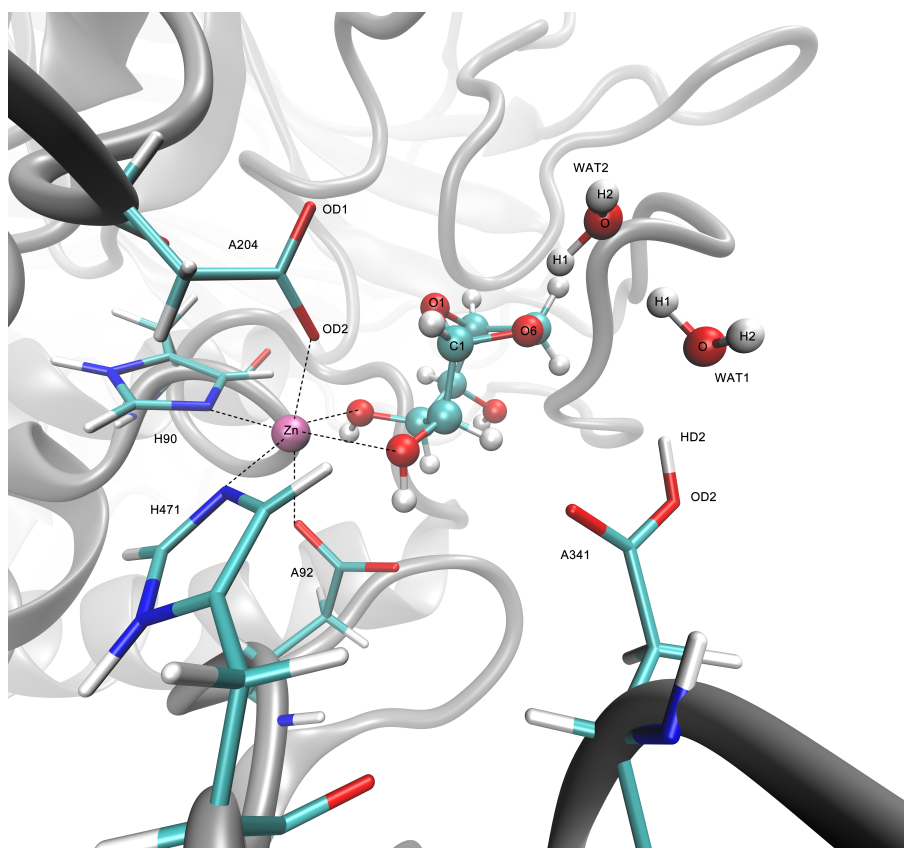


Abbildung 4.16: Geometrie des nicht-kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplexes (Edukt).

Diese Berechnung, die erfolgreich zum MEP der Inhibitionsreaktion führt, beginnt mit den Modifikationen an der **2,4 Å**-Geometrie, die in der Abbildung 4.12 beim Wert der relativen Energie von ca. 8 kcal/mol liegt. Der Grund für die Wahl dieser Geometrie zur weiteren Untersuchung ist folgender. In den ersten Berechnungen wurde beobachtet, dass die energetische Lage der Geometrien mit dem Bindungs-

abstand $d(\text{OD2-C1}) = 2,4 \text{ \AA}$ und auch dem Bindungsabstand $d(\text{OD2-C1}) = 2,3 \text{ \AA}$ stark davon abhängig ist, wo sich das Proton befindet – entweder bereits an dem O6-Atom des Inhibitors oder noch an dem Proton liefernden Aspartataminosäurerest Asp341 – und ob die Ringöffnung am Fünfring des Inhibitors bereits stattgefunden hat oder nicht. Hier beobachtet man Unterschiede, nämlich die genannte Änderung von ca. 1 kcal/mol. Hierbei ist die $2,4 \text{ \AA}$ -Geometrie mit dem Proton am O6-Atom des Inhibitors um 2 kcal/mol energetisch ungünstiger (grün gegenüber orange für $d(\text{OD2-C1}) = 2,4 \text{ \AA}$ in Abbildung 4.14) als die Geometrie, bei welcher dieses Proton bereits zu dem Aspartataminosäurerest Asp341 transportiert ist. Infolgedessen wurden weitere geplante Berechnungen an dieser $2,4 \text{ \AA}$ -Geometrie durchgeführt (Abbildungen 4.17 und 4.18, **A**).

Die erfolgreiche Berechnung, die zu den nachfolgend dargestellten Berechnungen verwendet wurde, beinhaltet eine erneute Änderung in der Position der Protonen: Die Koordinaten des H1- und HD2-Protons wurden entsprechend der Abbildung 4.18, **B**) geändert. Durch die explizite Berücksichtigung des zweiten Wassermoleküls in der QM/MM-Geometrieoptimierung der Input-Geometrie konnte erzielt werden, dass ein günstiges Netzwerk der H-Brücken im aktiven Zentrum ausgebildet wurde (Abbildung 4.18, **C**). Die optimierte $2,4 \text{ \AA}$ -Geometrie ist in Bezug auf den geschlossenen Fünfring edukt-ähnlich (Abbildung 4.18). Daraufhin ist diese auch gleichzeitig produkt-konform in Bezug auf die Geometrie der Wassermoleküle. Ausgehend von dieser Geometrie kann das Proton HD2 vom Aspartataminosäurerest Asp341 über die Wassermoleküle Wat1 und Wat2 nach dem Grotthus-Mechanismus auf den Ligand transportiert werden. Dieser Schritt kann stattfinden entweder nachdem der Ligand vom Aspartataminosäurerest Asp204 attackiert wird und der Ringöffnungsschritt mit der Protonierung abgeschlossen wird, oder die Protonenübertragung befördert den Ringöffnungsschritt als erstes und der Aspartataminosäurerest Asp204 kann den Inhibitor anschließend angreifen. Diese Fragen können durch die Berechnung des MEP aufgeklärt werden.

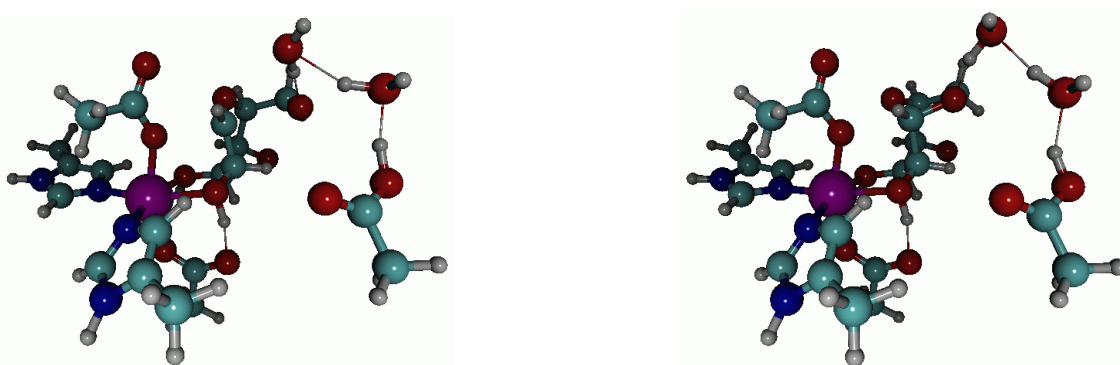


Abbildung 4.17: QM-Teil der Geometrie mit $d(\text{OD2-C1})$ von $2,4 \text{ \AA}$. Links: als Input der QM/MM-Berechnung, rechts: als Ergebnis der QM/MM-Berechnung.

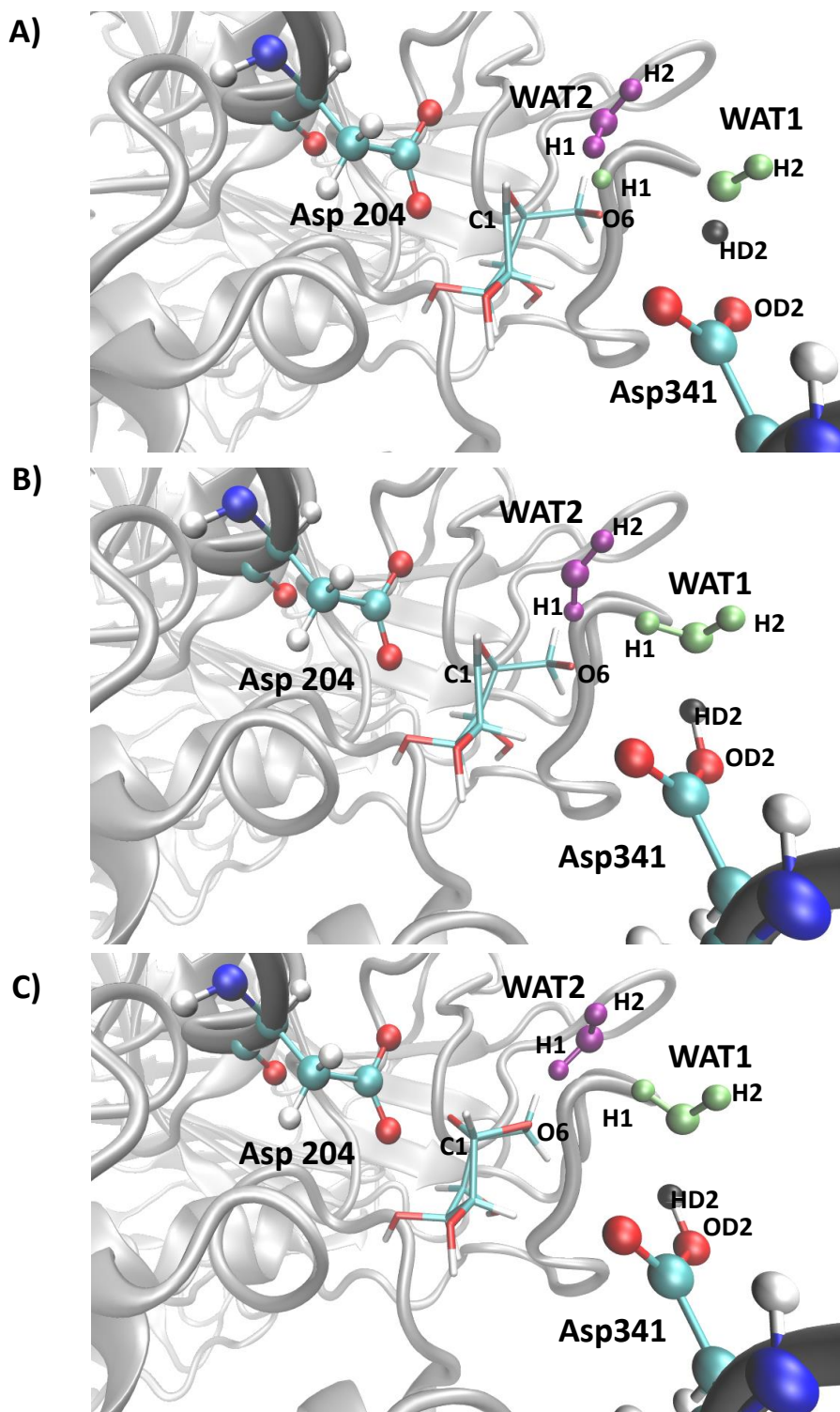


Abbildung 4.18: Geometrien mit der Reaktionskoordinate $d(\text{OD2}-\text{C1})=2,4 \text{ \AA}$. A) Geometrie aus der Abbildung 4.13, grün. B) Die modifizierte $2,4 \text{ \AA}$ -Geometrie vor der Optimierung (Input). Der Protonierungszustand des Aspartataminosäurerests Asp341 ist edukt-ähnlich (protoniert). C) Optimierte $2,4 \text{ \AA}$ -Geometrie (Ergebnis). Näheres siehe Text.

C). Auffinden des MEPs für den Inhibitor Nr. 1

In der bisher dargestellten Berechnung des Reaktionsprofils wurde die Aufteilung zwischen dem QM- und MM-Bereich so gewählt, dass die Geometrie des Eduktes zum plausiblen Grotthuss-Protonentransfer korrigiert wurde (Abbildung 4.16). Dadurch resultiert eine andere PES als in den Test-Berechnungen dargestellt wurde (siehe Unterabschnitt **A). Vorarbeiten**). Zunächst soll hier die schrittweise Berechnung des finalen MEPs erläutert werden. Die Berechnung startet mit der Darstellung des Reaktionsprofils (Abbildung 4.19), welches zunächst kein MEP ist, liefert aber die Geometrien des Eduktes und des Produktes für die weitere Berechnung. In einem ersten Schritt wurde ein *relaxed-scan*-Reaktionsprofil mit dem Programmpaket CHEMSHELL^[179] durchgeführt. Der *relaxed-scan*-Reaktionsprofil wurde als die Optimierung der Geometrien auf der PES entlang der Reaktionskoordinate $d(\text{OD2-C1})$, die sich sukzessive ändert, durchgeführt. Insgesamt wurden zwei parallel laufende Berechnungen ausgehend von der neuen **2,4 Å**-Geometrie durchgeführt: eine davon in die Richtung des Eduktes und die andere in die Richtung des Produktes (Skripte zu der Berechnung sind im Anhang als Listing 6.3 und Listing 6.4) aufgeführt).

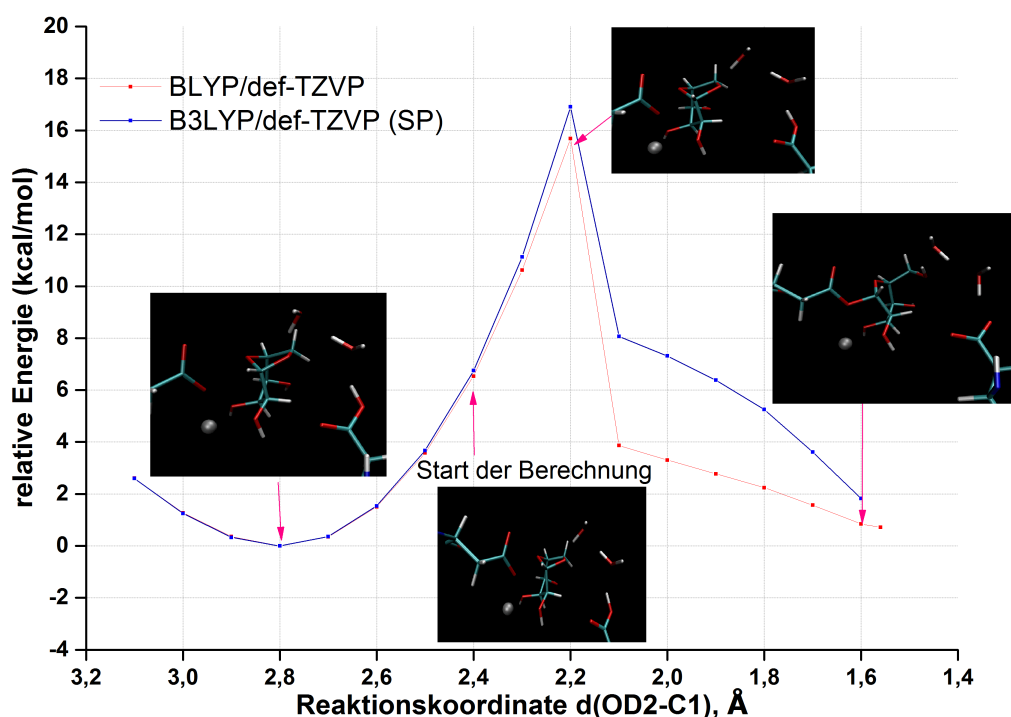


Abbildung 4.19: Reaktionsprofil (*relaxed-scan*-Berechnung) der Inhibitionsreaktion des bicyclischen O,O-Acetal Inhibitors **1** mit dem aktiven Zentrum der GM II. Die beiden in der Abbildung gezeigten Wassermoleküle sind im QM-Bereich der QM/MM-Berechnung eingeschlossen. SP: Einzelpunkt-Berechnung der Energie.

Das so erhaltene Reaktionsprofil ist kein Minimum-Energie-Pfad (MEP) und kann ausschließlich die Informationen über die Thermodynamik der chemischen Reaktion liefern. Die Reaktion ist in dieser Betrachtung leicht endotherm. Die Inhibitionsreaktion weist einen Wert der relativen Energie des Produktes von +1,4 kcal/mol auf (relativ zur Energie der Geometrie des neuen Edukts, Abbildung 4.19). Trotz der begünstigenden Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem OD2-Atom des Aspartataminosäurerests Asp341 in seiner deprotonierten Form, dem Proton des benachbarten Tyrosinaminosäurerestes Tyr269 sowie der Wechselwirkung des OD1-Atoms mit dem Proton des nächst-stehenden Wassermoleküls (WAT1, Abbildung 4.20) in der Geometrie des Produkts (kovalenter Enzym-Inhibitor-Komplex), zeigt sich das Produkt weniger stabil als das Edukt (nicht-kovalenter Enzym-Inhibitor-Komplex). Die leicht endotherme, nahezu thermo-neutrale chemische Reaktion des Inhibitors Nr. **1** mit den Aminosäureresten der aktiven Tasche der Mannosidase GM II lässt die Vorhersage zu, dass zunächst kein Beitrag zur Affinität des Inhibitors Nr. **1** durch die chemische Bindung zu erwarten ist. Die erhöhte Triebkraft der Reaktion wird durch den Übergang zu dem Inhibitor Nr. **7**, wie in dem nächsten Kapitel gezeigt wird, erreicht. Für diesen Schritt der Arbeit stimmen die Berechnungen in Lösung und im Enzym gut überein.

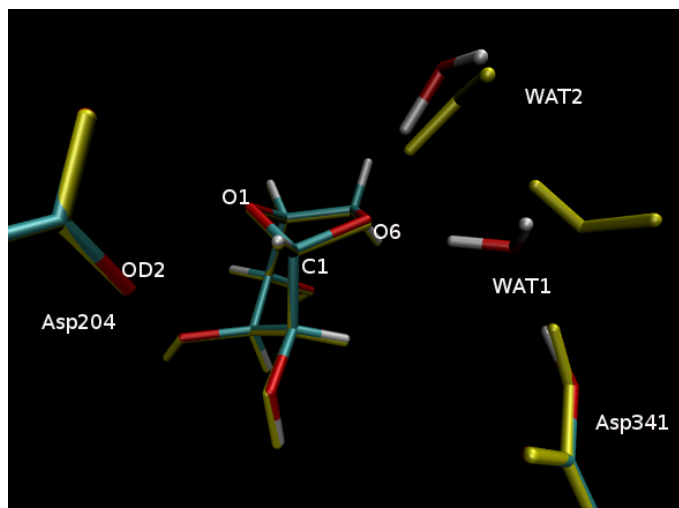


Abbildung 4.20: Überlagerung der Geometrien der nicht-kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplexe (Edukte). Gelb: das neue Edukt, der Protontransfer ist über zwei Wassermoleküle möglich. CPK-Darstellung: Edukt, welches den Protontransfer über ein Wassermolekül ermöglicht.

Wenden wir uns den abschließenden Schritten in der Untersuchung zu der Leitstruktur des Inhibitors der Mannosidase GM II zu, welche das Reaktionsprofil mit dem optimalen Netzwerk aus zwei Wassermolekülen mit Hilfe des NEB-Algorithmus im Rahmen der QM/MM-Methodik berechnen lässt. Hieraus ergibt

sich für die Thermodynamik der betrachteten D_{NA_N} -Reaktion ein nahezu thermoneutraler Wert von 0,8 kcal/mol (Abbildung 4.22). Die Übereinstimmung der Werte der Reaktionsenergie in Lösung und im Enzym konnte hierdurch verbessert werden.

Die schematische Darstellung und das Ergebnis mit dem Plot der relativen Energien der Geometrien auf dem MEP sind entsprechend in den Abbildungen 4.21 und 4.22 dargestellt.

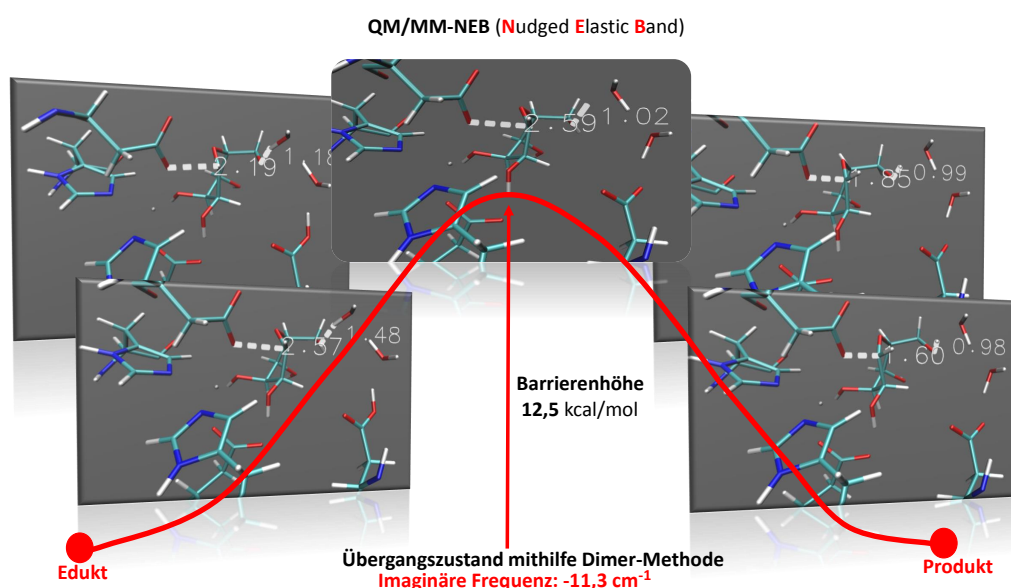


Abbildung 4.21: Schematische Darstellung der Methode zur Ermittlung der Barrierrhöhe am Beispiel der Inhibition der GM II durch den Inhibitor Nr. **1** (β -L-Anhydrogulose). Durch die berechneten Geometrien des Edukts und des Produkts wird der Minimum-Energie-Pfad (MEP) der Reaktion auf einem „elastischen Band“ ermittelt. Der Übergangszustand wird mittels der Dimer-Methode optimiert. Zum Nachweis der Richtigkeit des somit gefundenen Übergangszustands dient das Vorhandensein einer einzigen imaginären Frequenz unter allen berechneten Werten der Frequenzen.

Der NEB-Algorithmus berücksichtigt, erstens, die manuellen Schritte der durchgeführten QM/MM-Berechnung des Reaktionspfades in Vorarbeiten. Hierbei werden die Geometrien, die zwischen dem Edukt und dem Produkt liegen, durch die Projektion der Reaktionskoordinaten erstellt (ein „Band“) und entsprechend dem NEB-Formalismus optimiert. Die zunächst interpolierten Strukturen entlang des Bandes werden in der Regel durch ein Kraftprojektionsschema zum gesuchten Reaktionsprofil relaxiert. Die NEB^[14]-Methode zählt zu den etablierten Methoden zur Berechnungen der Barrieren einer chemischen Reaktion.^[20] Die NEB-Prozedur, so wie diese im QM/MM-Interface von CHEMSHELL^[180] implementiert ist, verwendet den CI-NEB^[15]-Algorithmus (von engl. *climbing image* oder, wie im Weiteren abge-

kürzt, die CI-Geometrie), d.h. die CI-Geometrie wird als eine zusätzliche Geometrie evaluiert, die einen potentiellen Übergangszustand des Reaktionspfades darstellt. Der modulare Aufbau des QM/MM-Interfaces CHEMSHELL^[180] erlaubt eine anschließende Optimierung der CI-Geometrie mit Hilfe der Dimer^{[23][24]}-Methode, die für die Optimierung des Übergangszustandes sehr gut geeignet ist. Im Weiteren wird die daraus resultierende Geometrie als Dimer-Geometrie bezeichnet.

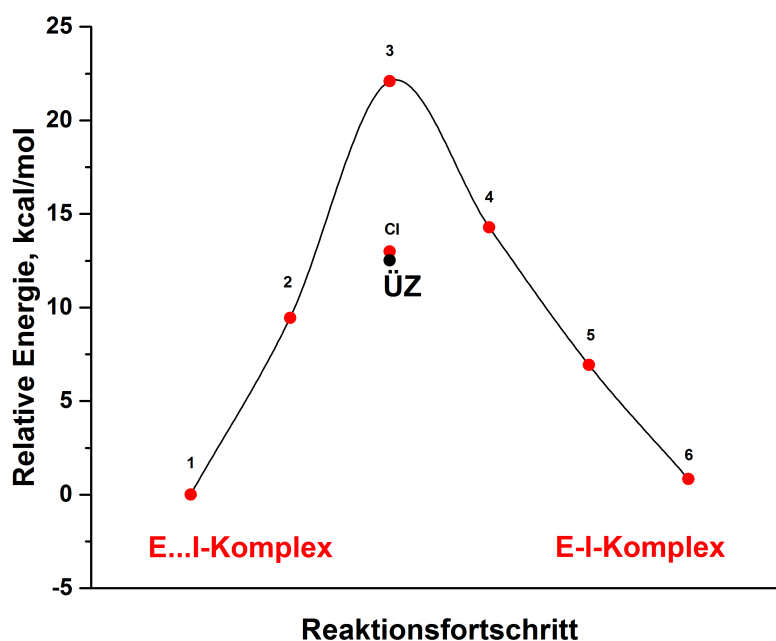


Abbildung 4.22: Minimumenergiepfad (MEP) der Inhibitionsreaktion der Mannosidase GM II durch die D_NA_N -Reaktion zwischen dem katalytischen Aminosäurerest Asp204 und dem Inhibitor Nr. **1** (β -L-Anhydrogulose). **ÜZ**: Dimer-Geometrie des Übergangszustandes. **CI**: climbing image-Geometrie des NEB-Reaktionspfades.

Betrachten wir nun die Geometrien, die aus der NEB-Berechnung resultieren. Die Geometrie des Übergangszustandes, die mit Hilfe des Dimer-Algorithmus optimiert wurde (Dimer-Geometrie), konvergiert hier innerhalb nur eines Rechenzyklus der Optimierung mit dem PRFO-Algorithmus (partitioned rational function optimisation method)^[21]. Diese Information liefert zunächst ein Indiz dafür, dass tatsächlich ein Übergangszustand gefunden wurde. Zum Vergleich, die Optimierung der CI-Geometrie mit dem PRFO-Algorithmus kann nicht zur Konvergenz gebracht werden. Die Energiedifferenz zwischen den beiden Geometrien beträgt dabei weniger als 0,5 kcal/mol (0,000769 a.u.). Die Überlagerung der CI- und Dimer-Geometrien ist in der Abbildung 4.23 dargestellt.

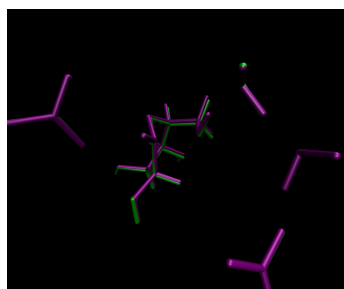


Abbildung 4.23: Vergleich der CI- und Dimer-Geometrien. Lila: climbing image (CI)-Geometrie. Grün: Übergangszustand-Geometrie erhalten durch die Dimer-Methode.

Eine gute Übereinstimmung für die Werte der charakteristischen Bindungslängen des Enzym-Inhibitor-Komplexes zu diesen des Enzym-Substrat-Komplexes, die durch Petersen *et al.* berechnet wurden, finden sich auch wieder in der vorliegenden Berechnung. Die Bindung $d(\text{C1-O1})$ im Enzym-Inhibitor-Komplex des Übergangszustandes beträgt $1,34 \text{ \AA}$. Der berechnete Übergangszustand (Dimer-Geometrie) weist mehr strukturelle Ähnlichkeiten zur TS-Geometrie des Substrat-Komplexes ($1,32 \text{ \AA}$, Tabelle 4.7) als zu dem OCI-Zustand P' mit $d(\text{C1-O1})=1,29 \text{ \AA}$ auf. Dies konnte auch in den Test-Berechnungen (siehe Tabelle 4.6) gezeigt werden. Zusätzlich ist die Bindung $d(\text{C1-O6})$ von $1,85 \text{ \AA}$ deutlich der TS- als der P'-Geometrie des Substrat-Komplexes ($2,00 \text{ \AA}$ gegenüber $2,57 \text{ \AA}$) näher. Die Bindungslängen der resultierenden Geometrien und der Vergleich zu dem Enzym-Substrat-Komplex sind in Tabelle 4.7 zusammengefasst.

Wie bereits durch die ersten Berechnungen gezeigt wurde, hängt die Barrierenhöhe stark davon ab, ob die Wasserstoffbrücken im Netzwerk der Wassermoleküle in der Tasche sowie zum Inhibitor und auch zum Aspartataminosäurerest Asp341 vorhanden sind. Geometrien mit vergleichbar besser ausgebildeten Wasserstoffbrücken sind energetisch stabilisiert. Der errechnete Wert der Barriere mit Hilfe der CI-NEB/Dimer-Berechnung beträgt $12,5 \text{ kcal/mol}$ (Tabelle 4.8). Die deutlich höher liegende Geometrie Nr. 3 ähnelt den Geometrien der Barriere des Reaktionspfades ohne Wasserkatalyse durch ihre geometrische Charakteristik $d(\text{OD2-C1})=2,35 \text{ \AA}$. Analysiert man die weiteren geometrischen Charakteristiken dieser hoch energetischen Geometrie, erkennt man, dass das H1-Atom des Wassers W2 ziemlich „mittig“ zwischen dem O1-Atom des Inhibitors und dem O-Atom dieses Wassers liegt (Tabelle 4.9). Diese nahezu ionische Geometrie, in der das Wassermolekül WAT2 verzerrt ist, konnte im NEB-Zyklus bis zur Konvergenz optimiert werden und zeichnet sich durch eine vergleichbar hohe relative Energie aus. Durch den CI-Algorithmus wurde die Geometrie Nr. 3 auf dem „elastischen Band“ zu der energetisch günstigeren CI-Geometrie optimiert. Deswegen werden im Plot des MEP die Werte der relativen Energien dieser Geometrien auf dem glei-

chen Punkt des Reaktionsfortschritts dargestellt (Abbildung 4.22).

Tabelle 4.7: Charakteristische Bindungslängen in CI- und Dimer-Geometrien des Inhibitor-Komplexes und Barriere-Geometrien des Substrat-Komplexes (TS und P') von Petersen et al^[94]. Die Literaturwerte, mit welchen Übereinstimmungen vorliegen, sind mit der Schriftart Fett hervorgehoben. Näheres siehe Text.

Geometrie	OD2-C1	C1-O6	C1-O1
CI	2,61	1,75	1,35
TS	2,93	2,00	1,32
P'	2,56	2,57	1,29
Dimer	2,59	1,85	1,34

Tabelle 4.8: Charakteristische Bindungsabstände der Geometrien von Enzym-Inhibitor-Komplexen (Inhibitor Nr. **1**) entlang des graphisch dargestellten MEPs (siehe Abbildung 4.22). Die relativen Energien sind in kcal/mol angegeben.

Geom. Nr.	Energie		Bindungsabstände in Å			
	absolut (a.u.)	relativ	d(OD2-C1)	d(C1-O6)	d(C1-O1)	d(O _{w1} -HD2)
1	-3779,4809	0,00	2,80	1,49	1,42	1,68
2	-3779,4658	9,45	2,57	1,77	1,37	1,61
3	-3779,4457	22,09	2,35	2,12	1,33	1,48
4	-3779,4581	14,29	2,16	2,42	1,31	1,08
5	-3779,4700	6,94	1,85	2,79	1,34	1,08
6	-3779,4795	0,84	1,60	3,18	1,37	1,05
CI	-3779,4602	13,00	2,61	1,75	1,35	1,10
ÜZ	-3779,4610	12,51	2,59	1,85	1,34	1,08

Die erhaltenen Ergebnisse für die Barriere der Reaktion wurden durch die Berechnung der Normalmoden und Schwingungsfrequenzen überprüft. Die Berechnung der harmonischen Frequenzen an der Dimer-Geometrie ergaben eine einzige imaginäre Frequenz mit dem Wert von $-11,33 \text{ cm}^{-1}$ (Abbildung 4.24). Die Bewegungsmode für diese Normalschwingung entspricht der molekularen Bewegung, bei welcher der nucleophile Angriff des katalytischen Carboxylats und die Ringöffnung im Inhibitor in einer abwechselnden molekularen Bewegung beobachtet werden kann (Abbildung 4.25).

Tabelle 4.9: Charakteristische Atomabstände der Wasserstoffbrückenbindungen der Geometrien von Enzym-Inhibitor-Komplexen (Inhibitor Nr. **1**) entlang des graphisch dargestellten MEPs (siehe Abbildung 4.22).

Geom.	Atomabstände				
	d(O1-H _{W2})	d(O _{W2} -H _{W2})	d(O _{W2} -H _{W1})	d(O _{W1} -H _{A341})	d(O _{A341} -HD2)
1	1,66		1,77	1,68	1,01
2	1,48		1,63	1,61	1,03
3	1,18	1,32	1,44	1,48	1,08
4	1,01		1,08	1,14	1,32
5	0,99	1,77	1,03	1,08	1,43
6	0,98	1,94	1,01	1,05	1,51
CI	1,03		1,06	1,10	1,39
ÜZ	1,02		1,04	1,08	1,43

```

***** 1 imaginary frequencies (negative signs) *****

=====
harmonic frequencies (cm**-1) and normalised normal coordinates
=====

          1          2          3          4          5          6          7          8          9
=====
frequencies ----  -11.3323  77.9346  90.5171  100.3115  108.5303  120.0958  127.7211  128.3515  136.6908
=====

coord atom element
=====

```

Abbildung 4.24: Auszug aus dem Ergebnis der Berechnung der Normalmoden und Schwingungsfrequenzen des Übergangszustandes des Enzym-Inhibitor-Komplexes GM II-**1** nach der CI-NEB-Dimer^{[15][14][23][24]}-Methode innerhalb des QM/MM-Formalismus. Die imaginäre Frequenz im Wert von $-11,3323 \text{ cm}^{-1}$ wurde somit gefunden.

Abbildung 4.25: Visualisierung der molekularen Bewegung (siehe als Animation im pdf-Format) im Übergangszustand für das Enzym-Inhibitor Komplex GM II-1 mit der imaginären Frequenz von $-11,33 \text{ cm}^{-1}$, berechnet mit Hilfe der CI-NEB-Dimer-Methodik innerhalb des QM/MM-Formalismus. Die Abbildungen der Animation wurden mit Hilfe des Molden-Pakets^[26] dargestellt.

D). Berechnung der 3-d PES mit dem kontrollierten Protontransfer der Inhibitionsreaktion

Die NEB-Methode ist ein Formalismus, der zunächst nur zwei Strukturen benötigt, die eine vom Produkt und die andere vom Edukt. Anschließend kann sie als Blackbox-Methode verwendet werden, um ein Reaktionsprofil zu erhalten. Zur Überprüfung und Zwecks des Vergleichs wurde ein 3-dimensionaler PES-Scan (relative Energie abhängig von zwei Reaktionskoordinaten) durchgeführt, der die Ergebnisse der NEB-Berechnung widerspiegelt und bestätigt. Mit Hilfe der Daten über die wasserkatalysierte Reaktion (NEB-MEP) wurde die PES 3-dimensional mit den Reaktionskoordinaten $d(\text{OD2-C1})$ und $d(\text{O6-H})$ (genauer $d(\text{O6-H1}_{\text{Wat2}})$) von der Situation Edukt (Abbildung 4.16) zur Situation Produkt (Abbildung 4.26) durch die nacheinander folgende Optimierung der Geometrien auf der PES erhalten.

Die Protonübertragung wurde zu Beginn der Optimierung jeder Geometrie kontrolliert vordefiniert. Auf die Details so einen kontrollierten Protontransfers wird im Folgenden eingegangen. Die Atomabstände des Wassermolekül-Netzwerkes - $d(\text{O}_{\text{Wat2}}-\text{H1}_{\text{Wat1}})$ und $d(\text{HD2}-\text{O}_{\text{Wat1}})$ - wurden vor der Berechnung auf den gleichen Wert gesetzt, und zwar so, dass dieser gleich dem aktuellen Wert für den Bindungsabstand $d(\text{O6-H1}_{\text{Wat2}})$ ist. Diese Änderung der Atomabstände ist dem Reaktionsmechanismus mit der Protonübertragung nach Grotthus konform, denn sie

stellt einen logischen Fluss des Protons vom protonierten Aspartataminosäurerest zu dem Inhibitor (Abbildung 4.9). Anschließend wurden für alle Atomabstände ihre optimalen Werte berechnet, während die zwei oben genannten Reaktionskoordinaten, Atomabstände $d(\text{O6-H1}_{\text{Wat2}})$, entsprechend dem 2D-Gitternetz festgehalten wurden. Das heißt, alle Freiheitsgrade des Enzym-Inhibitor-Komplexes wurden in Abhängigkeit von zwei Reaktionskoordinaten optimiert. Die resultierende Potentialhyperfläche (PES) mit den beschriebenen Einstellungen ist in der Abbildung 4.26 dargestellt. Die PES der berechneten D_NA_N -Reaktion für die Inhibition der Mannosidase GM II mit dem Inhibitor Nr. **1** sagt eine leicht endotherme Reaktion von 1,0 kcal/mol vorher.

Die Geometrie mit den Reaktionskoordinaten $d(\text{OD2-C1})=2,6 \text{ \AA}$ und $d(\text{O6-H})=1,0 \text{ \AA}$ ist zunächst visuell aufgrund der Form der Barriere der PES ein potentieller Übergangszustand. Wie diese Geometrie zu einem Übergangszustand optimiert werden kann, konnte mit Hilfe des PRF-O^{[181][21]}-Algorithmus (*Partitioned Rational Function Optimization*, Skript zur Berechnung mit Hilfe des CHEMSHELL-Moduls^[43] *prfo* kann dem Appendix 6.7 nachvollzogen werden) realisiert werden. Diese Geometrie konvergiert, wobei eine sehr kleine Änderung des Bindungsabstandes $d(\text{OD2-C1})$ von 0,15 Å festgestellt werden kann. Die Höhe der Reaktionsbarriere beträgt 12,50 kcal/mol (relativ zu dem Edukt auf der zweidimensionalen PES). Die Berechnung der Normalmoden an der optimierten Geometrie (Skript zur Berechnung kann dem Appendix 6.8 nachvollzogen werden) ergibt eine einzige imaginäre Frequenz mit dem Wert von $-14,0 \text{ cm}^{-1}$. Die Schwingungsmode dieser Frequenz ist sehr ähnlich der, die durch CI-NEB-Dimer^{[15][23][24]}-Prozedur erhalten wurde (Abbildung 4.25).

In diesem Kapitel wurde ein Einblick in die Inhibition der Mannosidase GM II durch die D_NA_N -Reaktion mit dem bicyclischen Acetal-Inhibitor (Inhibitor Nr. **1**) mit Hilfe der Berechnung im Enzym geschaffen. Die Ergebnisse für die Reaktion im Enzym stimmen mit den Berechnungen in der Lösung überein. Die Entwicklung des kovalent-reversiblen Inhibitors für GM II als einen bicyclischen N,O-Acetal-Inhibitor (Inhibitor Nr. **7**) werden im folgenden Abschnitt dargelegt.

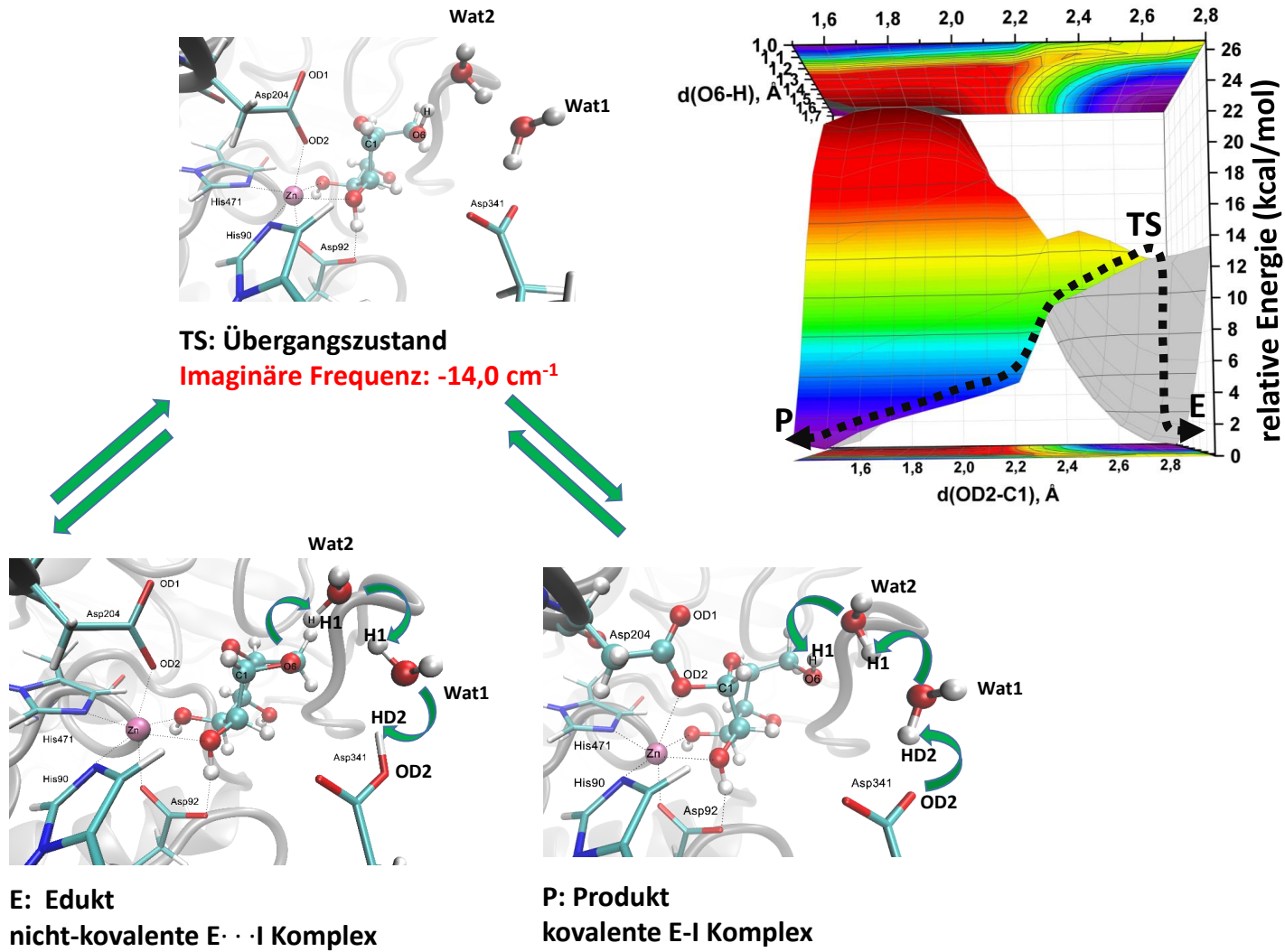


Abbildung 4.26: Reaktionsprofil der $D_N A_N$ -Reaktion des Inhibitors Nr. **1** mit den katalytischen Aminosäureresten der Mannosidase GM II durch die 3-d PES-Berechnung mit dem kontrolliertem Protontransfer. Näheres siehe Text.

Berechnungen des Reaktionspfades des Inhibitors 7

A). Vorarbeiten: Protonierungszustand des Inhibitors im Enzym

Die Berechnungen der Reaktionsenergien in wässriger Lösung zeigten eine höhere Triebkraft für die Ausbildung des Adduktes aus dem bicyclischen N,O-Acetal-Inhibitor (Inhibitor Nr. **7** in der Tabelle 4.3) und dem Essigsäuremolekül im Vergleich zu den Daten des Inhibitors Nr. **1**. Hierbei wurde eine um ca. 5 kcal/mol exothermere Reaktion für den Fall, dass der Inhibitor in seiner protonierten Form vorliegt (Abbildung 4.6), vorhergesagt. Eine sehr gute Richtlinie zur Abschätzung der Basizität von Verbindungen stellt der pKa-Wert dar. Aufgrund seines pKa-Wertes von ungefähr 11, soll der Inhibitor Nr. **7** in seiner protonierten Form in der wässrigen Lösung vorliegen. Die Richtigkeit dieser Annahme bestätigen auch die Test-Berechnungen des Reaktionsprofils im Enzym, in welchen der Inhibitor **7** in seiner deprotonierten Form vorliegt (Abbildung 4.27). Diese Test-Berechnung zeigt, dass der Inhibitor während des nukleophilen Angriffs des Aspartataminosäurerests Asp204 spontan durch das basische Aspartataminosäurerest Asp341 protoniert wird (Abbildung 4.27). Infolgedessen gilt dies als Nachweis, dass der Inhibitor zum Start der Reaktion bereits protoniert vorliegen sollte.

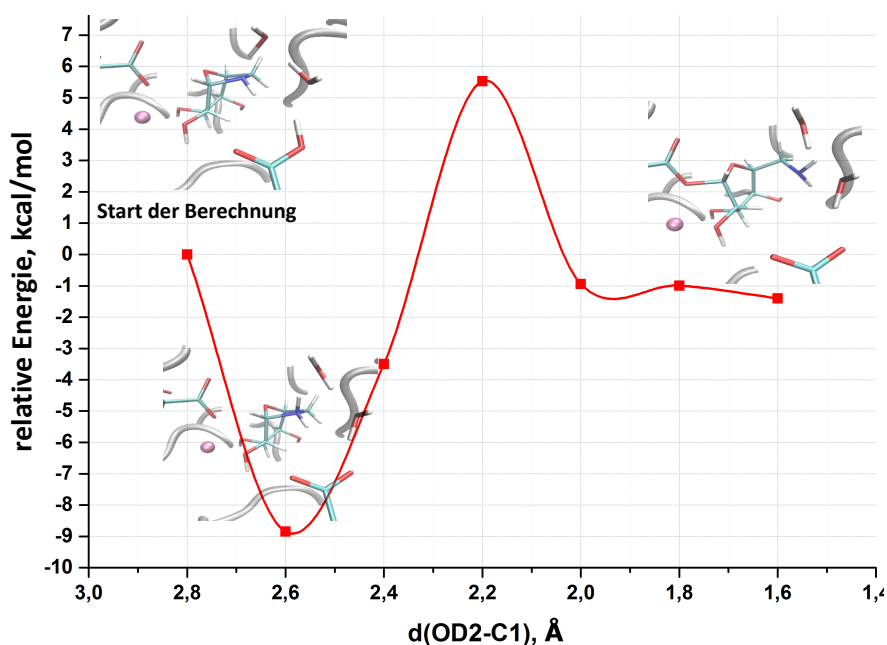


Abbildung 4.27: Reaktionsprofil für die Additionsreaktion des Inhibitors Nr. **7** in der deprotonierten Form mit den katalytischen Aminosäureresten der Mannosidase GM II.

Dieses Reaktionsprofil wurde ausgehend von dem nicht-kovalenten Enzym-Inhibitor-

Komplex erstellt. Die Berechnung geht von der Geometrie aus, die durch Ersetzen des O6-Atoms durch ein N-Atom in der Geometrie des nicht-kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplexes (deprotonierte Form) entsteht. Der nächste Schritt in der Entwicklung eines kovalent-reversiblen Inhibitors - Inhibitor Nr. **7** - beinhaltet die Berechnung seines Reaktionsprofils und des MEP in der protonierten Form im Enzym. Die Ergebnisse dieser Arbeit werden im Folgenden vorgestellt und diskutiert.

B). Vorarbeiten zur Ermittlung des Reaktionsprofils

Die Startgeometrie für den nicht-kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplex der Mannosidase GM II mit dem Inhibitor Nr. **7** wurde ausgehend von der Geometrie des nicht-kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplexes der Mannosidase GM II mit dem Inhibitor Nr. **1** (Leitstruktur) optimiert. Um die Startgeometrie darzustellen, wurde das O6-Atom durch die NH²⁺-Einheit in der Geometrie des Enzym-Inhibitor-Komplexes ersetzt. Der QM-Bereich für das QM/MM-System wurde zunächst konsistent den Berechnungen zum Inhibitor Nr. **1** angewendet (Abbildung 4.8). Die molekulare Geometrie des resultierenden nicht-kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplexes ist in der Abbildung 4.28 als Startgeometrie mit der relativen Energie von 0 kcal/mol dargestellt. Durch die Optimierung aller Freiheitsgrade wurde für das „aktive“ Wassermolekül **Wat1** (Abbildung 4.28) seine optimale Position berechnet. Obwohl nur das **Wat1** im QM-Bereich dieser Berechnung berücksichtigt ist, stellt die Geometrie ein begünstigtes Netzwerk der beiden Wassermoleküle, die auch nach Grotthus das Proton transportieren könnten, dar. Anschließend wurde unter der Anwendung von *relaxed-scan*-Berechnung das Reaktionsprofil in Abhängigkeit von der Reaktionskoordinate d(OD2-C1), indem diese sukzessive verkürzt wurde, aufgestellt. Hierbei wurde zunächst mit RI^{[33][34][35]}-BLYP^{[36][134][40][37]} und dann mit B3LYP^{[36][134][40][37]} bei gleichem Basissatz def-TZVP^{[39][38]} (RI-BLYP/def-TZVP//B3LYP/def-TZVP, Abbildung 4.28) untersucht. An dieser Stelle bestätigt sich die Erfahrung, dass mit Hilfe der *relaxed-scan*- und der standardmäßigen 3-dimensionalen PES-Berechnung sich der Protontransfer nicht erfassen lässt. Deswegen sollte die Geometrie des Produkts (des kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplexes) erneut berechnet werden und mit dem Reaktionsprofil ohne Berücksichtigung von Protonentransfer verglichen werden. Dies erfolgt in dem nächsten Unterabschnitt.

Die Energie der Reaktion der GM II mit dem N,O-Acetal-Inhibitor zu dem kovalenten Addukt, ohne Berücksichtigung von Protonentransfer wurde somit zu ca. -10 kcal/mol berechnet. Das bedeutet, dass die Reaktionsenergie der Ausbildung der kovalenten Bindung zwischen dem katalytischen Zentrum und dem Inhibitor Nr. **7** genau in einem Energie-Fenster, welches der Thermodynamik einer kovalent-

reversiblen Reaktion entspricht liegt. Das Reaktionsprofil ist im Einklang mit dem Hammond-Postulat, das für eine exotherme Reaktion einen frühen Übergangszustand zeigen sollte. Die Barriere der Inhibitionsreaktion ist mit ca. 3 kcal/mol relativ niedrig. Dies ist konform zur Eyring-Beziehung für die Aktivierungszustände, denn die Aktivierungsenergie ist um so kleiner, je exothermer die Reaktionsenergie ist. Im Vergleich zu dem thermoneutralen, nahezu endothermen O,O-Acetal-Inhibitor mit der Reaktionsbarriere, die zwischen ca. 5 und ca. 17 kcal/mol variieren kann, weist der leicht exotherme N,O-Inhibitor eine niedrigere Barriere von ca. 3 kcal/mol (Thermodynamikvergleich von Inhibitoren innerhalb der gleichen Methodik, d.h. ohne Berücksichtigung von Protonentransfer) auf.

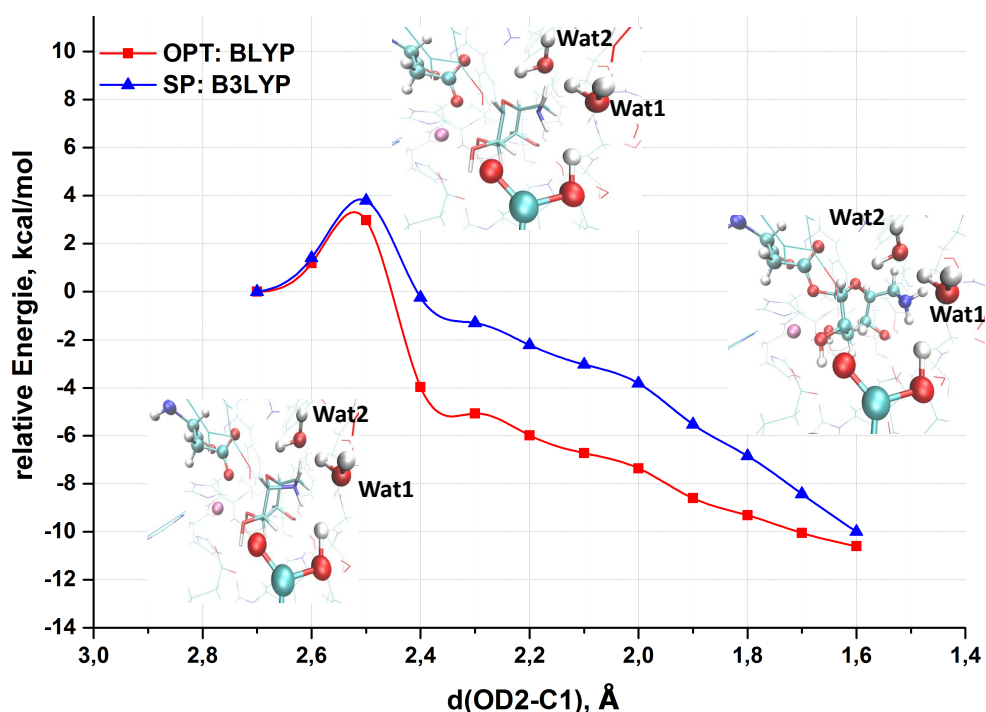


Abbildung 4.28: Reaktionsprofil für die Addition Reaktion des Inhibitors Nr. 7 mit dem katalytischen Aspartat Asp204 Aminosäurerest der Mannosidase GM II. OPT: Geometrieoptimierung. SP: Einzelpunkt-Berechnung der Energie.

C). Auffinden des MEP für den Inhibitor Nr. 7

In den bisher durchgeführten Berechnungen konnte der Protonentransfer, der für Mannosidasen charakteristisch ist, nicht berücksichtigt werden. Das berechnete Reaktionsprofil (Abbildung 4.28) zeigt zunächst die Barriere durch den nukleophilen Angriff und nicht durch die Wasserkatalyse, wie es bei dem **Inhibitor Nr. 1** durch die Test-Berechnungen gezeigt wurde. Das Proton des basischen Aspartataminosäurerests Asp341 sollte zu der NH_2 -Einheit des kovalenten E-

I-Komplexes übertragen werden, wird aber in dieser Berechnung aufgrund des fehlenden Wasser-Netzwerkes zur Protonübertragung nicht erfasst. Um das komplette Bild der Inhibitionsreaktion der Mannosidase GM II durch den neuen bicyclischen N,O-Acetal-Inhibitor zu bekommen, wurde die NEB-Methode aufgrund der guten Erfahrung mit dem O,O-Acetal-Inhibitor angewendet. Hierfür benötigt man die Geometrie des Produktes, bei welchem der Protonentransfer von basischem Aspartataminosäurerest Asp341 über zwei Wassermoleküle (analog dem Inhibitor Nr. **1**, Abbildung 4.11) stattfindet. Um die Geometrie des kovalenten E-I-Komplexes mit dem stattgefundenen Protonentransfer zu berechnen, wurde in der Geometrie des Produktes translativ eine manuelle Protonenverschiebung und anschließend die Geometrieoptimierung aller Freiheitsgrade dieser Geometrie durchgeführt. Die Protonenverschiebung ist in der Abbildung 4.29 dargestellt. Die Atome H1 der Wassermoleküle Wat1 und Wat2 und auch das Atom HD2 des basischen Aspartataminosäurerests Asp341 wurden gleichzeitig zu den bindenden O-H-Bindungsabständen gesetzt. Anschließend wurden alle Freiheitsgrade dieser Geometrie optimiert.

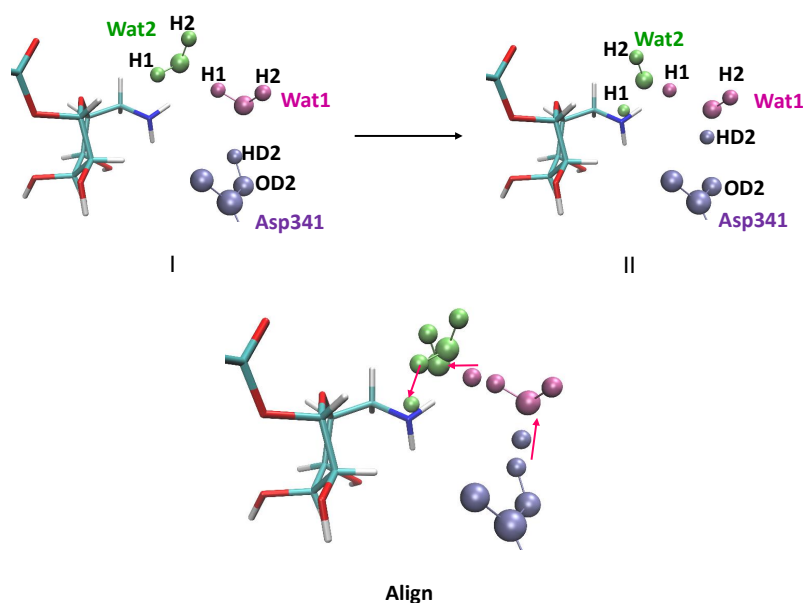


Abbildung 4.29: Vorbereitung der Geometrie des kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplexes der Mannosidase GM II mit dem N,O-Acetal-Inhibitor für die Berücksichtigung des Protontransfers im aktiven Zentrum. I: Ausgangsgeometrie, II: Finalgeometrie, Align: Überlagerung der Geometrien I und II. Pfeile zeigen die eingeführte Protonenverschiebung. Näheres siehe Text.

Die Optimierung des Reaktionspfades zu dem Minimumenergiepfad (MEP) kann für den **Inhibitor Nr. 7** nur mit der Anwendung der Dispersion-Korrektur er-

folgreich durchgeführt werden. Näheres zur Dispersion-Korrektur ist im Kapitel Anhänge und in der Abbildung 6.10 dargelegt. Der resultierende MEP für die Inhibition der Mannosidase GM II durch die Additionsreaktion des bicyclischen N,O-Acetal-Inhibitors mit der Berücksichtigung der Protonübertragung durch den basischen Aspartataminosäurerest Asp341 ist in der Abbildung 4.30 gezeigt. Die Inhibitionsreaktion ist mit ca. -13 kcal/mol (für genauere Werte der Energien siehe Zusammenfassung in Tabelle 4.10) leicht exotherm. Deswegen erwartet man eine effektive Erhöhung der Affinität des Inhibitors Nr. **7** gegenüber dieser des Inhibitors Nr. **1**. Dieser Wert liegt soeben im Bereich der Reaktionsenergien, die für die reversiblen Reaktionen typisch sind. Die relativen Energien der Geometrien für die Rückreaktion vom kovalenten zum nicht-kovalenten Enzym-Inhibitor Komplex sind in der Abbildung 4.30 ersichtlich. Geht man davon aus, dass in der Rückreaktion nur die relativ kleinen Barrieren von ca. 8 und 16 kcal/mol überwunden werden müssen, um zum ursprünglichen Edukt (der nicht-kovalente Enzym-Inhibitor-Komplex, Geometrie **8**) zu gelangen, kann die Gesamtreaktion zwischen GM II und Inhibitor Nr. **7** als reversibel angesehen werden.

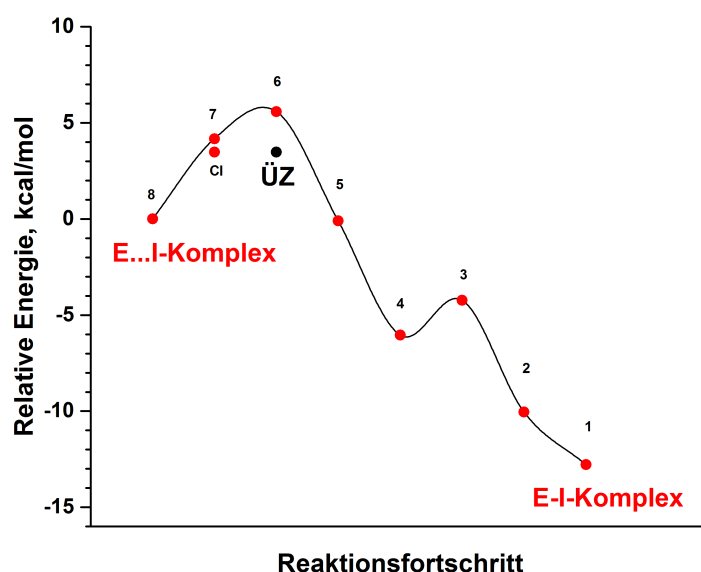


Abbildung 4.30: Minimumenergiepfad (MEP) der Inhibitionsreaktion der Mannosidase GM II durch die $A_N D_N$ -Reaktion zwischen dem katalytischen Aminosäurerest Asp204 und dem Inhibitor Nr. **7** (bicyclische N,O-Acetal-Inhibitor basierend auf der β -L-Anhydrogulose als Leitstruktur). **ÜZ**: Dimer-Geometrie des Übergangszustandes. **CI**: climbing image-Geometrie des NEB-Reaktionspfades.

Die Geometrien der Enzym-Inhibitor-Komplexe der Mannosidase GM II und des Inhibitors Nr. **7** auf dem berechneten MEP (Abbildung 4.30) sind in den Abbildun-

gen 4.31 - 4.38 von der Geometrie des Eduktes (**8**) zu der Geometrie des Produktes (**1**) dargestellt. Das Reaktionsprofil besitzt konform dem Hammond-Postulat einen „frühen“ Übergangszustand (ÜZ), der geometrisch dem Edukt (der nicht-kovalente Enzym-Inhibitor-Komplex) ähnlich ist. Die Protonübertragung von dem Proton einliefernden Aspartataminosäurerest Asp341 erfolgt erst in der Geometrie **3**, und zwar nachdem der nukleophile Angriff durch Asp204 in der Geometrie **4** von statten gegangen ist (Abbildung 4.30 und Abbildungen 4.35 und 4.36). Dieser Schritt ist durch eine relativ kleine Barriere von ca. 2 kcal/mol charakterisiert. Die ausgewählten charakteristischen Bindungsabstände der Enzym-Inhibitor Komplexe auf dem MEP sind in den Tabellen 4.10 und 4.11 zusammengefasst.

Die überlagerten Geometrien der Enzym-Inhibitor-Komplexe des Übergangszustandes (ÜZ) und diejenigen, die an das ÜZ angrenzen, sind in der Abbildung 4.39 vorgestellt. Analog zu der NEB-Berechnung von MEP des Inhibitors **Nr. 1** wurde für die Geometrie **6**, die höchste relative Energie besitzt, eine alternative CI-Geometrie gefunden. Die CI-Geometrie lässt sich des Weiteren innerhalb des Dimer-Algorithmus zum Übergangszustand (Dimer-Geometrie) optimieren. Der Übergangszustand der Reaktion für den berechneten MEP wurde durch die Berechnung der Normalmoden und Schwingungsfrequenzen evaluiert. Die Berechnung der harmonischen Frequenzen an der Dimer-Geometrie ergibt eine einzige imaginäre Frequenz mit dem Wert von $-100,76 \text{ cm}^{-1}$ und belegt somit, dass die berechnete Geometrie einen Übergangszustand darstellt (Abbildung 4.40, Skript zur Berechnung mit FORCE^[198]-Modul ist in Anhänge unter Listing 6.8 gezeigt). Die Bewegungsmode für die Normalschwingung $-100,76 \text{ cm}^{-1}$ entspricht der molekularen Bewegung, die den nucleophilen Angriff des katalytischen Carboxylats und die Ringöffnung im Inhibitor abwechselnd zeigt (Abbildung 4.41). Dabei verkürzt sich die erste Bindung (d(OD2-C1)), während sich die zweite (d(C1-N)) um denselben Betrag verlängert und umgekehrt.

Tabelle 4.10: Charakteristische Bindungsabstände der Geometrien der Enzym-Inhibitor-Komplexe (Inhibitor Nr. 7) auf dem MEP (siehe Abbildung 4.30) der Inhibitionsreaktion. Die relativen Energien sind in kcal/mol gegeben.

Geom. Nr.	Energie		Bindungsabstände in Å			
	absolut (a.u.)	relativ	d(OD2-C1)	d(C1-N)	d(C1-O1)	d(O _{W1} -HD2)
8	-3760,1678	0,00	2,83	1,66	1,38	1,70
7	-3760,1611	4,17	2,67	2,00	1,33	1,68
6	-3760,1589	5,59	2,33	2,52	1,30	1,65
5	-3760,1680	-0,10	1,98	2,93	1,30	1,62
4	-3760,1775	-6,04	1,69	3,21	1,34	1,56
3	-3760,1746	-4,23	1,60	3,29	1,37	1,10
2	-3760,1838	-10,04	1,56	3,42	1,38	1,07
1	-3760,1882	-12,79	1,53	3,59	1,39	1,05
CI	-3760,1623	3,47	2,51	2,26	1,31	1,70
ÜZ	-3760,1623	3,47	2,51	2,26	1,31	1,70

Tabelle 4.11: Charakteristische Atomabstände der Wasserstoffbrückenbindungen der Geometrien der Enzym-Inhibitor-Komplexe (Inhibitor Nr. 7) auf dem MEP (siehe Abbildung 4.30) der Inhibitionsreaktion.

Geom. Nr.	Atomabstände				
	d(N-H _{W2})	d(H _{N-Inh} -O _{W2})	d(O _{W2} -H _{W1})	d(O _{W1} -H _{A341})	d(O _{A341} -HD2)
8	3,09	2,15	1,83	1,70	1,01
7	2,87	2,16	1,80	1,68	1,01
6	2,64	2,33	1,75	1,65	1,02
5	2,29	2,52	1,70	1,62	1,02
4	1,81	2,62	1,62	1,56	1,03
3	1,06	-	1,07	1,10	1,38
2	1,05	-	1,04	1,07	1,46
1	1,04	-	1,03	1,05	1,50
CI	3,17	2,40	1,81	1,70	1,01
ÜZ	3,17	2,40	1,81	1,70	1,01

8

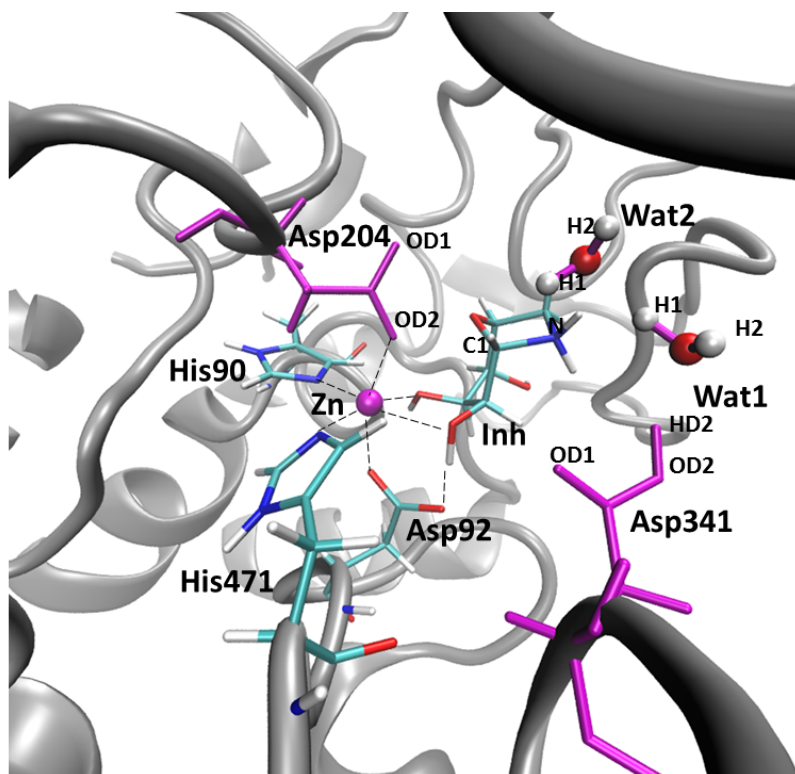


Abbildung 4.31: Molekulare Darstellung der Geometrie des Enzym-Inhibitor-Komplexes Nr. **8** (Edukt) auf dem MEP der Inhibitionsreaktion.

7

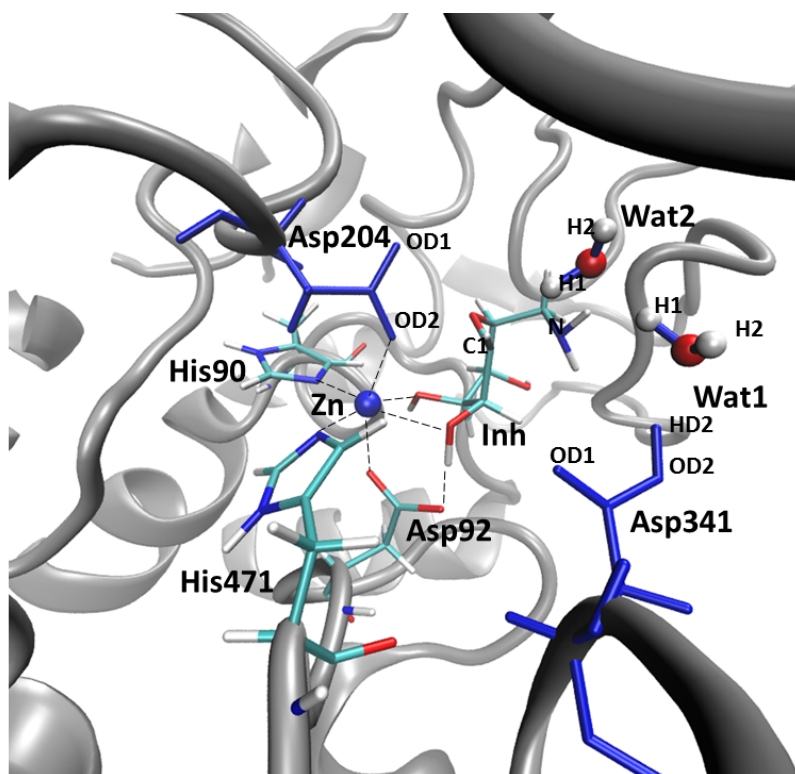


Abbildung 4.32: Molekulare Darstellung der Geometrie des Enzym-Inhibitor-Komplexes Nr. **7** auf dem MEP der Inhibitionsreaktion.

ÜZ

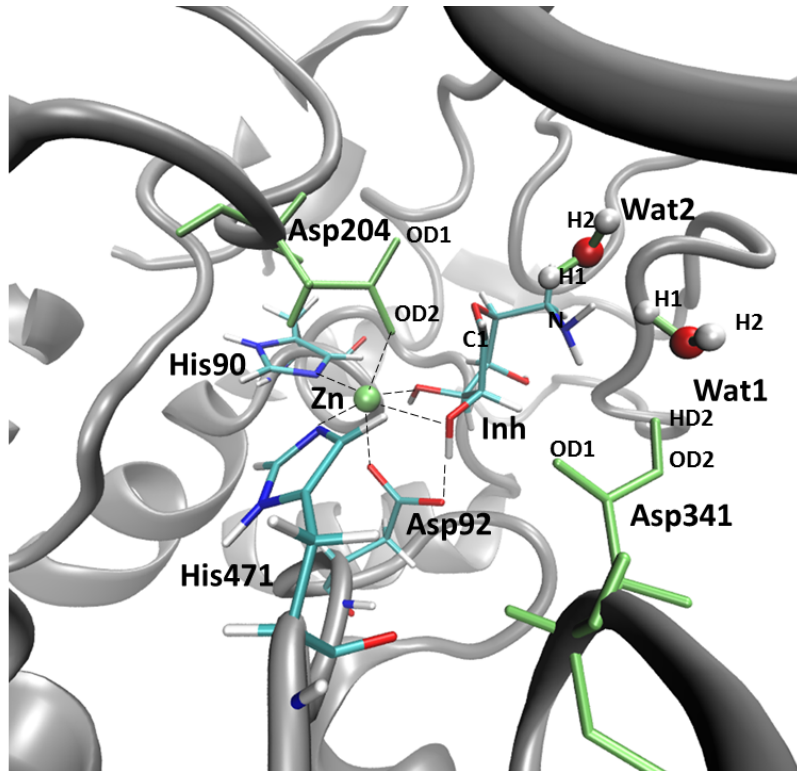


Abbildung 4.33: Molekulare Darstellung der Geometrie des Enzym-Inhibitor-Komplexes **ÜZ** (berechnet mit Hilfe der Dimer-Methode) auf dem MEP der Inhibitionsreaktion.

5

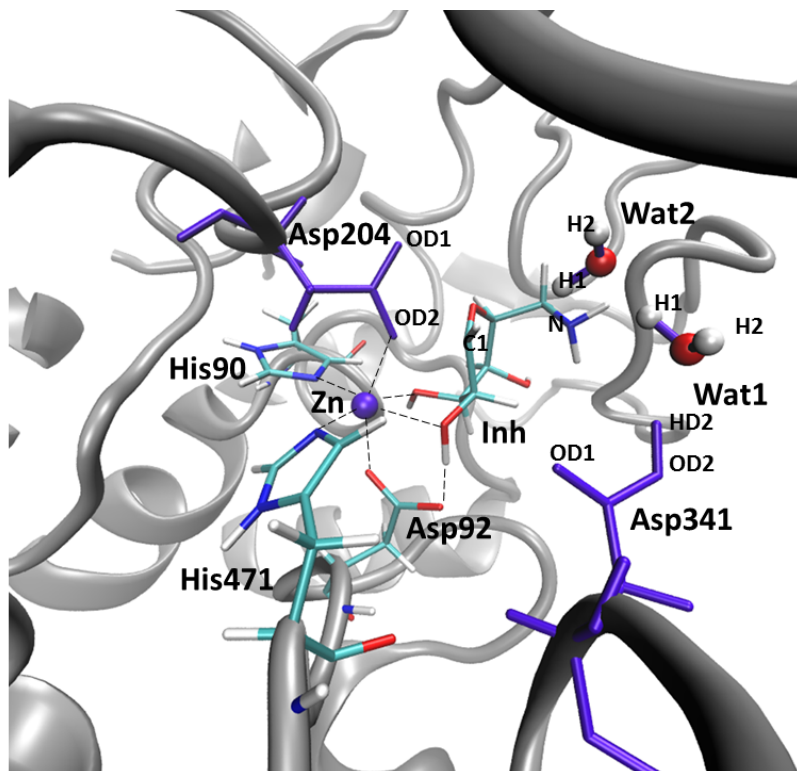


Abbildung 4.34: Molekulare Darstellung der Geometrie des Enzym-Inhibitor-Komplexes Nr. **5** auf dem MEP der Inhibitionsreaktion.

4

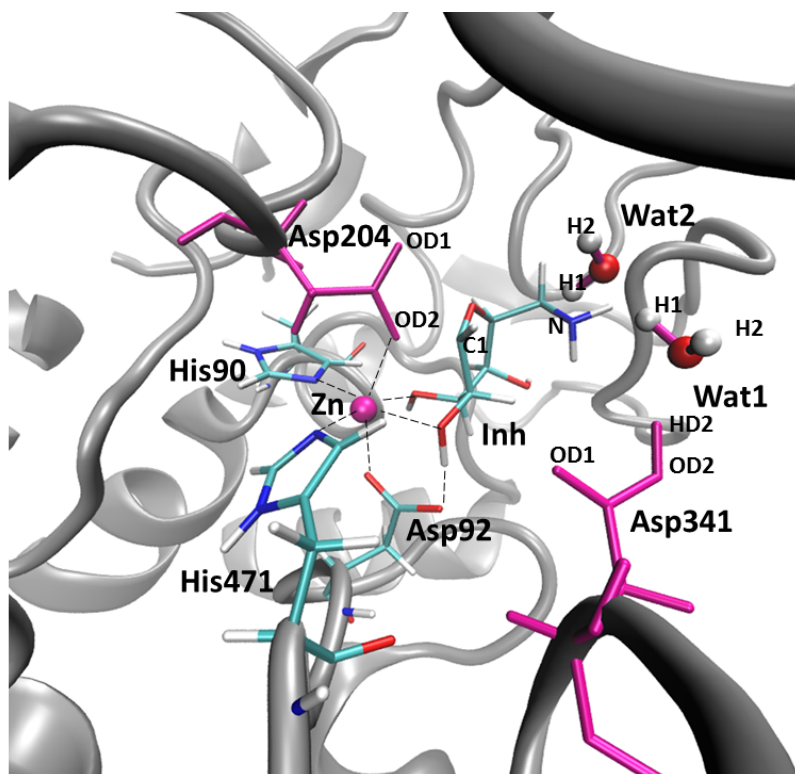


Abbildung 4.35: Molekulare Darstellung der Geometrie des Enzym-Inhibitor-Komplexes Nr. **4** auf dem MEP der Inhibitionsreaktion.

3

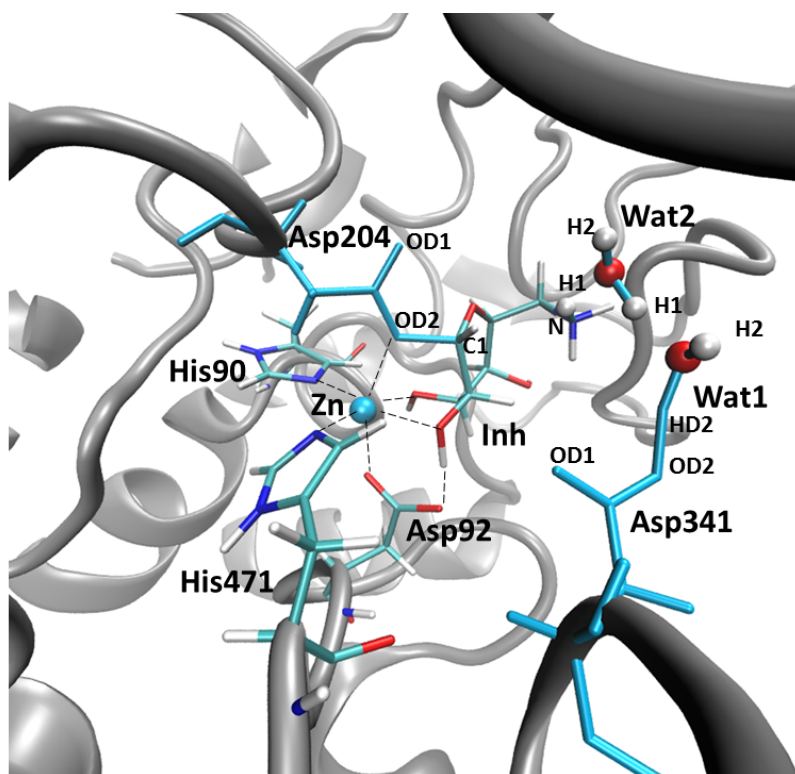


Abbildung 4.36: Molekulare Darstellung der Geometrie des Enzym-Inhibitor-Komplexes Nr. **3** auf dem MEP der Inhibitionsreaktion.

2

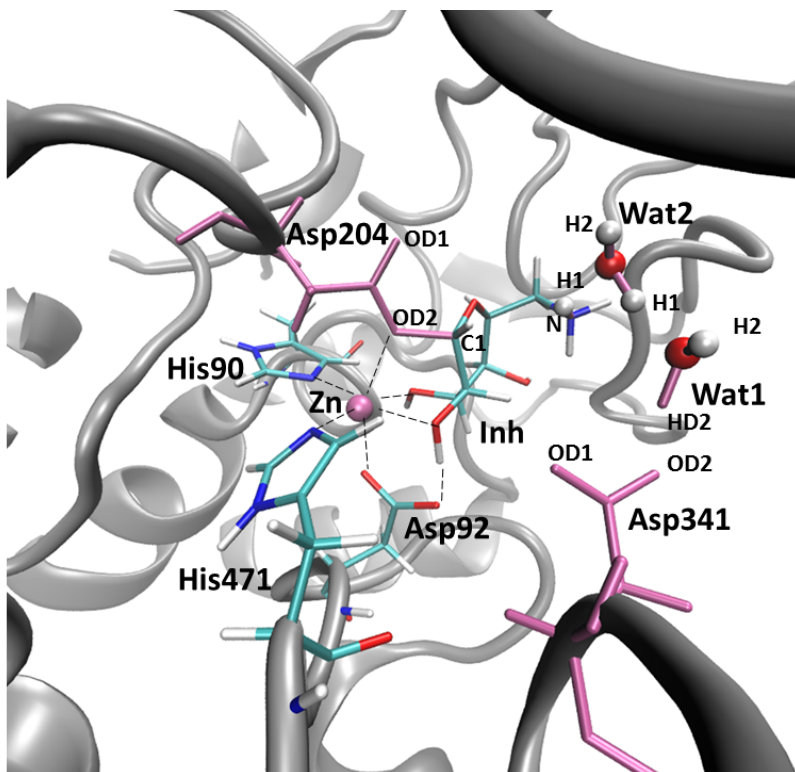


Abbildung 4.37: Molekulare Darstellung der Geometrie des Enzym-Inhibitor-Komplexes Nr. **2** auf dem MEP der Inhibitionsreaktion.

1

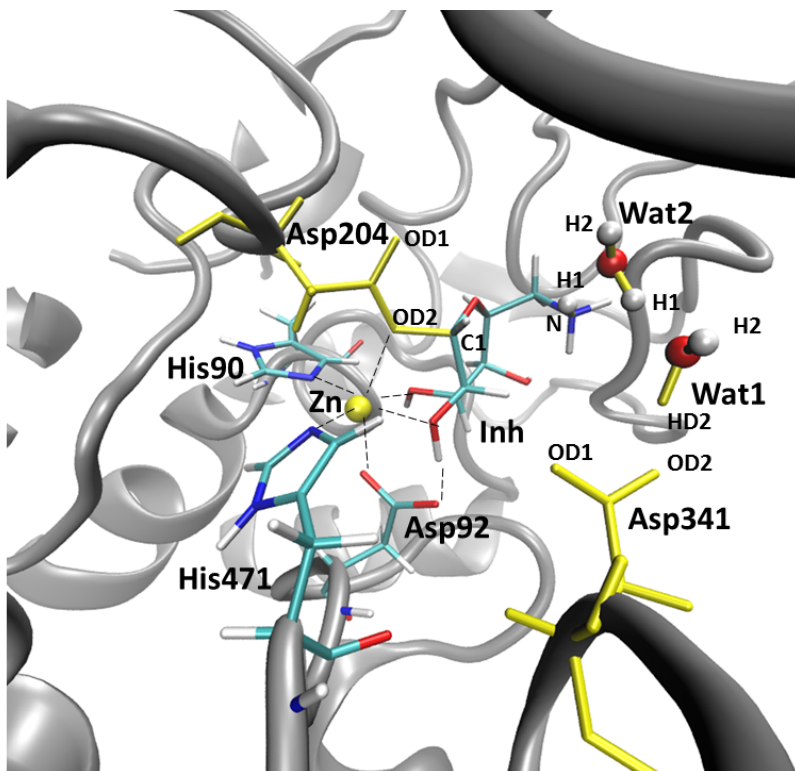


Abbildung 4.38: Molekulare Darstellung der Geometrie des Enzym-Inhibitor-Komplexes Nr. **1** (Produkt) auf dem MEP der Inhibitionsreaktion.

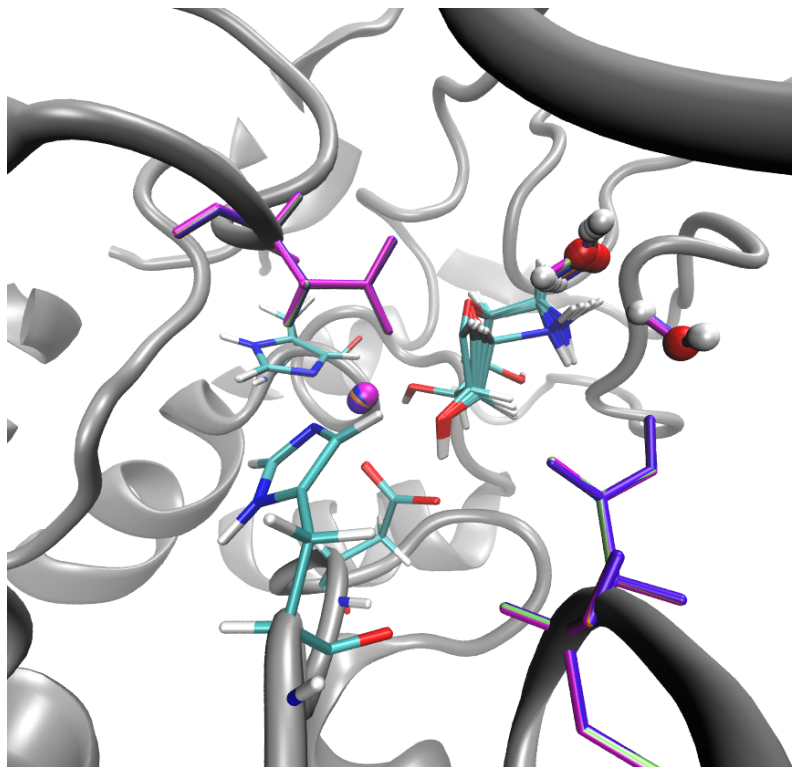


Abbildung 4.39: Molekulare Darstellung der überlagerten Geometrien der Enzym-Inhibitor-Komplexe Nr. 8, Nr. 7, Nr. 6, Nr. 5 und $\ddot{U}Z$ auf dem MEP der Inhibitionsreaktion.

```

***** 1 imaginary frequencies (negative signs) *****

=====
harmonic frequencies (cm**-1) and normalised normal coordinates
=====

          1          2          3          4          5          6          7          8          9
=====
frequencies ---- -100,7558  68,7902  83,2382  97,2984  113,9308  119,1079  124,9040  128,9508  132,7472
=====

coord atom element
=====
1  **  c          0,00013  0,00063  0,00022  -0,00875  0,01365  -0,02174  -0,04380  -0,03222  -0,01699

```

Abbildung 4.40: Auszug aus dem Ergebnis der Berechnung der Normalmoden und Schwingungsfrequenzen des Übergangszustandes des Enzym-Inhibitor-Komplexes GM II-7 nach der CI-NEB-Dimer^{[15][14][23][24]}-Methode innerhalb des QM/MM-Formalismus. Die einzige imaginäre Frequenz im Wert von $-100,7558 \text{ cm}^{-1}$ beweist den $\ddot{U}Z$.

Abbildung 4.41: Visualisierung der molekularen Bewegung (siehe als Animation im pdf-Format) im Übergangszustand für das Enzym-Inhibitor-Komplex GM II-7 mit der imaginären Frequenz von $-100,76 \text{ cm}^{-1}$, berechnet mit Hilfe der CI-NEB-Dimer^{[15][14][23][24]}-Methode innerhalb des QM/MM^[43]-Formalismus. Die Abbildungen der Animation wurden mit Hilfe des Molden-Pakets^[26] dargestellt.

5.1 VS-Inhibitoren mit Halogen-EWG: Reaktionsenergien in Lösung

Berechnungen von Reaktionsenergien der in Abbildung 2.13 angegebenen Modellreaktion in einer wässrigen Lösung ermöglichen ein Screening, um abzuschätzen, wie man durch eine Veränderung des Substitutionsmusters von einem irreversiblen zu einem reversiblen Inhibitor gelangen kann. Mithilfe dieses Schritts erhält man eine sehr gute Tendenz der Reaktionsenergien, wobei der wichtige Einfluss der Enzymumgebung aber noch vernachlässigt wird. Die katalytischen Aminosäurereste Cystein und Histidin können dabei als kleinere Moleküle repräsentiert werden.^[60] Im Rahmen dieser Modellrechnungen nähert man die im Enzym angreifende Cys25-Einheit durch Methylthiol an. Die ebenfalls beteiligte His162-Gruppe wird entweder durch ein Imidazol- oder ein Ammoniakmolekül approximiert. Die Arbeitsgruppe von Professor Dr. Engels^[7] beschäftigte sich mit den Vinylsulfon-Kopfgruppen auf der Screening Stufe, so dass die passenden Vinylsulfon-Kandidaten für die QM/MM-Berechnung im Protein schon in den Arbeiten von M. Rieger und K. Ansorg vorgeschlagen wurden.^[51] Diese Kandidaten sollten eine leicht exotherme Reaktion mit dem Methylthiolat-Ion/Methylthiol zeigen und so die Prototypen der reversiblen Inhibitoren darstellen. Irreversible Inhibitoren der Cysteinproteasen aus der Literatur^{[65][3]} enthalten den Wasserstoffsubstituenten in ihrem Prototyp (Abbildung 2.7) und können als eine Leitstruktur der neuen reversiblen Inhibitoren der Cysteinproteasen angesehen werden. Prototypen dieser Arbeit sind Vinylsulfon-Kopfgruppen, in welchen das Wasserstoffatom in der α -Position zu der Vinylsulfon-Gruppe durch die elektronenziehende Gruppe (EWG, engl. *electron-withdrawing group*) ersetzt wird. Ergebnisse dieses Teils der Arbeit wurden im Rahmen des gemeinsamen SFB-Projekts der Arbeitsgruppe Prof.Dr. B. Engels^[7] und Prof. Dr. T. Schirmeister^[17] ausführlich untersucht. Eine Möglichkeit, die Cyano-EWG einzusetzen, wurde bereits bei der Entwicklung von reversiblen Inhibitoren der ribosomalen S6 Kinaseproteinen (RSK) erfolgreich gezeigt.^{[199][200][201]} Für das System Rhodesain wurde die Cyano-EWG als VS-Kopfgruppe in der Proteinumgebung als eine QM/MM-Berechnung im Rahmen der eigenen Diplomarbeit^[202] gezeigt. Die Berechnung des Reaktionsprofils mittels QM/MM-Methode ergibt eine leicht exotherme Reaktion von ca. -10 kcal/mol, die eine nur reversible Blockierung mittels beschriebener kovalenter Bindung des katalytischen Cysteins nahe legte. Die gleichzeitig laufende Assay-

Messungen (Arbeiten von J. Kesselring aus der Arbeitsgruppe von Professor Dr. T. Schirmeister) zeigten, dass im Fall von Rhodesain die Cyano-EWG-Prototypen die nichtkompetitiven Blocker sein müssten.^{[5][28]} Die Cyanogruppe ist ein sehr guter Stabilisator der negativen Ladung an dem anionischen Intermediat und kann eine tiefer liegende Barriere liefern. Andererseits ist sie relativ sperrig, bestehend aus einer starren C-N-Dreifachbindung und kann nicht für alle aktiven Zentren relevant sein. Aus der Kooperation heraus ergab sich als Vorschlag, Halogene als EWG-Gruppen in den Vinylsulfon-Kopfgruppen einzusetzen. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Berechnungen in Lösung, die in dieser Arbeit durchgeführt sind, gezeigt und diskutiert.

5.1.1 Modellberechnungen der Reaktionsenergien in der wässrigen Lösung als implizite Wasserumgebung

In der Abbildung 5.1 sind alle möglichen Reaktionen der reaktiven Kopfgruppe des Inhibitors K11777 mit einem variablen X-Substituent zusammengefasst. Vinylsulfon-Inhibitoren können eine vinyloge nucleophile Substitution (S_NV) oder eine Additionsreaktion eingehen.^{[203][31][204]} Der nucleophile Angriff des Methylthiols kann am α - oder am β -Kohlenstoffatom der Doppelbindung des Vinylsulfons stattfinden. Der Angriff am β -Kohlenstoffatom der Doppelbindung führt zur reaktiven Zwischenstufe, **Int**- β . Durch die elektronenziehende Gruppen (EWG, X-Substituenten in Abbildung 5.1) und die Mesomeriestabilisierung durch die Vinylsulfon-Gruppe kann die negative Ladung am α -Kohlenstoffatom stabilisiert werden.^[31] Als nächster Schritt dieser Route ist nur eine Addition denkbar. Aufgrund des Fehlens der Abgangsgruppe am α -Kohlenstoffatom, kann keine Addition-Eliminierung und die verwandte vinyloge Substitution stattfinden. Das Additionsprodukt **B** entsteht durch den Protontransfer von einem Protondonor.

Durch einen Angriff der Thiolatgruppe an das α -Kohlenstoffzentrum entsteht das Intermediat **Int**- α . Es kann durch einen Protonentransfer zum β -Kohlenstoffzentrum oder die Abspaltung der Sulfongruppe oder des X-Substituenten stabilisiert werden. Das Intermediat **Int**- α sollte energetisch ungünstiger sein als das zugehörige Intermediat **Int**- β , da der β -Kohlenstoff keine stabilisierenden Substituenten aufweist. Eine Addition am α -Kohlenstoff sollte daher ungünstiger sein als die Addition am β -Kohlenstoff.

Aufgrund der aus der Kristallstruktur erhaltenen Information verläuft die Inhibition des Rhodesain durch die Addition am β -Kohlenstoffatom (Abbildung 2.7). Dies stimmt zwar mit den theoretischen Betrachtungen überein, könnte aber auch aus geometrischer Anordnung im Enzym resultieren. Die relative Energie der Additionsreaktion des Methylthiol an die Doppelbindung der VS-Kopfgruppe des Inhi-

bitors K11777 mit dem variablen X-Substituenten und der Seitenkette R=Methyl sind in dem Diagramm (Abbildung 5.2) präsentiert. Unter Verwendung des Hybridfunktionals B3LYP^{[36][37][134][135][131]} und eines diffusen Basissatzes aug-cc-pVDZ^[205] liegen die Reaktionsenergien der Additionsreaktionen zum Produkt **B** von Abbildung 5.1 bei ca. -12 kcal/mol für die Halogen-Substituenten X=Br, Cl und bei ca. -15 kcal/mol für Fluor. Im Fall von einem cyano-substituierten Inhibitor (X=CN) läge die Additionsreaktion in einem leicht exothermen Bereich von ca. -8 kcal/mol.

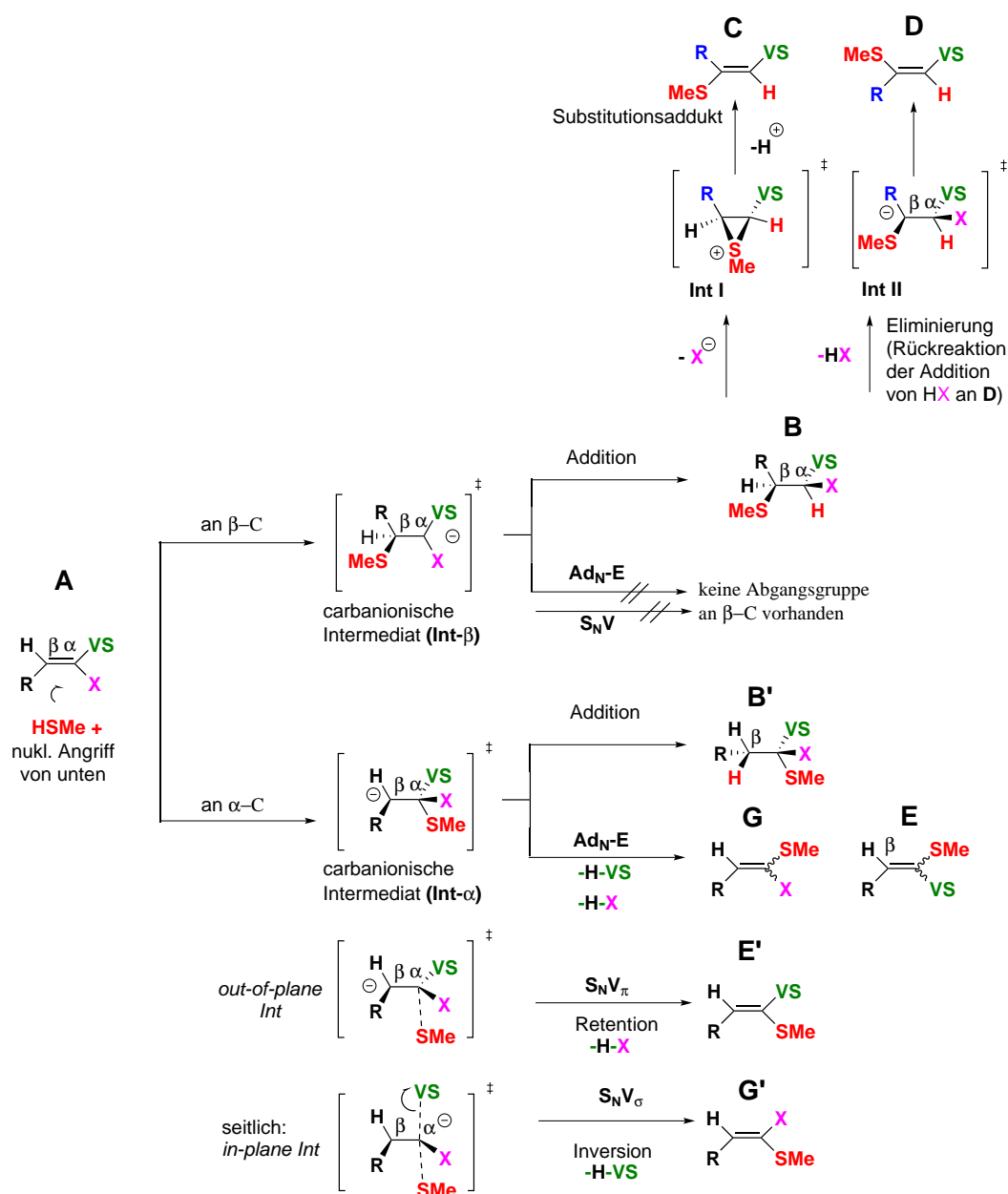


Abbildung 5.1: Mechanistische Routen der VS-Kopfgruppe des Inhibitors K11777 mit einem variablen X-Substituenten durch den nukleophilen Angriff von Methylthiol. In den Berechnungen wurde für R die Methylgruppe verwendet.

Die Substituenten Wasserstoff und Fluor zeigen für die Additionsreaktion inklusive die Zwischenstufenbildung **Int- β** (eine mögliche Barriere der Additionsreaktion) eine große Ähnlichkeit (Abbildung 5.2). Der Unterschied der relativen Energie zwischen den Addukt-Geometrien beträgt beim Produkt **B** ca. 1 kcal/mol und beim **Int- β** -Intermediat ca. 2 kcal/mol.

Tabelle 5.1 untersucht den Einfluss des Funktionals und der Basis auf die berechneten Reaktionsenergien. Dieser Einfluss ist für die untersuchten Systeme sehr deutlich. Die Einzelpunkt-Berechnungen der Energie (SP, *single point*) mit B3LYP^{[36][37][134][135][131]} auf den mit BLYP^{[36][37]} und def-TZVP^{[38][39]}-Basissatz optimierten Geometrien sind tendenziell konsistent mit den Energien der Geometrieoptimierungen (GO) mit B3LYP. Zusätzlich kann man erkennen, dass das Hybridfunktional B3LYP liefert im Gegensatz zu dem BLYP-Dichtefunktional wesentlich höhere Reaktionsenergien. Bei der zusätzlichen Basissatzerweiterung mit den diffusen Funktionen (*aug*-Basissatz) beobachtet man eine sehr konsistente Verschiebung der Reaktionsenergien um maximal 2 kcal/mol (dazu vergleicht man die Energiewerte der dritten und der vierten Zeile der Tabelle 5.1).

Tabelle 5.1: *Benchmark der Methoden für die Additionsreaktion der Inhibitoren mit X=H, F, Br, Cl, CN in der Reaktion mit den Modellen der Aminosäurereste der aktiven Tasche von Rhodesain (Methylthiol- und Ammoniakmoleküle). GO: Geometrieoptimierung, SP: single point. Relative Energien bezüglich der Edukte in kcal/mol.*

Theorielevel	Berechnungstyp	H	F	Br	Cl	CN
BLYP/def-TZVP	GO	-9,33	-9,44	-6,64	-6,92	-3,37
B3LYP/def-TZVP	SP	-12,05	-12,01	-9,20	-9,44	-5,91
B3LYP/def-TZVP	GO	-12,25	-12,53	-9,64	-9,90	-6,40
B3LYP/aug-cc-pVDZ	GO	-14,04	-14,69	-11,8	-11,55	-8,39

Das Produkt der Additionsreaktion **B** kann weiter reagieren. Die erste Möglichkeit besteht in dem direktem Abspalten einer guten Abgangsgruppe, wie z. B. Chlorid- oder Bromid-Ionen. In diesem Fall ergeben die Berechnungen eine cyclische Geometrie des Kations (Geometrie Int I in Abbildung 5.1), aus dem durch Deprotonierung das Substitutionsprodukt **C** resultiert. Dieses intermediär gebildete Kation ist dem in der Arbeit von Bernasconi gezeigten Thiirenium-Ion^[31] sehr ähnlich und zeichnet sich durch eine verkürzte C-C-Einfachbindung von 1,47 Å aus.¹

Eine zweite Abbauroute ergibt sich, wenn zunächst das Proton abgespalten wird.

¹Die Standardwerte der Längen der Einfach- und Doppelbindung liegen entsprechend bei 1,54 und 1,34 Å. Der Wert für die Bindungslänge der C-C-Bindung in einem Benzolring beträgt 1,40 Å.

Diese Reaktion verläuft über das carbanionische Intermediat **Int II**. Da die C-C-Einfachbindung in diesem Intermediat vermutlich frei drehbar ist, kann sich durch Abspaltung des X-Substituenten das Produkt **D** oder das Produkt **C** bilden. **Int II** entspricht allerdings dem energetisch ungünstigen carbanionischen Intermediat **Int-a**, sodass man auch diesen Reaktionsverlauf wohl ausschließen kann. Folglich sollte nur das Produkt **C** als einziges Substitutionsprodukt in Betracht gezogen werden.

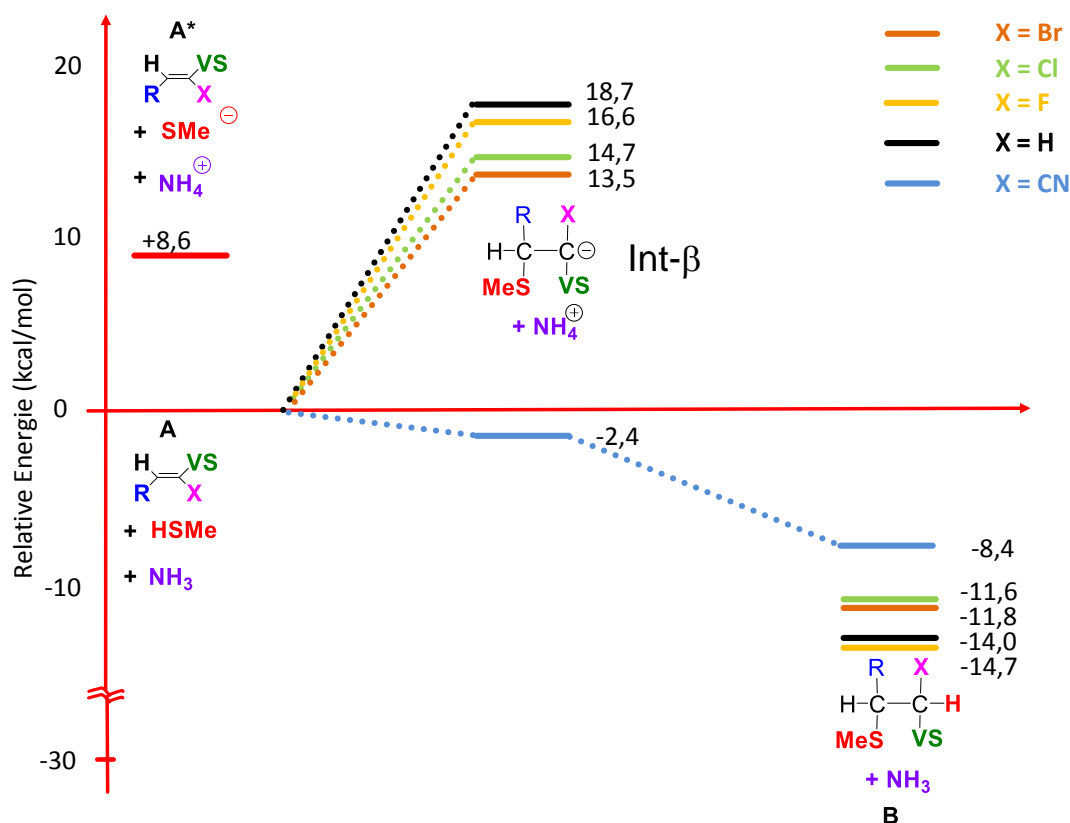


Abbildung 5.2: Berechnung der Reaktionsenergien und Zwischenstufen der Addition in einer wässrigen Lösung. **A***: die zwitterionische Geometrie der Edukte **A*** relativ zu der neutralen Geometrie der Edukte **A**. Näheres siehe Text. Verwendete Methode ist die Geometrieoptimierung mit B3LYP^{[36][37][134][135][131]}-Dichtefunktional und aug-cc-pVDZ^[205]-Basissatz.

Zunächst zeigen die Berechnungen, dass ein am β -Kohlenstoff negativ geladenes Intermediat (**Int II**) tatsächlich nicht stabil ist, sondern sofort zerfällt (Abbildung 5.3). Daher kann man die über die Intermediate **Int II** und **Int-a** ablaufenden Mechanismen wie vermutet ausschließen. Für X=Br kann die über **Int I** ablaufende Eliminierungsreaktion scheinbar tatsächlich ablaufen, da **Int I** nur etwa 12 kcal/mol oberhalb des Produktes **B** liegt. Hinzu kommt, dass das entstehende Produkt **C1** sehr stabil ist. Für X=F muss eine solche Reaktion ausgeschlossen werden, da das zugehörige Intermediat **Int I** mehr als 30 kcal/mol instabiler ist, als die Ausgangsverbindung **B**. Verbindungen mit X=Cl verhalten sich ähnlich

zu den Verbindungen mit X=Br. Zur Einschätzung der Aussagekraft der Berechnungen für die Enzymreaktionen muss allerdings berücksichtigt werden, dass die Enzymumgebung vernachlässigt wird und die COSMO-Berechnungen zu den geladenen Fragmenten größere Fehler aufweisen als solche zu den neutralen Systemen.^[206]

Tabelle 5.2: *Relative Energien der Substitutionsprodukte mit variablem X-Substituenten. Energieangabe in kcal/mol relativ zu der zwitterionischen Geometrie des Edukts A*. Theorielevel: Geometrieoptimierung mit COSMO^[158] durch B3LYP^{[36][37][134][135][131]}/aug-cc-pVDZ^[205].*

X	C1	D1	C2	D2
F	-12,95	-13,25	-13,73	-14,03
Br	-35,09	-35,39	-7,10	-7,40
Cl	-31,28	-31,58	-8,09	-8,39
CN	10,92	10,62	7,51	7,21

Analoge Berechnungen zu dem Produkt **D** (**D1** und **D2** ähnlich wie **C1** und **C2** in der Berechnung gezeigt im Diagramm 5.3) sind in der Tabelle 5.2 gezeigt. Aufgrund der isomeren Beziehung der Produkte **C** und **D** zueinander beobachtet man bei den Modell-Berechnungen die ähnlichen Tendenzen der Thermodynamik.

Betrachten wir nun die Ergebnisse zu den Geometrien der anionischen Intermediate, die nach Bernasconi *et al.*^[31] als aktive Zwischenstufen der S_NV-Reaktionen postuliert werden. Die berechneten Geometrien des Intermediats sind tetraedrisch für X=H, F, Cl und Br und planar für den VS-Inhibitor mit X=CN (Abbildung 5.4). Die Planarität der anionischen Zwischenstufe kann auf eine perfekte Mesomeriestabilisierung der Cyano-Gruppe zurückgeführt werden. Dieser stabilisierende Effekt wird dagegen in Fall von X=H, und X=Halogen nicht beobachtet. Die Geometrie des Anions mit X=H konnte nicht mit Hilfe des BLYP^{[36][37]}/def-TZVP^{[38][39]}-Theorielevels erhalten werden, was als direkter Hinweis für die Instabilität der Zwischenstufe des Inhibitors mit X=H dient. Die anionische Zwischenstufe für den VS-Inhibitor mit X=H (K11777^[4]) konnte nur mit B3LYP^{[36][37][134][135][131]}/aug-cc-pVDZ^[205] Theorielevel erfolgreich optimiert werden. Da die Berechnungen von anionischen Geometrien ohne diffuse Funktionen nur sehr schlechte Beschreibungen liefern, wurden die relativen Energien der anionischen Zwischenstufe für alle anderen X-Substituenten nur mit dieser Methode als geeignet angesehen (Tabelle 5.3).

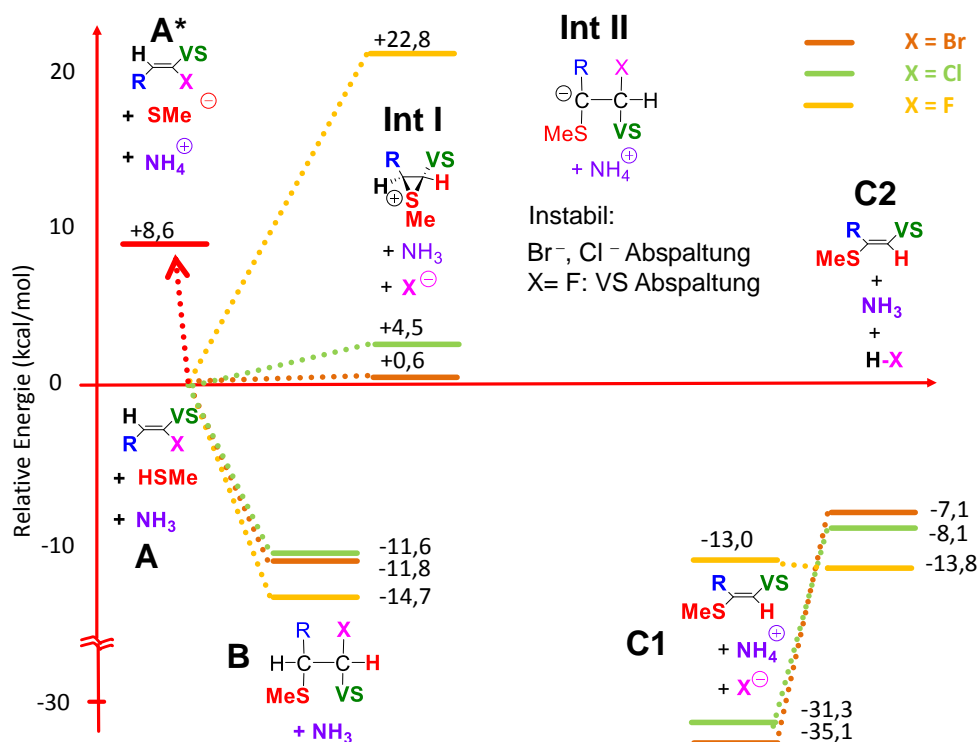


Abbildung 5.3: Berechnung von Reaktionsenergien in einer wässrigen Lösung. Verwendete Methode ist die Geometrieoptimierung mit B3LYP^{[36][37][134][135][131]}-Dichtefunktional und aug-cc-pVDZ^[205]-Basissatz. Das Ammoniakmolekül fungiert als Base. X ist die Halogen-EWG. **A**: neutrale Edukte; fungieren als der Nullpunkt des Diagramms (Referenz). **B**: Additionsprodukte. **C1** und **C2**: Substitutionsprodukte berechnet mithilfe von zwei Modellen. **A***: zwitterionische Edukte der Inhibitionsreaktion. Hier findet die Säure-Base-Reaktion zwischen den Molekülen Ammoniak und Methylthiol vor dem nukleophilen Angriff an die Doppelbindung der VS-Kopfgruppe statt. Die Energie der zwitterionischen Edukte **A*** ist ebenfalls relativ zu der Energie der neutralen Edukte **A** gegeben.

Tabelle 5.3: Relative Energien der anionischen Zwischenstufe der Additionsreaktion der Inhibitoren mit X=H, F, Br, Cl, CN in der Reaktion mit den Modellen der Aminosäurereste der aktiven Tasche von Rhodessain (Methylthiol und Ammoniak Moleküle). Relative Energien bezüglich der Edukte in kcal/mol. Theorielevel: B3LYP^{[36][37][134][135][131]}/aug-cc-pVDZ^[205]

Theorielevel	Berechnungstyp	H	F	Br	Cl	CN
B3LYP/aug-cc-pVDZ	GO	18,7	16,6	13,5	14,7	-2,4

Tabelle 5.4: Berechnung der relativen Energie der anionischen Zwischenstufe und der Reaktionsenergie für die Additionsreaktion eines Methylthiolat an die Doppelbindung des VS-Inhibitors mit variablen X-Substituenten. Das Ammoniakmolekül wurde als Base dem Histidin Aminosäurerest des Enzyms angenähert.

Theorielevel	X	Reaktionsenergie	Intermediat Int-β
B3LYP/aug-cc-pVDZ (Geometrieoptimierung)	H	-14,04	18,73
	F	-14,69	16,62
	Br	-11,76	13,50
	Cl	-11,55	14,65
	CN	-8,39	-2,37

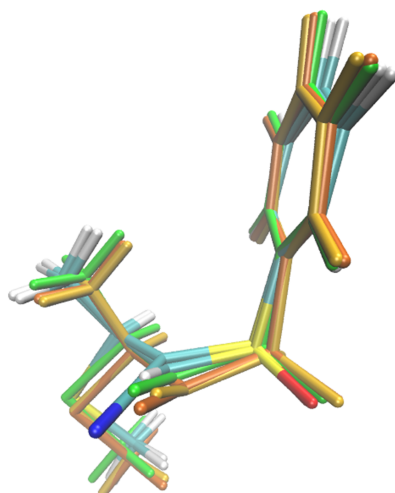


Abbildung 5.4: Vergleich der Geometrien der anionischen Zwischenstufe **Int-β** der Reaktion von VS-Inhibitoren mit dem Methylthiolat. Theorielevel: B3LYP^{[36][37][134][135][131]}/aug-cc-pVDZ^[205] mit COSMO^[158] für wässrige Lösung ($\epsilon=78,39$). CPK-Darstellung: X=H (gewinkelt) und X=CN (planar), grün: X=Cl, gelb: X=F, orange: X=Br. Näheres siehe Text.

5.1.2 Modellberechnungen mit expliziten Wassermolekülen in einer wässrigen Lösung

Im Rahmen der COSMO-Berechnungen wird die polarisierbare Umgebung als Kontinuum approximiert, d.h. mögliche molekulare Effekte des Lösungsmittels werden vernachlässigt. Diese molekularen Effekte umfassen Wasserstoffbrückenbindungen, sie treten aber auch häufig bei den ionischen Fragmenten wie Anionen auf.^[206] Takano und Houk zeigten, dass bei der Beschreibung von geladenen Fragmenten im Kontinuum die Fehler deutlich ansteigen^[207]. Daher wurde untersucht, welchen Einfluss die explizit berücksichtigten Wassermoleküle auf die

relativen Energien besitzen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in der Tabelle 5.5 sowie den Abbildungen 5.5 - 5.8 zusammengefasst. Weitere Informationen können dem Anhang 6.3 - 6.7 entnommen werden.

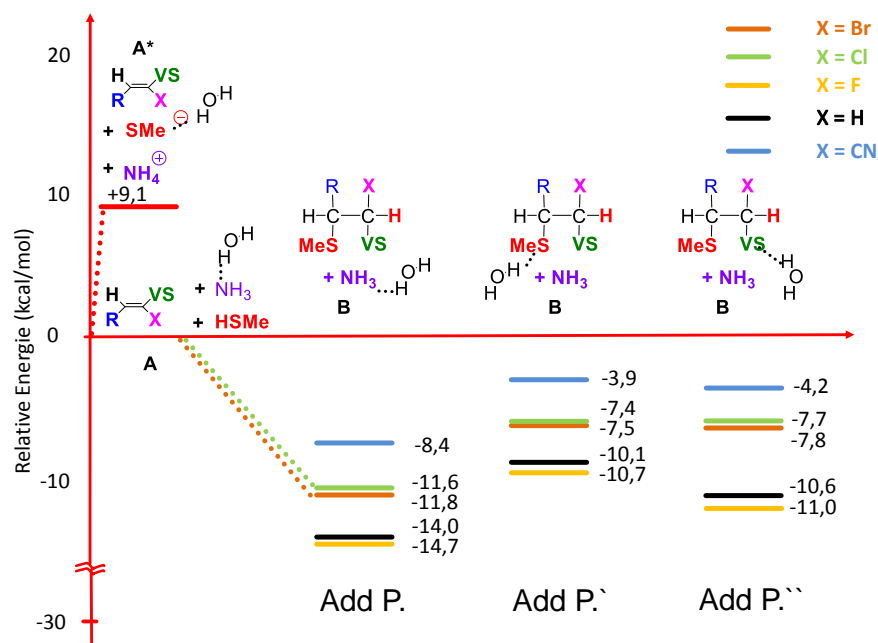


Abbildung 5.5: Berechnung der Reaktionsenergien in Lösung mit einem expliziten Wassermolekül zur Berechnung von Edukten und verschiedenen Produktvarianten. Die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Wassermolekülen und den entsprechenden Atomen der Modell-Moleküle sind durch eine gepunktete Verbindung angedeutet.

Das Problem in der Verwendung einiger weniger Wassermoleküle liegt darin, dass nicht alle potentiellen Wasserstoffbrückendonoren oder -acceptoren abgesättigt werden können. Dies zeigen die Berechnungen mit nur einem Wassermolekül (z.B. Abbildung 5.5, Tabellen 5.5). Die berechneten relativen Energien schwanken um bis zu 4 kcal/mol, je nachdem wie das Wasser platziert wird. Betrachten wir zunächst die Auswirkungen auf die relative Energie der Produkte der Additionsreaktion ausgehend von den neutralen Edukten **A** (Abbildung 5.5). Bei Produkt **Add P** ergibt sich natürlich keine Änderung zu Abbildung 5.2, da auf den beiden Seiten der Reaktionsgleichung das neutrale Ammoniakmolekül NH_3 durch ein explizites Wassermolekül in gleicher Weise stabilisiert wird. Stabilisiert man die Geometrien der Produkte an den verschiedenen Schwefelatomen des Produkt-Moleküls wie **Add P'** und **Add P''**, sinken die Reaktionsenergien, da NH_3 eine stärkere Wasserstoffbrückenbindung als die Schwefelatom-Fragmente des Eduktes ausbildet. Die H-Brücke eines expliziten Wassermoleküls zu dem neutralen NH_3 ist sogar stärker als die Wechselwirkung zu dem negativ-geladenen Thiolat-Ion. So steigt

der Unterschied zwischen den Edukten **A** und **A*** (neutral und zwitterionisch) von 8,6 kcal/mol (Abbildung 5.2 ohne explizites Wasser) auf 9,1 kcal/mol (Abbildung 5.5).

Bei den Berechnungen, die das anionische Intermediat der Additionsreaktion **Int- β** mittels einer Wechselwirkung mit einem expliziten Wassermolekül durch eine H-Brücke zum α -C-Atom stabilisieren, sinkt die relative Energie nur im Fall von X=F sehr unwesentlich um einen Beitrag von ca. 0,2 kcal/mol, steigt aber in Fällen der anderen Substituenten an. Im Fall von X=Cl ist dieser Beitrag am höchsten und beträgt ca. 1 kcal/mol (vgl. hierzu $\mathbf{X}_{\alpha-C}$ in der Tabelle 5.5). Einen deutlich höheren Anstieg der relativen Energie beobachtet man, wenn das explizite Wassermolekül die H-Brücke zum Sauerstoffatome der Phenyl-VS-Gruppe ausbildet (vgl. hierzu \mathbf{X}_O in der Tabelle 5.5). Im Vergleich zu den Hal-Substituenten beobachtet man eine eindeutige Instabilität der negativen Ladung des Anions mit der nicht-EWG X=H. Die Geometrie mit der H-Bindung des Wassermoleküls zum O-Atom der VS-Kopfgruppe erscheint mit ca. 20 kcal/mol am stärksten destabilisiert. Im Fall von X=CN werden die Unterschiede zwischen den Geometrien \mathbf{X}_O und \mathbf{X}_O im Vergleich zu der Geometrie ohne explizite Wassermolekül am deutlichsten. Diese Daten können einen indirekten Hinweis zu der Art der negativen Ladung des Intermediats liefern. Im Fall von X=F ist die negative Ladung an dem α -Kohlenstoff eindeutig stärker lokalisiert als im Fall von X=Br und Cl. Im Fall von X=CN ist die negative Ladung durch die Mesomerie-Effekte der Cyano-Gruppe delokalisiert und durch eine lokale Wasserstoffbrückenbindung an das α -C-Atom, welches nicht genug elektronegativer ist, erscheint so ein Intermediat destabilisiert. Die größten Effekte erwartet man im Fall der geladenen Fragmente der Reaktion durch die Berücksichtigung von zwei H-Brücken der zwei explizit wirkenden Wassermoleküle (Abbildung 5.6). Dies sollte z.B. das geladene Intermediat **Int- β** gegenüber den neutralen Edukten **A** stabilisieren. Tabelle 5.5 zeigt als Funktion des Substituenten X=H und X=Hal eine Stabilisierung von 2-4 kcal/mol. Für X=CN findet sich hierbei eine relative Destabilisierung um etwa 2 kcal/mol. Gegenüber den geladenen Edukten **A*** findet man vergleichbare Trends. So stabilisiert sich das Intermediat **Int- β** für X=F um etwa 4 kcal/mol gegenüber **A***, wenn man die Situation ohne Wasser mit der Situation mit zwei Wassermolekülen vergleicht. Für X=Br und Cl sind die relativen Stabilisierungen kleiner (ca. 3 kcal/mol) für X=CN findet sich wieder eine relative Destabilisierung von etwa 2 kcal/mol. Da das Intermediat **Int- β** der Tabellen identisch ist, ergibt ein Vergleich der Daten auch die relative Lage von **A** und **A***. Es zeigt sich, dass die relative Lage von **A** und **A*** nur sehr wenig durch explizite Wasser beeinflusst wird. Hier schwanken die relativen Energien um 8-9 kcal/mol, je nachdem, ob kein oder zwei Wasser berücksichtigt werden.

Tabelle 5.5: Berechnung der relativen Energie der anionischen Zwischenstufe **Int- β** für die Additionsreaktion des Methylthiolast an die Doppelbindung des VS-Inhibitors (variabler X-Substituent) berechnet i) relativ zu dem Edukt **A** (neutrale Fragmente), ii) relativ zu dem zwitterionischen Edukt **A*** (geladene Fragmente). In der Berechnung wurden die Wassermoleküle an die negativ geladenen Reaktionspartner platziert. Index X_O steht für Geometrien, die H-Bindung des Wassermoleküls zu dem O-Atom der VS-Gruppe aufweisen.

Details der Berechnung	X	Int-β relativ zu	
		i) Edukt A	ii) Edukt A*
B3LYP/aug-cc-pVDZ (Geometrieoptimierung) Kein H ₂ O-Molekül	H	18,73	10,10
	F	16,62	7,99
	Br	13,50	4,87
	Cl	14,65	6,02
	CN	-2,37	-11,00
B3LYP/aug-cc-pVDZ (Geometrieoptimierung) Ein H ₂ O-Molekül	H_{a-c} / H_O	19,42 / 20,31	11,22 / 11,22
	F_{a-c} / F_O	16,46 / 18,93	7,37 / 9,83
	Br_{a-c} / Br_O	14,32 / 15,55	5,23 / 6,45
	Cl_{a-c} / Cl_O	15,63 / 16,78	6,53 / 7,69
	CN_{a-c} / CN_O	2,78 / 0,13	-6,32 / -8,96
B3LYP/aug-cc-pVDZ (Geometrieoptimierung) Netzwerk aus zwei H ₂ O-Moleküle	H	16,24	7,15
	F	12,79	3,70
	Br	10,91	1,82
	Cl	12,10	2,96
	CN	0,17	-8,93

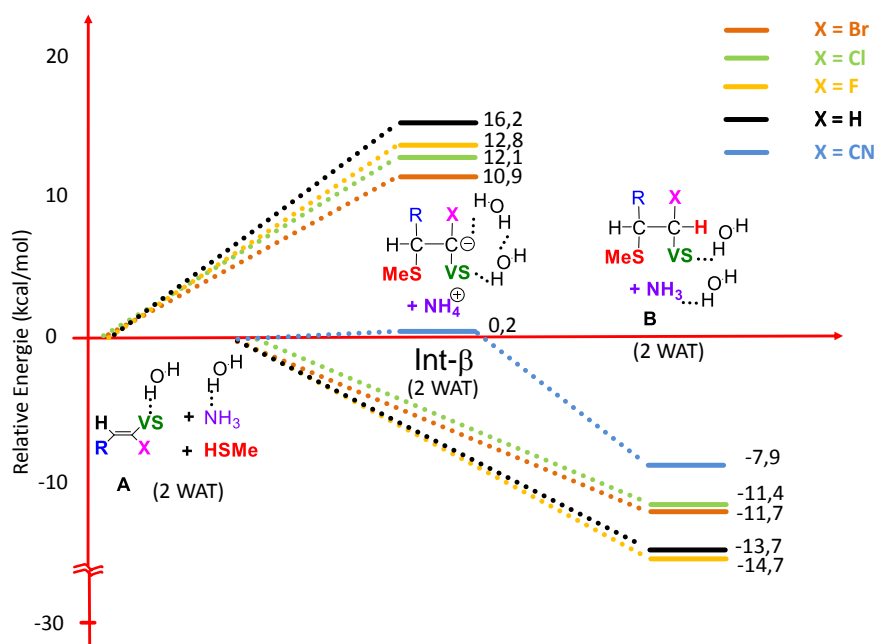


Abbildung 5.6: Berechnung der Barrieren und Reaktionsenergien in Lösung mit zwei Wassermolekülen. Die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Wassermolekülen und den entsprechenden Atomen der Modell-Moleküle sind durch eine gepunktete Verbindung angedeutet. Die anionische Zwischenstufe **Int-β** ist mittels eines Netzwerks aus zwei Wassermolekülen stabilisiert.

Betrachten wir nun die Effekte des Lösungsmittels für die Route, die die Zwischenprodukte der Reaktion Int I und Int I' beschreibt. Bedeutend sind die Fälle mit $X=\text{Hal}$ und $X=\text{CN}$, weil diese hierbei die polaren Abgangsgruppen darstellen. Alle Rechnungen zeigen, dass die Einflüsse des Wassers als ein polarer Solvens mit Hilfe von COSMO-Optimierung die Systeme mit Bromid- und Chlorid-Ion besser stabilisiert im Vergleich zu dem Ion-Wasser-System. Dies ist allerdings nicht der Fall bei $X=\text{F}$ (vergleiche Int I und Int I' in Abbildung 5.7). Vermutlich gerät durch die extrem hohe Ladungsdichte die Anlagerung eines Wassermoleküls vorteilhafter als eine reine COSMO-Beschreibung, d.h. ohne explizite Wassermoleküle. Möglicherweise wird die negative Ladung des Fluorids auf das Wassermolekül übertragen. Die gegenläufige Tendenz wird auch bei den Eliminierungsprodukten beobachtet: Das mit einem Wassermolekül koordinierte Fluorid-Ion wird stabilisiert, wobei das Chlorid- und Bromid-Ion destabilisiert werden (Abbildungen 5.3 und 5.8). Aus der Abbildung 5.8 erkennt man, dass die günstige Fluorid-Anion-Wasser-Wechselwirkung zwar das Abspalten von Fluorid mit Wasser scheinbar möglich macht, doch die Reaktion ist immer noch sehr stark kinetisch gehindert ist (Barriere von +19 kcal/mol, Abbildung 5.7). Die Tendenz der Abspaltung von Bromid- und Chlorid-Ionen aus dem Additionsprodukt verbleibt dominierend.

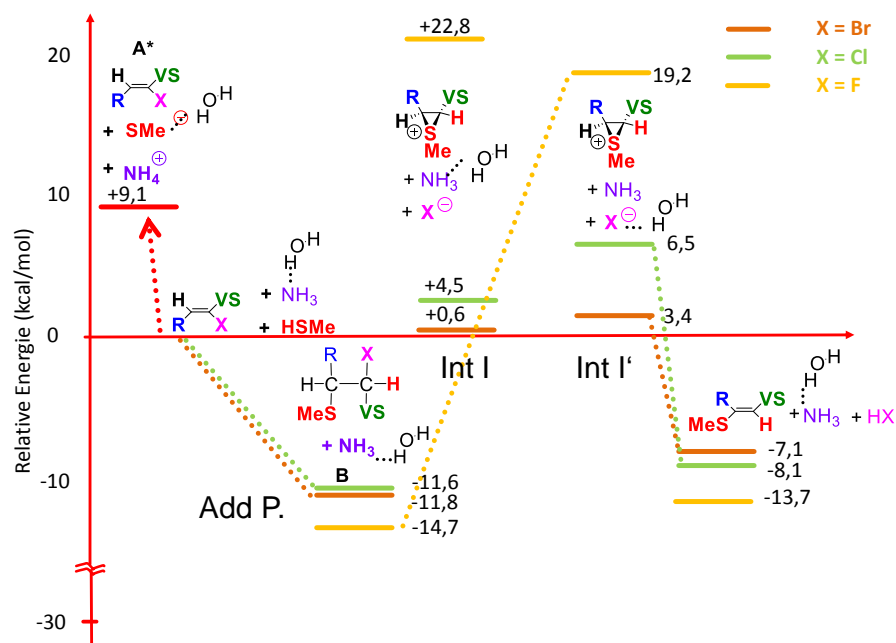


Abbildung 5.7: Berechnung der Reaktionsenergien in Lösung mit einem expliziten Wassermolekül zur Berechnung von verschiedenen Intermediatvarianten. Die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Wassermolekülen und den entsprechenden Atomen der Modell-Moleküle sind mit den dreifachen Punkten skizziert.

Die Berechnung der Reaktionsenergien in Lösung mit zwei expliziten Wassermolekülen zeigt immer noch die vorher erläuterten Tendenzen (siehe Anhang, Abbildungen 6.3 - 6.7). Man beobachtet wiederholend die „Anomalie“ des Fluorids durch die Wechselwirkung mit einem Wassermolekül. Die Fluorid-Abspaltung zeigt sich mit maximal von -4,4 kcal/mol zwar im Vorteil (Abbildung 6.3), wird mit der Barriere von 30 kcal/mol davon kinetisch gehemmt (Abbildung 6.7). Die Abspaltung der Bromid- und Chlorid-Ionen verbleibt stark exotherm und gibt einen direkten Hinweis darauf, dass die Substitutionsreaktion unter allen Reaktionspfaden dominiert.

Die Untersuchung zeigt, dass die relativen Energien davon abhängen, wie die Umgebung erfasst wird. Die Schwankungen, die als eine Art Fehlerbalken der Berechnungen angesehen werden müssen, sind mit etwa 4 kcal/mol moderat. Dass bei der gesamten Berücksichtigung der Enzymumgebung deutlich größere Variationen auftreten, wird im Rahmen der Beschreibung der QM/MM-Berechnungen nochmals genauer diskutiert werden.

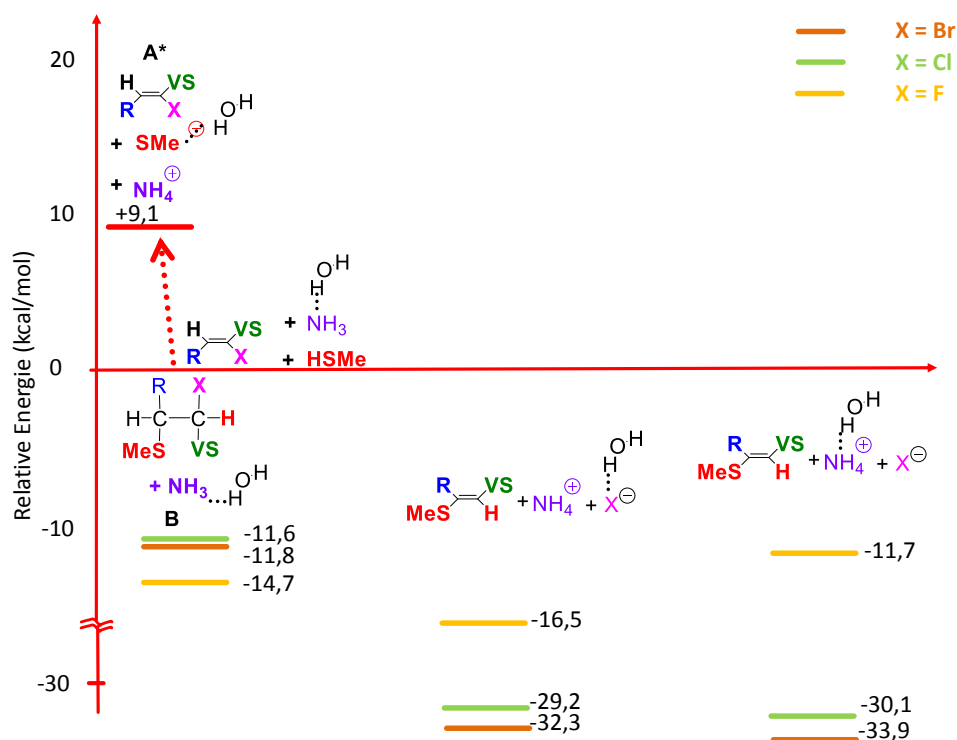


Abbildung 5.8: Berechnung Reaktionsenergien in Lösung mit einem expliziten Wassermolekül an Methylthiolat-Ion bei Edukten und Eliminierungsprodukten. Im System der Eliminierungsprodukte bildet das Wassermolekül eine Wasserstoffbrückenbindung zu Halogen- oder Ammonium-Ionen. Die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Wassermolekülen und den entsprechenden Atomen der Modell-Moleküle sind durch eine gepunktete Verbindung angedeutet.

5.2 Reaktionsenergien der Halogen-EWG Vinylsulfon Kopfgruppen Inhibitoren im Enzym

5.2.1 Ansätze und technische Details der Berechnungen

In den bisherigen Untersuchungen zur Inhibition von Rhodesain durch Verbindungen mit Vinylsulfonen als reaktive Kopfgruppen wurde die Enzymumgebung vernachlässigt. Um ihren Einfluss auf die berechneten Reaktionsenergien und -barrieren zu erfassen, wurden QM/MM-Berechnungen durchgeführt.

Ansätze der QM/MM-Berechnungen zu der Additionsreaktion des Inhibitor K11777 mit dem variablen X-Substituenten in der VS-Kopfgruppe

Die vorliegende Studie umfasst die Berechnungen der Reaktionsprofile der Inhibitionsreaktion des Enzyms Rhodesain mit dem irreversiblen Inhibitor K11777^[4] als Leitstruktur sowie mit den neuen Inhibitoren mit X=Hal (=Cl, Br, F). Hierbei unterteilen sich die Berechnungen in zwei Bereiche. Zunächst wurde ausgehend von der vorhandenen Kristallstruktur des kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplexes von Rhodesain mit K11777 das Reaktionsprofil der Inhibition rückwärts zu dem nicht-kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplex berechnet. Im Weiteren wird dieses Teilergebnis als der X-ray-Pfad (**XP**) in Anlehnung an die Startgeometrie der Berechnung des Reaktionsprofils bezeichnet. Als Reaktionskoordinaten wurden der Bindungsabstand $d(\text{S-C})$ zwischen dem nukleophilen Schwefelzentrum des Cystein Aminosäurerestes Cys25 und dem elektrophilen Kohlenstoffatom der Doppelbindung sowie der Bindungsabstand $d(\text{N-H})$ zwischen dem Stickstoff des Histidin Aminosäurerestes His162 und dem im Verlauf der Reaktion transferierten Protons verwendet (Abbildung 5.9).

Um Informationen über das Reaktionsprofil zu erhalten, wurden die beiden Koordinaten schrittweise von der Situation im kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplex (**E-I-K**) zur Situation im nicht-kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplex (**E··I-K**) variiert. Alle anderen geometrischen Freiheitsgrade wurden für jeden Punkt optimiert. Die so erhaltene zweidimensionale Potentialfläche ist in 5.11 dargestellt. Ein in etwa entlang des schwarzen Pfeils verlaufendes eindimensionales Reaktionsprofil ist in Abbildung 5.15 skizziert. Das Energieprofil des Inhibitionsmechanismus durch die Additionsreaktion wurde in diesem Teil der Arbeit ausgehend vom Produkt (**E-I-K**) rückwärts zu den Edukten (**E··I-K**) berechnet. Dies ist notwendig, da nur für den kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplex (PDB: 2P7U^[4]) Informationen zur Geometrie vorliegen. Diese experimentellen Informationen sind essentiell, da eine verlässliche Berechnung der Geometrien von Enzym-Inhibitor-Komplexen noch nicht möglich ist.

Der zweite Teil der Untersuchung zur Inhibitionsreaktion von Rhodessain mit Vinylsulfon-Inhibitoren unter Berücksichtigung der Enzymumgebung wurde ausgehend von den berechneten nicht-kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplexen durchgeführt. Im Weiteren werden die Potentialhyperflächen und die zugehörigen eindimensionalen Reaktionsprofile, die in die Richtung des Produkts (**E-I-K**) berechnet wurden, als die „nicht-kovalenten Pfade“ (NP) in Anlehnung an die Startgeometrie des Reaktionsprofils bezeichnet. Als Reaktionskoordinaten wurden der Bindungsabstand zwischen dem Schwefelzentrum des Cystein Aminosäurerestes Cys25 und dem elektrophilen Kohlenstoffatom der Doppelbindung ($d(S-C1)$) sowie der Bindungsabstand zwischen dem zweiten Kohlenstoffatom der Doppelbindung C2 und dem im Verlauf der Reaktion transferierten Proton ($d(C2-H)$) verwendet (Abbildung 5.10). Die beiden Reaktionskoordinaten wurden, analog zu den XP-Berechnungen, schrittweise variiert. Alle anderen geometrischen Freiheitsgrade der berechneten Geometrien wurden, analog zu den XP, optimiert. Die so erhaltene zweidimensionale Potentialhyperfläche ist in der Abbildung 5.24 gezeigt. Der eindimensionale Schnitt durch die Fläche entlang des Minimumenergiepfades (**MEP**), der durch die Anwendung der NEB-Methode erzielt wurde, ist in der Abbildung 5.25 gegeben.

Die NP-Potentialhyperflächen und Reaktionspfade (MEP) liefern Reaktionsprofile, für die sowohl die Richtungen als auch die Reaktionsabläufe identisch sind. Die NP-Berechnungen sind erforderlich aufgrund der Validierung der so erhaltenen Reaktionspfade. Der Grund für die erforderliche Validierung liegt in der statischen Natur der QM/MM-Berechnung. Anders als die QM/MM/MD-Berechnung, ist die QM/MM-Berechnung von der Startgeometrie abhängig. Die Berechnungen ausgehend von den anderen, diversen Startgeometrien, die durch die MD-Simulationen erhalten wurden, sind daher essentiell für die Untersuchungen der Einflüsse der enzymatischen Umgebung auf die Inhibitionsreaktion. Startgeometrien der MD-Simulationen wurden ausgehend von den Geometrien des Edukts und des Produkts (lokale Minima der PES) durchgeführt.

Für den Inhibitor mit X-EWG Fluor wurde die Erkennungseinheit N-methyl-Piperazinyl durch die N-Pyridinyl im dritten Schritt des Protokolls in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Prof. Dr. T. Schirmeister verbessert.^[5] Der neue Inhibitor, im Weiteren auch als Molekül Nr. 5 bezeichnet, wurde daher in der Geometrie des nicht-kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplexes aktualisiert und in den erneuten QM/MM-Berechnungen berücksichtigt. Dies entspricht dem Schritt 4 des in-house Protokolls (Abbildung 1.6). Die Berechnungen des Reaktionsprofils mit dem neuen Inhibitor verfolgen das Schema, welches auch für die NP-Berechnungen verwendet wurde (Abbildung 5.10). Die resultierende Potentialhyperfläche für die Additionsreaktion des neuen kovalent reversiblen Inhibitors mit der EWG Fluor (Molekül Nr. 5, 4-Pyridinyl-Phenyl-Homophenylalanyl-1-Fluor-

Phenylvinylsulfon)^[5] ausgehend vom nicht-kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplex ist in der Abbildung 5.31 dargestellt und gehört zum abschließenden Teil der Arbeit.

Es erfolgten die Berechnungen der Reaktionsprofile mit Hilfe von zwei unterschiedlichen Ansätzen. Der erste Ansatz stellt die Berechnung zweidimensionaler Potentialhyperflächen (PES) einer chemischen Reaktion ausgehend von einer Startgeometrie dar. Die zweite Möglichkeit zur Darstellung eines Reaktionsprofils und somit eines Minimumenergiepfades (MEP^[12]) einer chemischen Reaktion besteht in der Nudged Elastic Band (NEB^{[14][15]})-Berechnung, die von zwei Startgeometrien ausgeht: Edukt und Produkt einer chemischen Reaktion. Für die Berechnungen der Additionsreaktion des Inhibitors K11777 mit dem variablen X-Substituenten wurde die NEB-Methodik für die XP- als auch für die NP-Berechnungen (zweiter Teil der Arbeit) angewendet. In diesem Teil der Arbeit wurde die Geometrie des nicht-kovalenten E-I-Komplexes zu der Geometrie des kovalenten E-I-Komplexes (NP) diagonal auf der Potentialhyperfläche berechnet. Diagonal bedeutet, dass die beiden Reaktionskoordinaten sukzessive um einen gleichen Anteil geändert wurden. Dieser Teil der Berechnung erlaubt eine relativ schnelle Erfassung der zweiten, für den NEB^[12]-Ansatz erforderlichen Geometrie ohne der globalen Suche auf der kompletten Potentialhyperfläche. Gleichzeitig liefert diese Berechnung die Energiedifferenz zwischen den Edukten und Produkten einer chemischen Reaktion. Zur genauen Berechnung des MEP zwischen Start- und End-Geometrien und den Höhen der Barrieren der chemischen Reaktion wurden die QM/MM-NEB-Berechnungen im Rahmen des *climbing image*-(CI^[15])-Ansatzes, wie in CHEM-SHELL^[43] implementiert^[181], durchgeführt. Die CI-Geometrien wurden in diesem Formalismus mit Hilfe des Dimer^{[23][24]}-Algorithmus verfeinert. Der gefundene Übergangszustand wurde mithilfe einer Frequenzberechnung hin untersucht.^[198] (Skripte der Berechnung sind in Anhänge als Listing 6.5 und 6.6 gezeigt). Ein so berechneter MEP der Inhibitionsreaktion ist in der Abbildung 5.25 gezeigt.

Ansätze der QM/MM-Berechnungen zu der Substitutionsreaktion mit X-EWG Brom

Durch die Berechnungen der Inhibitionsreaktionen in Lösung wurde gezeigt, dass die VS-Inhibitoren mit den EWGs X=Br und X=Cl die Substitutionsreaktionen bevorzugt eingehen (Struktur **C**, siehe Abbildung 5.1). Um die Reaktion der Bromid-Substitution des neuen Inhibitors mit X=Br im Enzym zu untersuchen, wurden die QM/MM-Berechnungen durchgeführt. In diesen wurden die Intermediate **S1*** und **S2*** (Abbildung 5.32), die die kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplexe darstel-

len, berechnet.² Zur Berechnungen der Geometrien von Intermediaten wurde das kovalente E-I-K als Startgeometrie verwendet.^[5] Durch die Änderung der Atompositionen entsprechend der angemessenen Bindungslängen der gewünschten Startgeometrie von **S1*** und die Umorientierung der Wassermoleküle um das nahe der aktiven Tasche frei vorliegende Bromid-Ion wurde das Intermediat **S1*** mit Hilfe von QM/MM-Berechnung zu einem lokalen Minimum optimiert. Ein ähnlicher Ansatz wurde für die Geometrie des kovalenten E-I-Komplexes angewendet, um die Startgeometrie des Intermediats **S2*** für die anschließend durchgeführte Optimierung mit Hilfe der QM/MM-Methode zu erhalten.

Technische Details der QM/MM-Berechnungen

Da das gesamte System bestehend aus dem Enzym-Inhibitor-Komplex und der umgebenden Wasserhülle für reine quantenmechanische Berechnung zu groß ist, wurde hier der QM/MM-Ansatz verwendet. Die Aufteilung in einen QM- und MM-Bereich kann den Abbildungen 5.9 und 5.10 entnommen werden. Für die Berechnungen des ersten Teils der Arbeit (XP) erfolgte die QM-Beschreibung mit Hilfe des RI^{[33][34][35]}BLYP^{[36][37]}/def-TZVP^{[38][39]}- und mit B3LYP^{[135][134]}/def-TZVP^{[38][39]}-Ansatzes. Für den zweiten Teil (NP) wurden für die QM-Beschreibung der QM/MM-Berechnungen B3LYP^{[135][134]}/def-TZVP^{[38][39]}- und B3LYP^{[135][134]}/cc-pVDZ^[205]-Ansätze ausgewählt.

Berechnungen von Reaktionsprofilen konnten kostengünstiger durchgeführt werden, indem die Wassersphäre des E-I-K bei einem Radius von 25 Å um das Schwefelatom des katalytischen Cystein Aminosäurerestes Cys25 gekappt³ (siehe Anhang, Listing 6.2) wurde. Eine solche Geometrie des Enzym-Inhibitor-Komplexes mit der reduzierten Wasserhülle fungiert in der Arbeit durchgehend als Startgeometrie für Berechnungen von Reaktionsprofilen und stellt ein QM/MM-System dar. Zu dem sogenannten *aktiven Bereich* des QM/MM-Systems, in welchem Atompositionen entsprechend der Optimierungsalgorithmen optimiert werden, wurde der Bereich im Radius von 10 Å um das S-Atom des katalytischen Cystein Aminosäurerestes gewählt. Der restliche Teil des QM/MM-Systems bleibt während der Berechnung fixiert und spiegelt die Enzymumgebung wieder, z.B. durch Sterik.

²Entspricht dem Substitutionsprodukt der Modell-Berechnung **C1** und **C2** gezeigt in Abbildung 5.3)

³Wassermoleküle wurden für das QM/MM-System so ausgewählt, dass mindestens ein Atom des betrachteten Wassermoleküls sich in Radius von 25 Å befand.

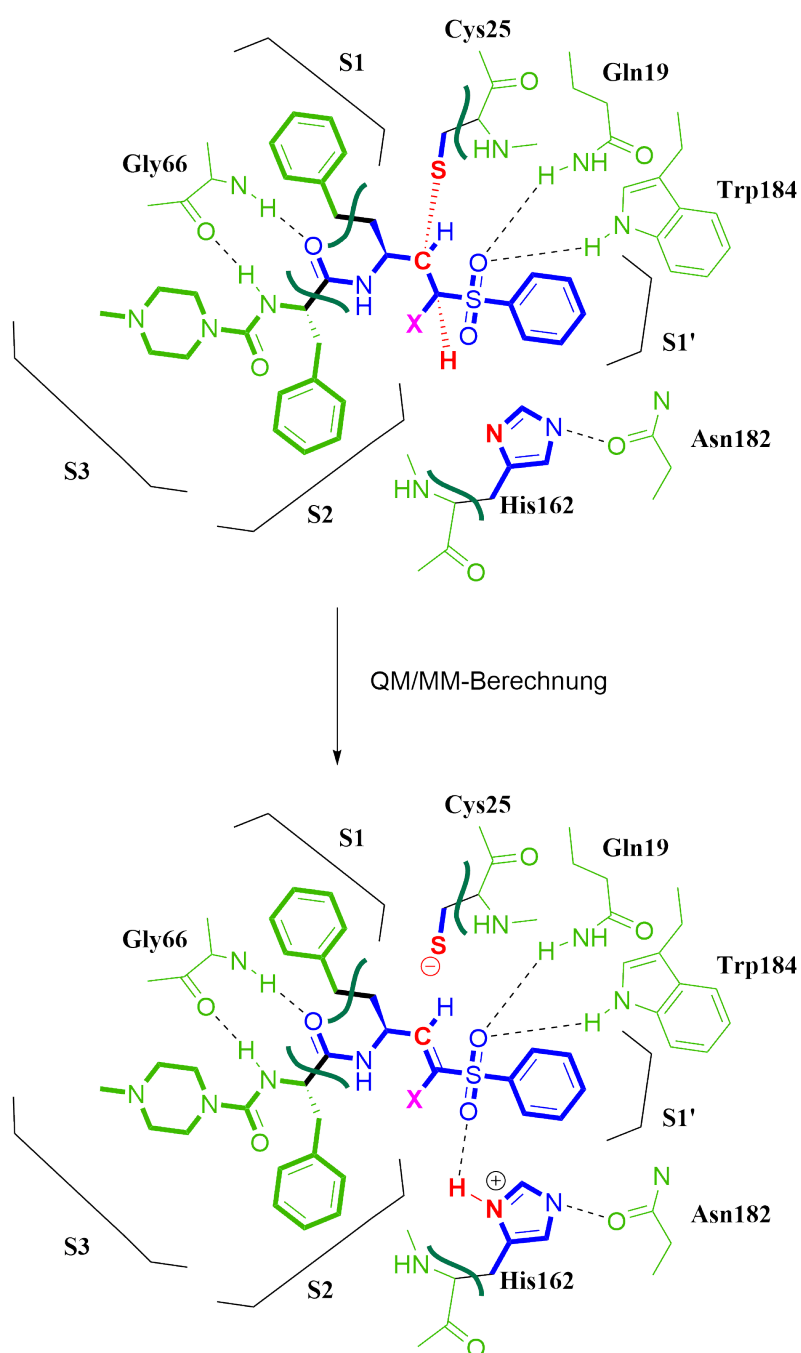


Abbildung 5.9: Schematische Darstellung der aktiven Tasche von Rhodesain für die QM/MM-Berechnungen ausgehend von der Kristallstruktur (Ansiht von oben). Der QM-Bereich der QM/MM-Berechnungen ist blau, der MM-Bereich grün gezeichnet. Die beiden bei der Reaktion beteiligten Reaktionskoordinaten $d(S-C)$ und $d(H-N)$ sind rot gekennzeichnet.

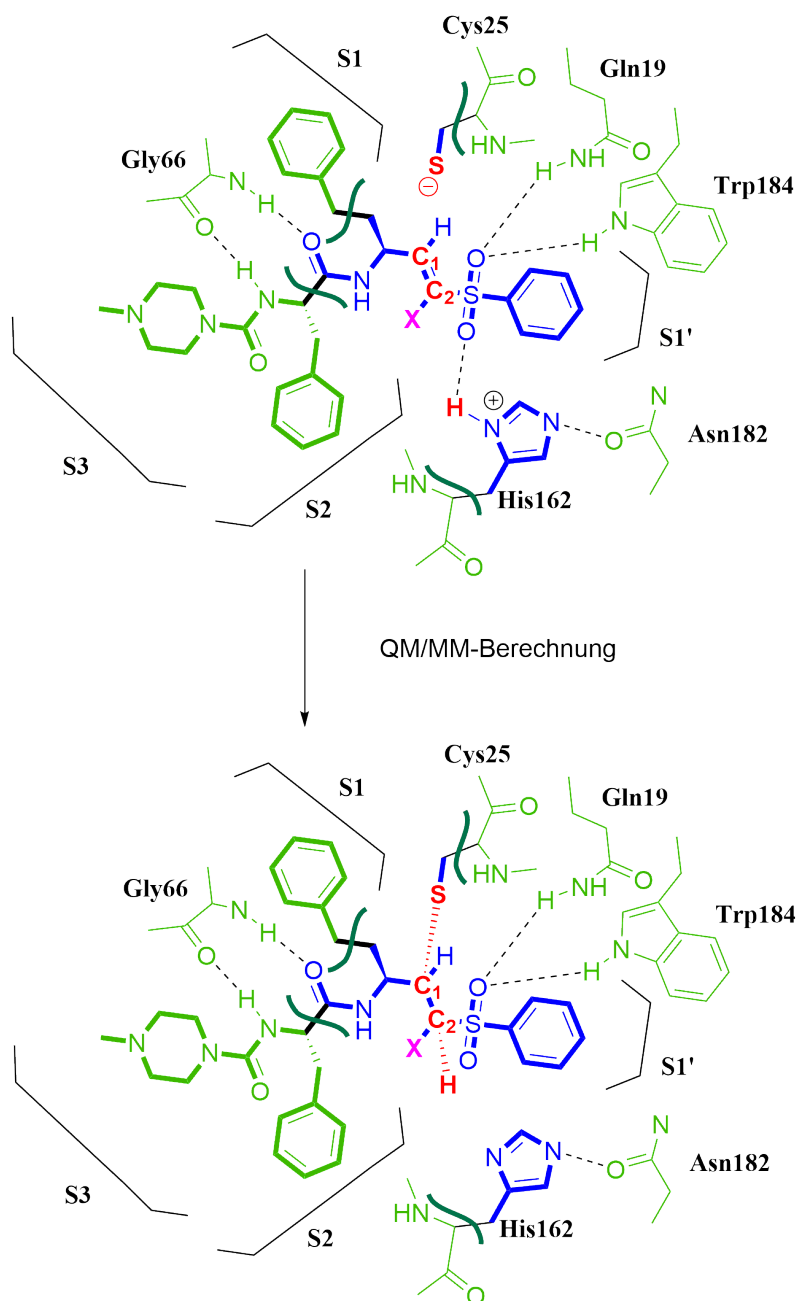


Abbildung 5.10: Schematische Darstellung der aktiven Tasche von Rhodesain für die QM/MM-Berechnungen ausgehend von den nicht-kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplexen (Ansicht von oben). Der QM-Bereich der QM/MM-Berechnungen ist blau, der MM-Bereich grün gezeichnet. Die beiden bei der Reaktion beteiligten Reaktionskoordinaten $d(S-C1)$ und $d(C2-H)$ sind rot gekennzeichnet.

5.2.2 Ergebnisse und Diskussion

X-ray Pfade

Dieser Abschnitt beschreibt die Ergebnisse zur Berechnung der Minimumenergiepfade mit dem Ansatz X-ray-Pfad (XP). Die Ergebnisse der Berechnungen auf Basis von RI^{[33][34]}-BLYP^{[36][37]}/def-TZVP^{[38][39]} sind in den Abbildungen 5.11 - 5.14 zusammengefasst. Die Ergebnisse mit dem Dichtefunktional B3LYP^{[36][37][134][135][131]} wurden im Speziellen für den irreversiblen Inhibitor K11777 und für den neuen reversiblen Inhibitor K777-F durchgeführt und können den Abbildungen 5.22 und 5.23 entnommen werden. Betrachten wir zunächst die für den Inhibitor K11777 (auch K777, X=H)^[4] berechnete 3-dimensionale Potentialhyperfläche (PES) in Abbildung 5.11 bzw. den 2-dimensionalen Schnitt durch die Fläche entlang des Minimumenergiepfades (MEP), der in Abbildung 5.15 gegeben ist. Die Berechnung resultiert für die Bildung eines kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplexes Rhodesain-K11777 eine Reaktionsenergie von ca. -20 kcal/mol (PDB-ID: 2P7U^[4]). Im Reaktionsverlauf erkennt man eine relativ kleine Barriere von ca. 3 kcal/mol. Man erkennt deutlich, dass das bei Bernasconi diskutierte anionische Intermediat^[31] einen Sattelpunkt und kein Minimum darstellt. Der MEP zeigt auch, dass die Additionsreaktion ausgehend vom Intermediat zu dem nicht-kovalenten Enzym-Inhibitor Komplex nicht freiwillig ablaufen kann: Die Rückreaktion ist in diesem Bereich der PES mit 1,4 kcal/mol leicht endotherm. Insgesamt ergibt sich für die Wiederfreisetzung des kovalent verknüpften Inhibitors eine Reaktionsbarriere von ca. 23 kcal/mol. Der MEP stimmt ziemlich gut mit dem experimentellen Befund über die Irreversibilität des Inhibitors überein.

Für den zunächst vorgeschlagenen Cyano-Substituent (CN) in einem VS-Inhibitor (Abbildung 5.1) ergab sich bei Berechnungen in einem polaren Lösungsmittel eine relativ niedrige Reaktionsenergie, d.h. es wurde eine reversible Reaktion vorhergesagt. Dies wurde experimentell bestätigt (Schritt I des Protokolls).^[5] Die theoretischen und experimentellen Ergebnisse von Schritt II (Reaktion mit Enzym, Abbildung 1.6) widersprechen sich aber. Während experimentell eine schwache reversible Hemmung gefunden wurde, sagten die Berechnungen keine Hemmung voraus. Tatsächlich zeigte sich im Nachhinein, dass die experimentell gefundene Hemmung nicht-kompetitiv ist, d.h. nicht in der aktiven Tasche stattfindet. Ein Vergleich von Theorie (Reaktion in der aktiven Tasche) und Experiment ist folglich nicht möglich.^[28] Der nicht-kompetitive Schritt konnte nicht ausgewertet werden. Um den Einfluss des Substituenten X auf das Reaktionsprofil zu untersuchen, wurde im kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplex das Wasserstoffatom durch das zugehörige Halogen ausgetauscht und die Geometrien der Systeme Rhodesain-K777-X (X=Br, Cl und F) mit Hilfe der oben beschriebenen QM/MM-Methodik optimiert. Der so erhaltene Enzym-Inhibitor-Komplex Rhodesain-K777-X bildet

den Startpunkt der Berechnung des Reaktionsprofils ausgehend von dem kovalenten Komplex. Die Konturen der beiden PES ($X=Br$ vs. $X=Cl$, Abbildungen 5.11 und 5.14) sind sehr ähnlich: Die Reaktionsenergien der Addition sind mit -10 und -11 kcal/mol nur leicht exotherm und liegen im Bereich der Reversibilität der kovalenten Reaktionen^[13].

Für $X=Br$ (Abbildungen 5.12, 5.16) und $X=Cl$ (Abbildungen 5.13, 5.17) sagen die Berechnungen für die anionischen Intermediate zwar Minima vorher, diese sind aber zu flach (ca. $0,2$ kcal/mol), um für die Reaktion eine Bedeutung zu haben. Zudem sind die erwarteten Fehlerbalken der Berechnungen deutlich höher. Folglich weisen alle vier PES ($X=H, Br, Cl$ und F) prinzipiell die gleiche Form auf. Es ergeben sich aber Unterschiede in den berechneten Reaktionsenergien der Additionsreaktion ($-20, -10, -11$ und -16 kcal/mol). Für $X=Br$ und Cl deuten die gegenüber $X=H$ deutlich verkleinerten Reaktionsenergien darauf hin, dass die Rückreaktion – Elimination des Inhibitors zurück zum nicht-kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplex – möglich wird. Für die beiden Verbindungen sagen die Berechnungen daher eine reversible kovalente Inhibitionsreaktion vorher, was in Übereinstimmung mit den experimentellen Ergebnissen steht. Auch für den Inhibitor mit $X=F$ wird experimentell eine reversible Inhibition gefunden.^[5] Die berechnete Reaktionsenergie erscheint mit etwa -16 kcal/mol jedoch etwas zu exotherm, um hier eindeutige Aussagen machen zu können. Die experimentell nachgewiesene Messung der Reversibilität der Additionsreaktion mit dem Fluor-substituierten VS-Inhibitor lässt darauf schließen, dass es sich um einen Grenzfall handelt, denn die eindeutige Irreversibilität der kovalenten Inhibitoren im Bereich der Reaktionsenergien ab -20 kcal/mol beobachtet wurde.^{[5][13]}

Die Konturen der beiden PES ($X=H$ vs. $X=F$) sind allerdings sehr ähnlich: In beiden Fällen findet sich für das anionische Intermediat kein Minimum (Abbildungen 5.11 und 5.14). In der Potentialhyperfläche für $X=F$ steigt die Barriere der Rückreaktion zwischen dem Intermediat und dem nicht-kovalenten Komplex auf etwa 5 kcal/mol an, die Rückreaktion ist im Vergleich zu dem $X=H$ mit ca. $1,5$ kcal/mol leicht exotherm. Das veränderte Verhältnis zwischen der Höhe der Reaktionsbarriere und dem Betrag der Reaktionsenergie (der Übergang von endothermen zu der exothermen Reaktion) auf diesem Abschnitt der PES könnte dazu beitragen, dass die Gesamtreaktion insgesamt reversibel ablaufen kann. Die Reversibilität des Inhibitors mit dem Substituenten Fluor lässt sich primär durch das Absinken der Reaktionsenergie von ca. -20 auf -16 kcal/mol erklären (Abbildungen 5.15 und 5.18).

Die Geometrien des Eduktes und Produktes, die mit dem PES-Ansatz ($X=H$ und F) berechnet wurden, wurden für die Berechnung des Reaktionsprofils mit Hilfe der $CI^{[15]}$ - $NEB^{[14]}$ -Methode verwendet. Die Ergebnisse der Berechnungen auf Basis von $RI^{[33][34]}$ - $BLYP^{[36][37]}$ /def-TZVP^{[38][39]} sind in den Abbildungen 5.19 und 5.20,

und diejenigen auf dem Theorie-Niveau B3LYP^{[36][37][134][135][131]}/def-TZVP^{[38][39]} sind in den Abbildungen 5.22 und 5.23) zusammengefasst. Das Dichtefunktional B3LYP^{[36][37][134][135][131]} resultiert die Reaktionsenergien und auch die Barrieren der Additionsreaktion der beiden Inhibitoren (X=H und F) konsistent um ca. 2 bis 3 kcal/mol höher als berechnet mit dem Dichtefunktional BLYP^{[36][37]}.

Man erkennt deutlich, dass die NEB-Berechnung die Barrieren überschätzt. Die **Int**-Geometrien korrigieren die mit NEB-Berechnungen überschätzten Barrieren. Die **Int**-Geometrien wurden durch die Berechnung mit dem Dimer-Algorithmus optimiert. Diese ergibt keine anionischen Intermediate. Stattdessen stellen die **Int**-Geometrien die nicht-kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplexe mit den verkürzten Bindungsabständen $d(\text{S-C1})$ und $d(\text{C2-H})$ dar (Tabellen 6.1 - 5.6). Die Geometrie des Inhibitors in **Int**-Komplex ist nicht planar, wie diese in einer klassischen VS-Kopfgruppe in der wässrigen Lösung vorzufinden wäre, sondern verzerrt (Abbildung 5.21). Die **Int**-Komplexe zeigen die VS-Kopfgruppe der Inhibitoren mit X=H, und X=F in einer Konformation, die die Additionsreaktion ohne eine anionische Zwischenstufe am besten ermöglicht. Die markantesten Unterschiede zwischen den Inhibitoren X=H und X=F bestehen anhand dieser Daten nun darin, dass die berechneten E \cdots I-Komplexe für die beiden Inhibitoren einen unterschiedlichen Energiebeitrag bis zu den **Int**-Geometrien aufweisen. Wenn für X=H diese Differenz ca. 2 kcal/mol (Tabellen 6.1 und 6.2) beträgt, zeigt der Inhibitor mit X=F einen deutlichen Energieunterschied von ca. 6 kcal/mol (Tabellen 5.6 und 6.3). Die Änderung der Verhältnisse zwischen der Höhe der Reaktionsbarriere und der Reaktionsenergie finden sich auch hier wieder. Der MEP mit dem Substituenten Fluor zeigt eine Absenkung der Reaktionsenergie und einen Anstieg der Reaktionsbarriere und ergibt somit eine sehr gute Übereinstimmung mit der experimentell gemessenen reversiblen Inhibition in Enzymassays, die sehr langsam abläuft.^{[5][28]}

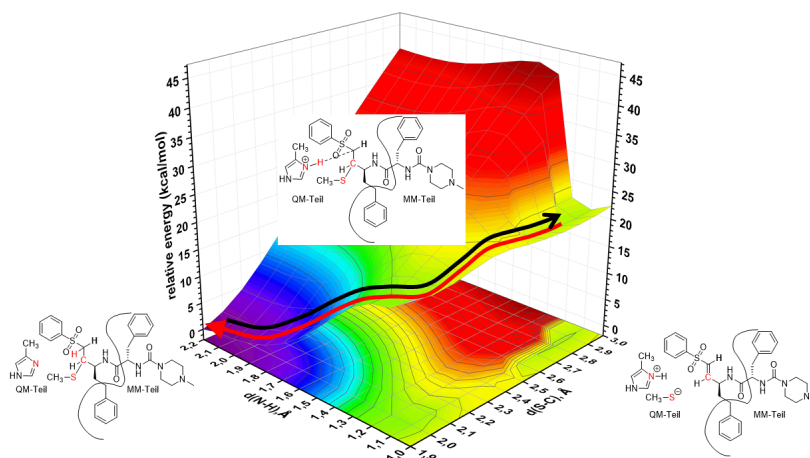


Abbildung 5.11: Potentialfläche (PES) der Additionsreaktion des Inhibitors K11777 (K777, X=H). Schwarzer Pfeil: Richtung der QM/MM-Berechnung; Roter Pfeil: Richtung der Inhibitionsreaktion. QM-Berechnungen wurden mit $RI^{[33][34][35]}$, $BLYP^{[36][37]}$ /def-TZVP^{[38][39]} durchgeführt.

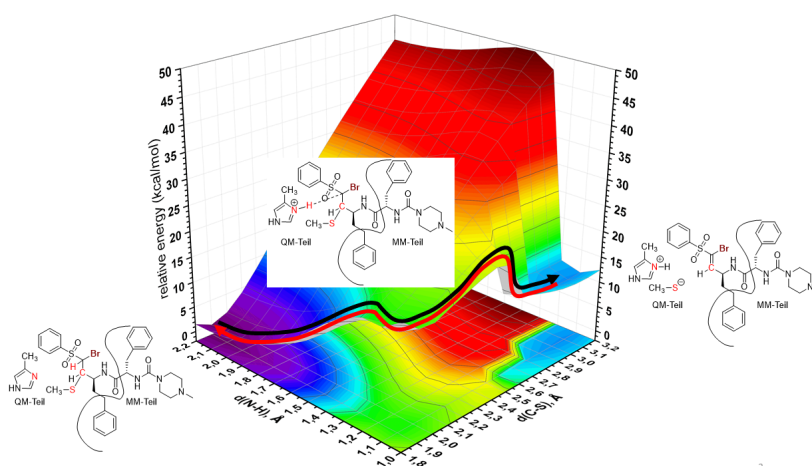


Abbildung 5.12: Potentialfläche (PES) der Additionsreaktion des Inhibitors K777-Br (K11777 mit X=Br). Schwarzer Pfeil: Richtung der QM/MM-Berechnung; Roter Pfeil: Richtung der Inhibitionsreaktion. QM-Berechnungen wurden mit $RI^{[33][34][35]}$, $BLYP^{[36][37]}$ /def-TZVP^{[38][39]} durchgeführt.

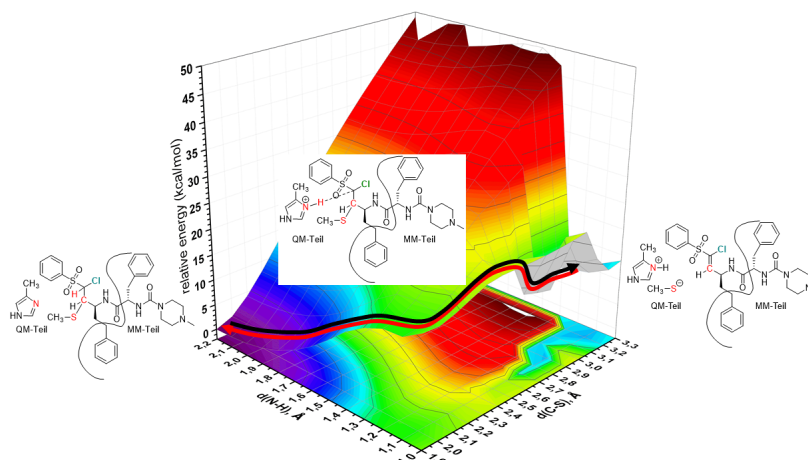


Abbildung 5.13: Potentialfläche (PES) der Additionsreaktion des Inhibitors K777-Cl (K11777 mit $X=\text{Cl}$). Schwarzer Pfeil: Richtung der QM/MM-Berechnung; Roter Pfeil: Richtung der Inhibitionsreaktion. QM-Berechnungen wurden mit RI^{[33][34][35]}, BLYP^{[36][37]}/def-TZVP^{[38][39]} durchgeführt.

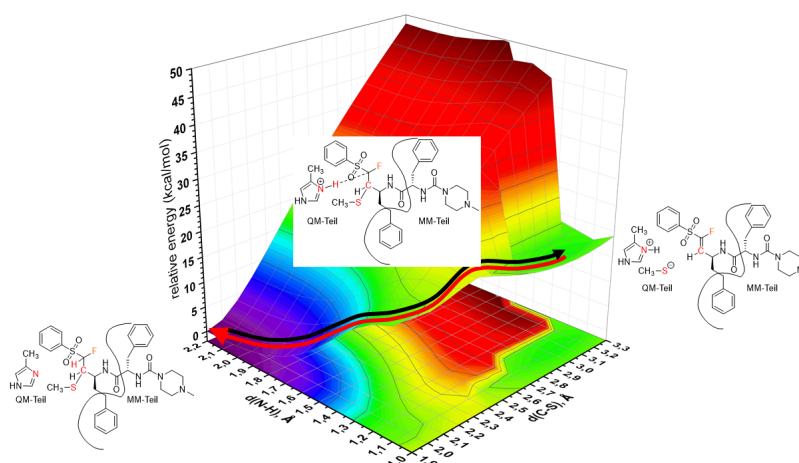


Abbildung 5.14: Potentialfläche (PES) der Additionsreaktion des Inhibitors K777-F (K11777 mit $X=\text{F}$). Schwarzer Pfeil: Richtung der QM/MM-Berechnung; Roter Pfeil: Richtung der Inhibitionsreaktion. QM-Berechnungen wurden mit RI^{[33][34][35]}, BLYP^{[36][37]}/def-TZVP^{[38][39]} durchgeführt.

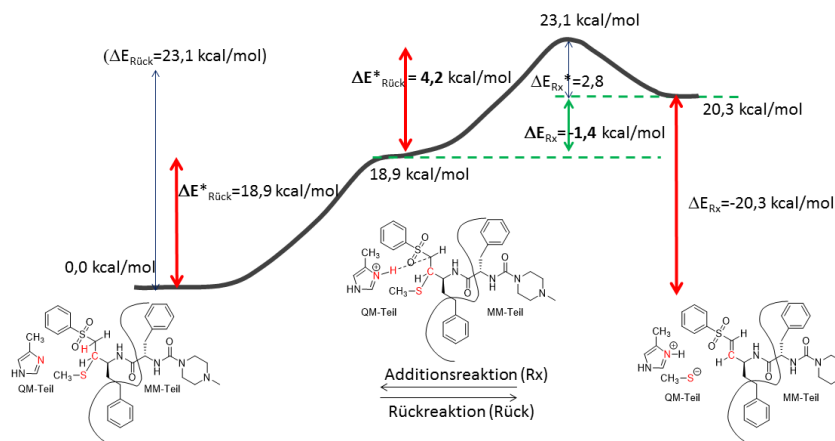


Abbildung 5.15: Schematische Darstellung der PES: ein 2-d Schnitt durch die Fläche entlang des Minimumenergiepfades (MEP) der Inhibitionsreaktion des Inhibitors K11777 (K777, X=H).

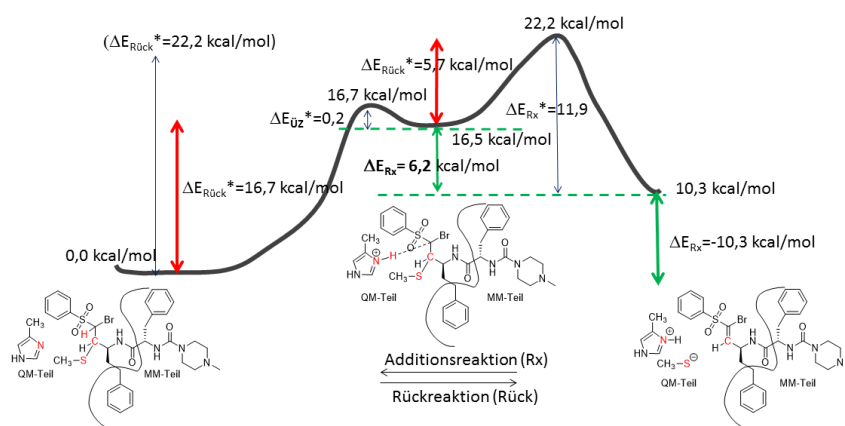


Abbildung 5.16: Schematische Darstellung der PES: ein 2-d Schnitt durch die Fläche entlang des Minimumenergiepfades (MEP) der Inhibitionsreaktion des Inhibitors K777-Br (K11777 mit X=Br).

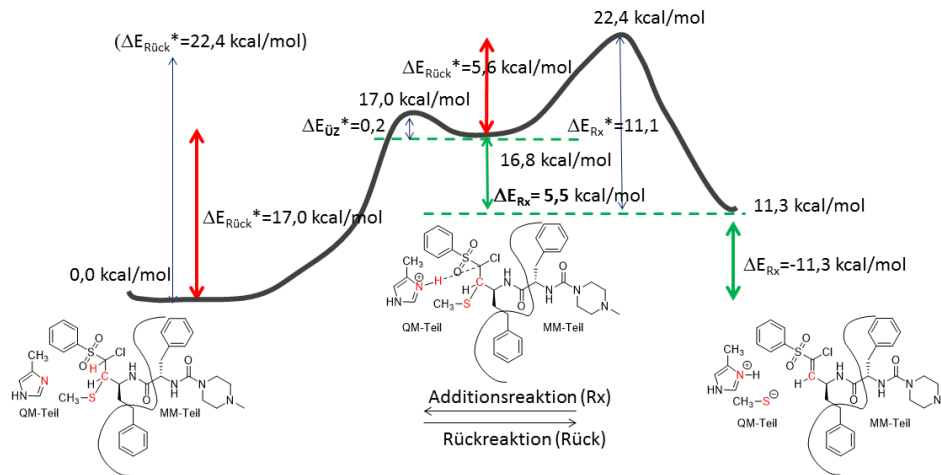


Abbildung 5.17: Schematische Darstellung der PES: ein 2-d Schnitt durch die Fläche entlang des Minimumenergiepfades (MEP) der Inhibitionsreaktion des Inhibitors K777-Cl (K11777 mit X=Cl).

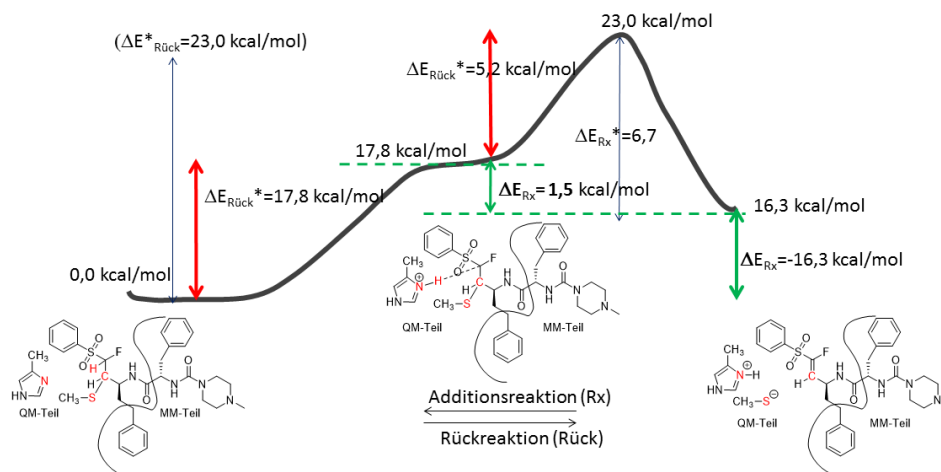


Abbildung 5.18: Schematische Darstellung der PES: ein 2-d Schnitt durch die Fläche entlang des Minimumenergiepfades (MEP) der Inhibitionsreaktion des Inhibitors K777-F (K777-X, X=F).

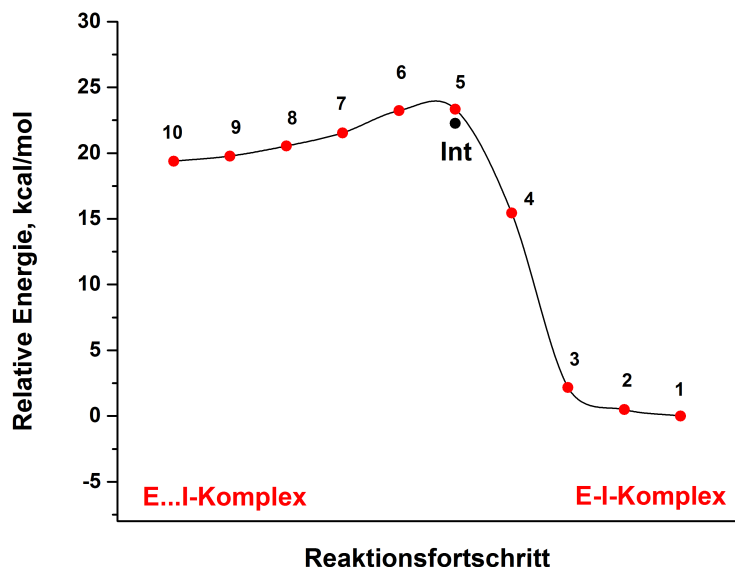


Abbildung 5.19: MEP der Inhibitionsreaktion von Rhodesain durch den Inhibitor K11777 (K777, X=H). MEP wurde berechnet mit Hilfe der $CI^{[15]}$ -NEB $^{[14]}$ -QM/MM-Methode an den Minima der berechneten PES (Abbildung 5.11). Die **Int**-Geometrie wurde mit Hilfe des Dimer $^{[23][24]}$ -Algorithmus optimiert.

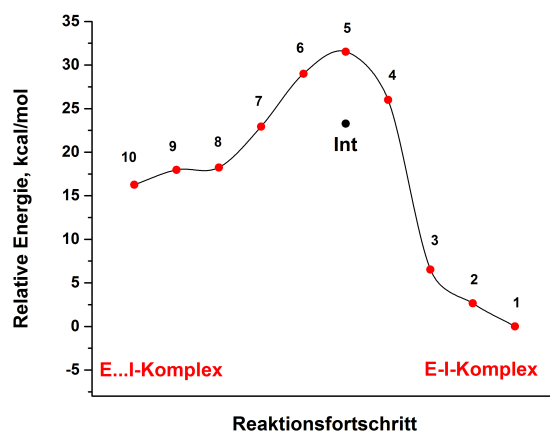


Abbildung 5.20: MEP der Inhibitionsreaktion von Rhodesain durch den Inhibitor K777-F (K11777 mit X=F). MEP wurde berechnet mit Hilfe der $CI^{[15]}$ -NEB $^{[14]}$ -QM/MM-Methode an den Minima der berechneten PES (Abbildung 5.14). QM-Berechnungen wurden mit RI $^{[33][34][35]}$ -BLYP $^{[36][37]}$ /def-TZVP $^{[39][38]}$ durchgeführt. Die **Int**-Geometrie wurde mit Hilfe des Dimer-Algorithmus optimiert. Mehr Informationen siehe Text.

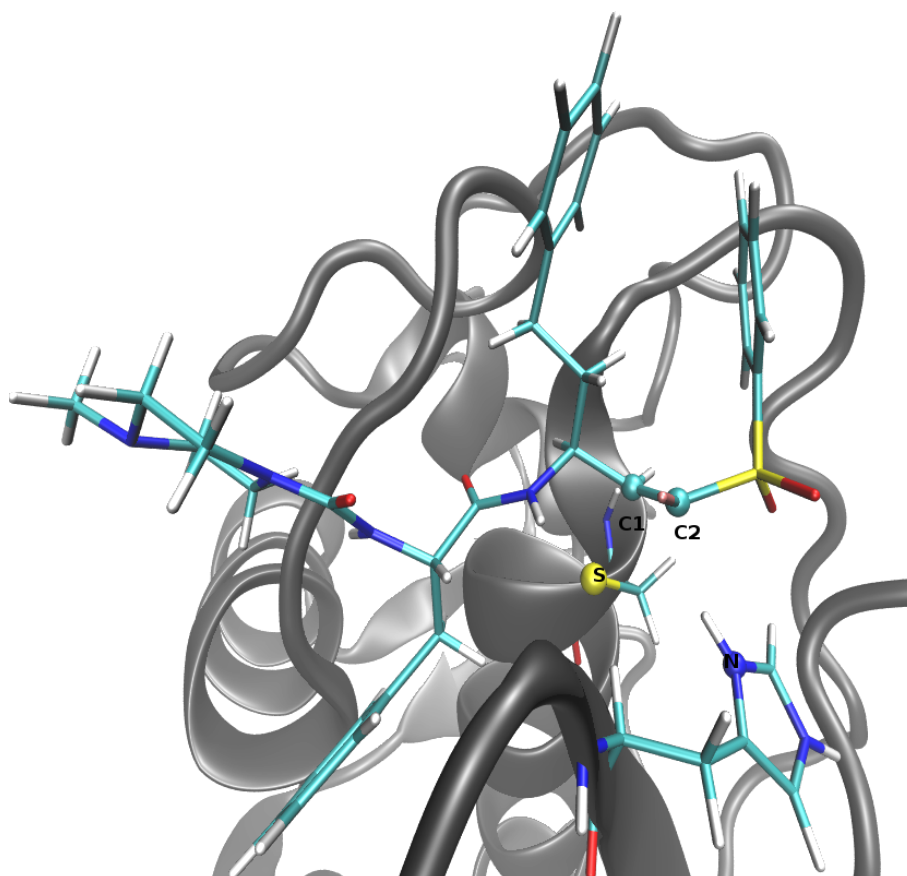


Abbildung 5.21: Die **Int**-Geometrie des nicht-kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplexes *Rhodesain* ··· *K777-F* (*K11777* mit $X=F$) zur Tabelle 5.6.

Tabelle 5.6: Charakteristische Bindungsabstände der Geometrien von Enzym-Inhibitor-Komplexen (Inhibitor *K777-X*, $X=F$) entlang des MEP, die in der Abbildung 5.20 graphisch dargestellt sind. QM-Berechnungen wurden mit RI^{[33][34][35]}-BLYP^{[36][37]}/def-TZVP^{[38][39]} durchgeführt.

Geom. Nr.	Energie		Bindungsabstände in Å			
	absolut (a.u.)	relativ (kcal/mol)	d(S-C1)	d(C2-H)	d(N-H)	d(S-H)
1	-1941,8161	0,0	1,90	1,10	2,20	-
2	-1941,8118	1,97	1,93	1,12	2,10	-
3	-1941,8057	6,53	1,98	1,16	1,91	-
4	-1941,7746	26,01	2,02	1,59	1,36	-
5	-1941,7658	31,53	2,23	2,14	1,06	2,88
Int	-1941,778977	23,27	2,36	2,38	1,03	2,81
6	-1941,7699	29,00	2,49	2,54	1,06	2,81
7	-1941,7795	22,94	2,67	2,88	1,06	2,50
8	-1941,7870	18,25	2,83	3,22	1,07	2,25
9	-1941,7874	19,98	2,89	3,45	1,08	2,07
10	-1941,7902	16,26	3,08	3,67	1,09	2,05

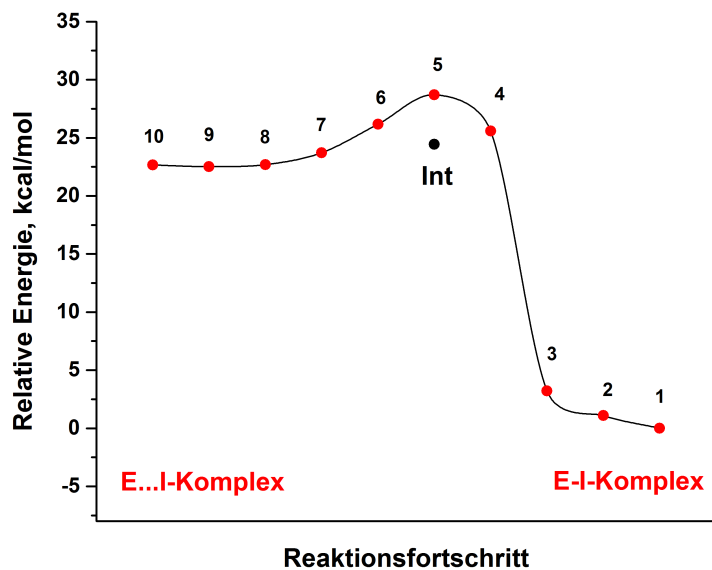


Abbildung 5.22: MEP der Inhibitionsreaktion von Rhodesain durch den Inhibitor K11777 (K777, X=H). MEP wurde berechnet mit Hilfe der CI^[15]-NEB^[14]-QM/MM-Methode an den Minima der berechneten PES (Abbildung 5.11). Geometrie des E...I-K **Int** wurde mit Hilfe des Dimer^{[23][24]}-Algorithmus optimiert. QM-Berechnungen wurden mit B3LYP^{[36][37][134][135][131]}/def-TZVP^{[38][39]} durchgeführt.

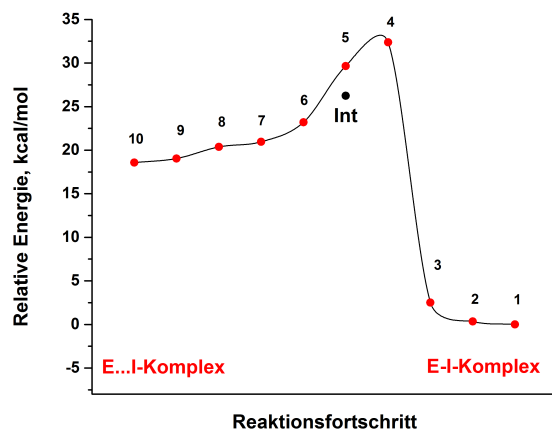


Abbildung 5.23: MEP der Inhibitionsreaktion von Rhodesain durch den Inhibitor K777-F (K11777 mit X=F). MEP wurde berechnet mit Hilfe der CI^[15]-NEB^[14]-QM/MM-Methode an den Minima der berechneten PES (Abbildung 5.14). QM-Berechnungen wurden mit B3LYP^{[36][37][134][135][131]}/def-TZVP^{[38][39]} durchgeführt. Die **Int**-Geometrie wurde mit Hilfe des Dimer-Algorithmus optimiert.

NP: Reaktionsprofile aus den nicht-kovalenten E···I-Komplexen

Betrachten wir die Ergebnisse des zweiten Teils der Untersuchungen an Rhodessain. Die Berechnungen aus der Röntgenstruktur (X-Ray-Pfade) lieferten die nicht-kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplexe (E···I-Komplexe) des Enzyms Rhodessain und des Inhibitors K777-X mit den variablen X-Substituenten (X=H, F, Br, Cl). An den so erhaltenen nicht-kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplexen wurden nach einem erneuten Anfügen der Hydrathülle⁴ die MD-Simulationen durchgeführt. Dabei wurden keine Fixierungen für den Bindungsabstand zwischen dem Schwefelatom des deprotonierten Cystein Aminosäurerests Cys25 (S) und dem elektrophilen β -Kohlenstoff Atom der VS-Kopfgruppe (C1) angewendet (enthält das zwitterionische Cys25-His162-Paar, Abbildung 5.10). Anhand der Bindungsabstände zwischen dem Schwefelatom des deprotonierten Cystein Aminosäurerests Cys25 und dem elektrophilen β -Kohlenstoffatom der VS-Kopfgruppe des Inhibitors (C1) erkennt man deutlich die Stabilität der nicht-kovalenten E···I-Komplexe: Der Inhibitor verbleibt im Verlauf der MD-Simulation in der Bindungstasche. Die Abbildungen 6.11, 6.12, 6.13 und 6.14 zeigen Änderungen der Bindungsabstände $d(S-C1)$ im Verlauf der jeweiligen MD-Simulation.

Der Inhibitor verlässt zwar nie die aktive Bindungstasche des Enzyms, die Geometrien der MD-Trajektorie weisen eine Verlängerung der Bindungsabstände $d(S-C1)$ auf. Sie verlängern sich im Mittel auf 3,32 Å für K11777 (X=H), wobei der längste Bindungsabstand entlang der MD-Trajektorie mit 3,86 Å charakterisiert wurde. Die Verlängerung dieser Reaktionskoordinate des Protontransfers, $d(C2-H)$, ist deutlicher als die Verlängerung der Reaktionskoordinate für die kovalente Bindung, $d(S-C1)$. Hier beträgt der Mittelwert für den Inhibitor K11777 (X=H) 3,62 Å, wobei der maximale Wert in der MD-Trajektorie 4,21 Å erreicht. Die obengenannten Werte für die Inhibitoren mit den halogenhaltigen EWG (X=F, Br, Cl) sind in der Tabelle 5.7 zusammengefasst.

Tabelle 5.7: Charakteristische Bindungsabstände $d(S-C1)$ und $d(C2-H)$ in Å für die Geometrien der E···I-Komplexe entlang der 5ns-MD-Simulation.

X=	H		F		Br		Cl	
Wert	mittel	max	mittel	max	mittel	max	mittel	max
$d(S-C1)$	3,32	3,86	3,28	3,74	3,36	3,91	3,39	4,01
Wert	mittel	max	mittel	max	mittel	max	mittel	max
$d(C2-H)$	3,62	4,21	3,72	4,52	3,70	4,30	3,75	4,52

⁴Aufgrund der steigenden Kosten der QM/MM-Berechnung mit der Atomanzahl wurde der größte Teil der Wasserhülle für diese Rechnungen entfernt. Für eine korrekte Beschreibung mittels der Molekularmechanik (MM) ist es erforderlich, eine erneute MD-Simulation des Enzym-Inhibitor-Komplexes konsistent hydratisiert durchzuführen.

Als Folge der verlängerten Reaktionskoordinaten kommt es zu einer erhöhten Beweglichkeit des Inhibitors innerhalb der Bindungstasche. Visuelle Untersuchungen der Geometrien entlang der MD-Simulation ließen erkennen, dass die Beweglichkeit der Substituenten in der Erkennungseinheit des Inhibitors K11777 am höchstens ist. Die Substituenten der S1- und S2-Subtaschen, Homophenylalanyl- und Phenyl-Gruppen (Abbildungen 2.7 und 2.6), charakterisieren sich durch die rotierenden Bewegungen um die Einfach-Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindung. Die N-Methyl-Piperazyl-(N-Me-Pip)-Gruppe der S3-Subtasche zeigte wesentlich stärkere Abweichungen von der üblich angenommenen Sessel-Konformation der 6-Ring-Form. Zudem wurde die Rotation um die Doppelbindung des Inhibitors (X=H und F) offensichtlich durch die ausgewählten Kraftfeld-Parameter GAFF des Inhibitors zugelassen. Die letzten zwei molekulardynamischen Bewegungen des Inhibitormoleküls wurden als artifiziell angesehen und wurden in einem nächsten Schritt der MD-Simulationen berücksichtigt. Hierzu wurde eine Einschränkung der Bewegung durch eine kleine Änderung der Federkonstante der Nicht-Wasserstoffatome des N-Me-Pip und die betroffenen VS-Atome der Doppelbindung (C1, C2, X, S1 und H39, siehe Abbildung 5.33) angewendet. Somit konnten diverse Geometrien der nicht-kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplexe mit Hilfe der MD-Simulation untersucht werden.

Die Verlängerung der oben aufgeführten Bindungsdistanzen, im Besonderen die des Protonentransfers, führte zum erhöhten Kostenaufwand bei den Berechnungen von 3-dimensionalen Potentialhyperflächen. Aus diesem Grund ergab sich die Reaktionsprofilberechnung mit Hilfe des NEB-Dimer-Ansatzes als eine kostengünstigere Alternative zu der PES-Berechnung der NP's: Für die MEP-Berechnung liefern die beiden Methoden nahezu identische Ergebnisse, auf die im Weiteren eingegangen wird (Abbildungen 5.24 und 5.25).

Betrachten wir nun die für den Inhibitor K11777 (X=H)^[4] berechneten Reaktionsprofile der Additionsreaktion. Die 3-dimensionale Potentialhyperfläche (PES), die durch eine Berechnung der einzelnen Geometrien von der Situation des nicht-kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplexes zu der Situation des kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplexes, wurde nur an den wichtigsten Stellen der PES, aufgrund der enormen Kosten der Gesamtberechnung, vorgenommen (Abbildung 5.24). Der 2-dimensionale Schnitt durch die Fläche entlang des Minimumenergiepfades (MEP), der durch die Anwendung der NEB-Methode berechnet wurde, ist in der Abbildung 5.25 zu sehen. Die Berechnungen sagen für die Bildung eines kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplexes Rhodesain-K11777 (PDB-ID:2P7U^[4]) eine Reaktionsenergie von -7,0 kcal/mol vorher. In Anbetracht dessen, dass der Inhibitor K11777 ein irreversibler Inhibitor durch die Additionsreaktion ist, ist die berechnete Reaktionsenergie in diesem Ansatz deutlich geringer als erwartet. Die bisherigen QM- und QM/MM-Berechnungen (siehe Abbildungen 5.2 und 5.11) sagten

für die irreversiblen Inhibitoren deutlich höhere Reaktionsenergien vorher. An dieser Stelle tritt eindeutig eine Diskrepanz der Ergebnisse der NP-Berechnungen mit den durchgeführten QM-Berechnungen an den VS-Inhibitoren in wässriger Lösung auf, die im vorherigen Abschnitt (siehe Abbildung 5.2) dargestellt wurden. Gehen wir zu den Reaktionsprofilen der Addition von Inhibitoren mit einer halogenhaltigen EWG an dem α -Kohlenstoffatom (C2) der VS Kopfgruppe (X=F, Abbildungen 5.26, 5.27 und X=Br, Abbildungen 5.28, 5.29), beobachten wir die Tendenz der Absenkung der Reaktionsenergie von -7 kcal/mol (für den irreversiblen Inhibitor mit X=H) auf die Werte von -4,3 (X=F) und -0,9 kcal/mol (X=Br), ähnlich den XP-Berechnungen im vorherigen Unterabschnitt. Auch hier, in der Halogen-Reihe der K777-X-Inhibitoren, wird die Reaktionsenergie der Additionsenergie deutlich unterschätzt, wenn die QM/MM-Berechnungen nach dem NP-Ansatz durchgeführt werden. Die nahezu thermoneutrale Additionsreaktion des bromsubstituierten Inhibitors K777-Br und die zu geringe Reaktionsenergie des irreversiblen Inhibitors (K11777) lässt darauf schließen, dass die korrekte Darstellung der Reaktionsenergien durch den NP-Ansatz nicht erreicht werden kann. Die Berechnung des Reaktionsprofils der Addition für den Inhibitor K777-Br wurde zur Aufstellung einer anschaulichen Halogenreihe durchgeführt, denn, wie bereits im vorherigen Abschnitt (Berechnungen in Lösung) gezeigt, tendieren die VS-Inhibitoren K777-X mit X=Br und Cl zu der Substitutionsreaktion des Halogenids in der VS-Kopfgruppe, auf die später noch genauer eingegangen wird. Die Berechnung des MEP der Additionsreaktion für den bromsubstituierten VS-Inhibitor mit Hilfe der NEB-Methode liefert im NP-Ansatz ein Ergebnis zum Übergangszustand der Additionsreaktion im Enzym, was bisher nicht erreicht werden konnte. Die Geometrie des Übergangszustandes ist ein anionisches Intermediat (Int- β), welches auch gleichzeitig ein Übergangszustand für die S_NV - und der Ad_N-E -Reaktion (schematische Darstellung kann der Abbildung 5.1 entnommen werden) im Enzym darstellt.

In den Tabellen 6.4, 6.5, 6.6 sind die wichtigsten geometrischen Parameter der Enzym-Inhibitor-Komplexe entlang der Minimumenergiepfade, die mit Hilfe des NEB-Dimer-Algorithmus berechnet wurden, zusammengefasst. Die Reaktionsprofile der K777-X-Inhibitoren mit X=H und X=F, die durch zehn Geometrien und für X=Br durch sechs Geometrien aufgespannt wurden, ergaben zunächst eine zu hohe Reaktionsbarriere, die mit der anschließenden Dimer-Berechnung korrigiert wurde und resultierte in einer energetisch tiefer liegenden Geometrie **Int**. In allen drei Fällen (X=H, F, Br) entspricht die **Int**-Geometrie einem nicht-kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplex in der günstigen Konformation für den nukleophilen Angriff des Schwefelatoms (S) des Cysteinrestes Cys25 an das C1-Atom des Inhibitors. Die Bindungsabstände $d(S-C1)$ betragen 2,27 (X=H), 2,25 (X=F) und 2,24 (X=Br) Å. Die projizierten Höchstpunkte der NEB-Kurven zeigen

einen Charakter des anionisches Intermediats nach Bernasconi^{[32][31]}, wie z.B die Geometrie Nr. 7 für X=F (Tabelle 6.5), in der die Bindungslänge d(S-C1) eindeutig auf die kovalente Bindung zwischen dem Cystein und dem Inhibitor hindeutet. Die Evaluierung dieser Geometrie durch die Frequenzberechnungen und die Analyse der Normalmoden ergab jedoch keine imaginäre Frequenz. Dieses Ergebnis dient als Nachweis dafür, dass die Geometrie Nr. 7 kein Übergangszustand auf dem Reaktionsprofil ist. Im Fall, dass für die gegebene Reaktion ein Übergangszustand vorliegt, wird die Dimer-Geometrie (**Int**) diesen widerspiegeln. Für Inhibitoren mit EWGs X=F und X=H konnten die mit der Dimer-Methode verfeinerten Strukturen nicht als Übergangszustände eruiert werden. Ebenfalls ergaben Analysen der Normalmoden für die anionischen Geometrien, die durch den PES-Ansatz erhalten wurden, keine Resultate zum Nachweis eines Übergangszustandes für die VS-Inhibitoren mit Fluor und Wasserstoff. Dagegen zeigte sich die Kombination der NEB-Methodik für die Erstellung eines Reaktionspfades und die Verfeinerung seiner Barriere mit Hilfe der Dimer-Methode erfolgreich für den Inhibitor K777-X mit X=Br. Die Berechnung bestand aus zwei Teilen. Entlang des ersten berechneten MEP wurde zunächst kein anionisches Enzym-Inhibitor-Komplex gefunden (Abbildung 5.29, Tabelle 6.6). Der mögliche Grund dafür liegt in der geringeren Energiedifferenz zwischen den Geometrien **Int*** und **Int**, die niedriger als die Fehlerbalken der Berechnung sind. Erst durch die zweite NEB-Berechnung, ausgehend von den Geometrien **Int** und **6** (Produkt), konnte die anionische Geometrie des Enzym-Inhibitor-Komplexes **Int*** erhalten werden. Hierbei wurde die identifizierte anionische Geometrie des Komplexes durch eine einzige imaginäre Frequenz ($-817,2730 \text{ cm}^{-1}$) charakterisiert. Diese spiegelt einen Übergangszustand (ein Sattelpunkt) der Additionsreaktion des Inhibitors K777-X mit X=Br an die katalytischen Aminosäurereste von Rhodessain wieder. Die Geometrie des Übergangszustandes der Additionsreaktion des Inhibitors K777-X mit X=Br entspricht eindeutig einer anionischen Geometrie des nicht-kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplexes, in der das Proton zwischen dem Stickstoffatom des Histidin Aminosäurerestes His162 und dem α -Kohlenstoffatom der VS-Kopfgruppe übertragen wird. In der Abbildung 5.30 ist die Molekülschwingung bei der identifizierten imaginären Frequenz, die vorwiegend aus dem Protonentransport zwischen dem kovalenten Inhibitor-Cystein-Addukt und Histidin Aminosäurerest besteht, gezeigt.

Um die Ergebnisse von den NP-Berechnungen, d.h. die Werte der Reaktionsenergien überprüfen und evaluieren zu können, wurden die QM/MM-Rechnungen wiederholt durchgeführt. In den beiden neu durchgeführten Berechnungen zu den Inhibitoren K777-X mit X=H und X=F wurden nur sehr kleine Abweichungen gefunden, die kleiner als die Fehler der Berechnung sind. Betrachten wir zunächst diese für den Inhibitor K11777 (X=H). Die Startstruktur zur Berechnung

des Reaktionsprofils (QM/MM-System, siehe Details) stammte aus der erneut durchgeführten MD-Simulation an der Geometrie des nicht-kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplexes der XP-Berechnung. Die Gesamtdauer der MD-Simulation wurde zu einem Wert von 9 ns gewählt, welche insgesamt 900 Geometrien (Momentaufnahmen oder Frames von engl. *frames*) entlang der Simulation lieferte. Zur Berechnung des Reaktionsprofils wurde die letzte Geometrie (Frame 900, Abbildung 6.15) als Startstruktur verwendet. Die Berechnung ergab die Reaktionsenergie von -8,4 kcal/mol (-7,0 kcal/mol als erstes Ergebnis) und die relative Energie des **Int**-Komplexes von 13,2 kcal/mol. Somit beträgt die Barriere der Rückreaktion zur Freisetzung des Inhibitors K11777 (K777-X mit X=H) in Form eines nicht-kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplexes einen Wert von 21,6 kcal/mol. In analoger Vorgehensweise wurde die Evaluierung der NP-Berechnung für den Inhibitor K777-X mit X=F durchgeführt. Die Reaktionsprofile ausgehend von den Geometrien, die durch die MD-Simulation dargestellt wurden, Frame 400 und Frame 500, sind in der Abbildung 6.16 gezeigt. Die Reaktionsenergien in den beiden Berechnungen unterscheiden sich in einem marginalen Abstieg zu den Werten von -2,9 kcal/mol und -3,3 kcal/mol (-4,3 kcal/mol als erstes Ergebnis). Beide Berechnungen liefern zudem die relativ kleinen Anstiege der Reaktionsbarriere zu den Werten von 19,8 kcal/mol und 20,9 kcal/mol.

Zusammenfassend zeigen alle durchgeführten NP-Berechnungen für die Additionsreaktion des Inhibitors K777-X mit X=F eine ca. doppelte Absenkung der Reaktionsenergie im Vergleich zum Inhibitor K777-X mit X=H (K11777). Dass die Additionsreaktion für den Letzteren eine ausgesprochene Triebkraft besitzt, konnte in diesen Berechnungen nicht gezeigt werden. Die irreversiblen Reaktionen wurden bisher mit deutlich höheren Reaktionsenergien im Bereich ab ca. -20 kcal/mol durch die XP-Ansätze charakterisiert.^{[5][13]} Die Irreversibilität der Inhibition von Rhodesain durch den Inhibitor K11777 lässt sich mittels eines NP-Ansatzes auf Basis einer extrem hohen Reaktionsenergie der Additionsreaktion nicht erklären. Betrachtet man die Ergebnisse für die Reaktionsenergien isoliert, so stellt der NP-Ansatz im Vergleich zum XP-Ansatz zunächst keine geeignete Methode dar. Die Exothermie der Reaktion, die hier als Reaktionsenergie abgeschätzt wird, bestimmt dominierend die (Ir-)Reversibilität der K777-X-Inhibitoren. Die Höhen der Reaktionsbarrieren können dagegen Hinweise zu den relativen Geschwindigkeiten von Reaktionen geben. Die experimentellen Untersuchungen der Kooperation Prof. Dr. T. Schirmeister^[17] zeigen, dass bei halogenhaltigen Inhibitoren K777-X (X=F, X=Br) die Inhibition extrem langsam abläuft.^{[5][28]} Dieses Inhibitionsverhalten spiegelt sich in den mit dem NP-Ansatz berechneten Reaktionsbarrieren wieder: Im Vergleich zum Reaktionsprofil des Inhibitors K777-X mit X=H zeigt das Reaktionsprofil des Inhibitors K777-X mit X=F eine um ca. 7 kcal/mol höhere Barriere der Additionsreaktion (18 kcal/mol mit der NEB-Dimer-Methode,

Tabelle 6.5, maximal 21 kcal/mol, Tabelle 6.9). Es wird eine Veränderung der Barriere beim Übergang von X=H (ca. 10 kcal/mol) zu X=F in einer ca. doppelten Größenordnung beobachtet. Die extrem hohe Reaktionsbarriere im Fall X=F in der Beschreibung durch den NP-Ansatz ist in einer guten Übereinstimmung mit dem experimentell gefundenen verlangsamt ablaufenden Prozess der Inhibition durch die Additionsreaktion. Zusammen mit der relativ stark abgesenkten Reaktionsenergie kann für den Inhibitor K777-X mit X=F eine langsam ablaufende und reversible Additionsreaktion mit Rhodesain auch im Rahmen des NP-Ansatzes als solche erklärt werden.

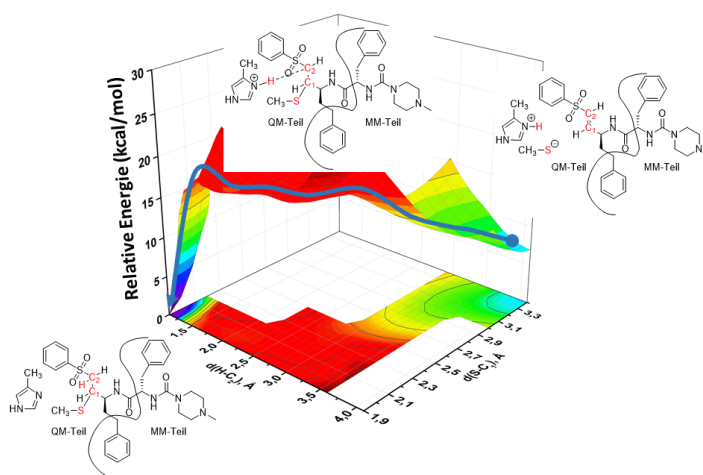


Abbildung 5.24: PES der Additionsreaktion des Inhibitors K11777 (K777 mit X=H). Blauer Pfeil: Richtung der Berechnung und gleichzeitig Richtung des Reaktionsablaufs.

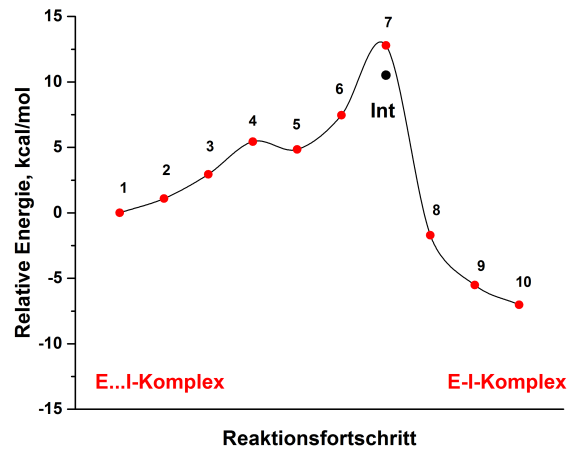


Abbildung 5.25: MEP der Inhibitionsreaktion von Rhodesain durch den Inhibitor K11777 mit $X=H$. MEP wurde mit Hilfe der CI-NEB-QM/MM-Methode berechnet. Die **Int**-Geometrie wurde mit Hilfe des Dimer-Algorithmus optimiert.

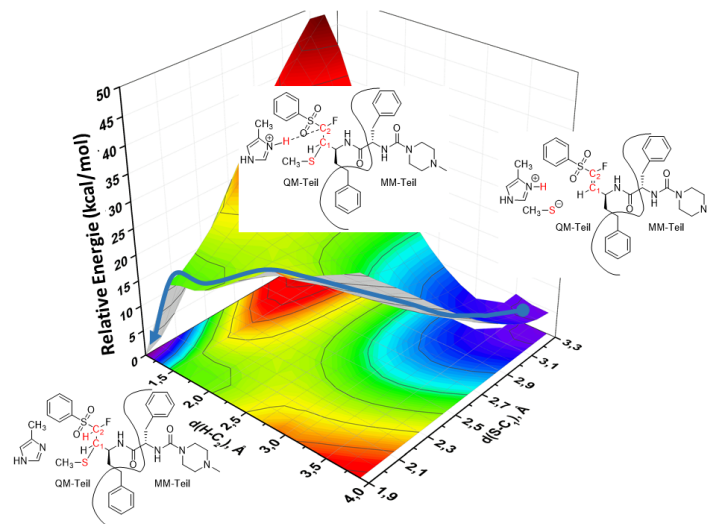


Abbildung 5.26: PES der Additionsreaktion des Inhibitors K777-F. Blauer Pfeil: Richtung der Berechnung und gleichzeitig Richtung des Reaktionsablaufs.

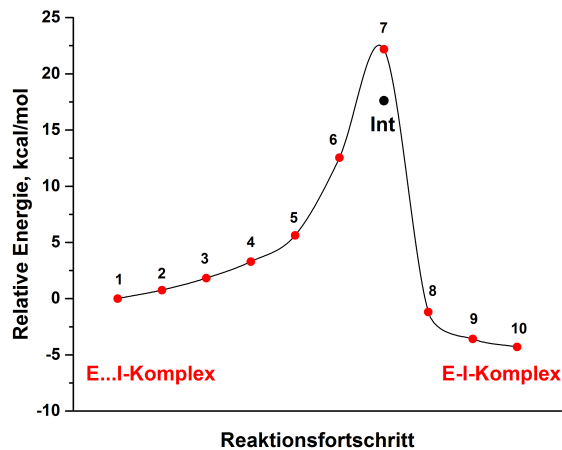


Abbildung 5.27: MEP der Inhibitionsreaktion von Rhodesain durch den Inhibitor K777-F. MEP wurde mit Hilfe der CI-NEB-QM/MM-Methode berechnet. Die **Int**-Geometrie wurde mit Hilfe des Dimer-Algorithmus optimiert.

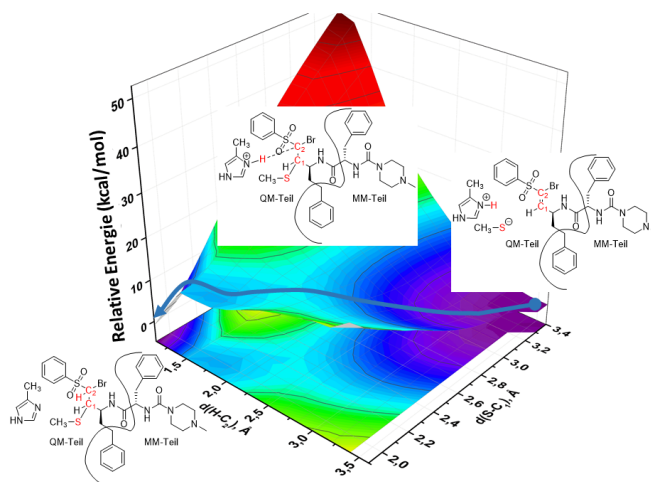


Abbildung 5.28: PES der Additionsreaktion des Inhibitors K777-Br. Blauer Pfeil: Richtung der Berechnung und gleichzeitig Richtung des Reaktionsablaufs.

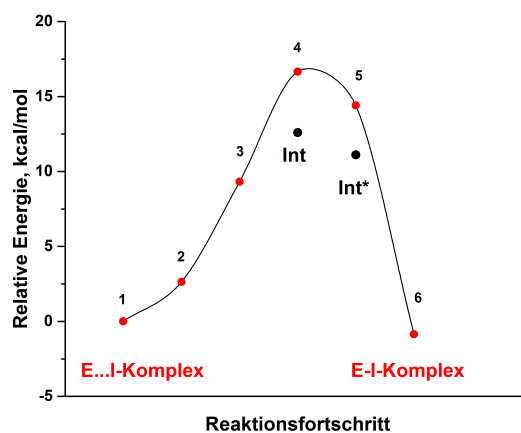


Abbildung 5.29: MEP der Inhibitionsreaktion von Rhodesain durch den Inhibitor K777-Br. MEP wurde mit Hilfe der NEB-QM/MM-Methode berechnet. Intermediate **Int** und **Int*** wurden mit Hilfe des Dimer-Algorithmus optimiert.

Abbildung 5.30: Normalschwingung des Inhibitors K777-X mit X=Br für die Geometrie des Übergangszustands (Additionsreaktion) mit der imaginären Frequenz von $-817,2730 \text{ cm}^{-1}$. Die Abbildungen wurden mit Hilfe des MOLDEN^[26]-Programms dargestellt (Die Darstellung der Linkatome ist nicht enthalten).

Untersuchungen zu dem neuen VS-Inhibitor K777-X mit X=F und 4-Pyridyl-Gruppe in der S3-sub-Tasche von Rhodocystis rubra

In der Erkennungseinheit des Inhibitors K777-X mit X=F wurde die Änderung mittels der Docking-Experimente durch AK Schirmeister vorgenommen: Der Substituent der S3-sub-Tasche N-Me-Piperazinyl wurde durch 4-Pyridyl ersetzt.^[5] Im letzten Schritt unseres in-house Protokolls werden die so gewonnenen neuen Inhibitoren mit Hilfe der Berechnungen im Enzym (QM/MM) erneut getestet. Der schematische Ablauf des in-house Protokolls ist in der Abbildung 1.6 dargestellt. Zu der beschriebenen Änderung im Rahmen dieser Arbeit wurde die Geometrie aus dem nicht-kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplex verwendet. Die Stabilität des neuen E ··· I-Komplexes wurde zunächst mit Hilfe der MD-Simulationen evaluiert. Der neue Inhibitor K777-X-S3 mit X=F und S3=4-Pyridyl verlässt nicht die aktive Tasche des Enzyms Rhodocystis rubra in der MD-Simulation der Gesamtlänge von 10 ns.^[5] Die Potentialhyperfläche ausgehend von der letzten Geometrie der MD-Simulation (Frame 1000) sagt die leicht exotherme Reaktion mit -2,3 kcal/mol vorher (Abbildung 5.31). Dieses Ergebnis bestätigt das reversible Verhalten des neuen Inhibitors K777-X-S3 mit X=F und S3=4-Pyridyl anhand des berechneten Reaktionsprofils.

Die Vorhersagen durch die Berechnungen stimmen mit den experimentellen Untersuchungen überein. Der ursprüngliche Inhibitor K11777^[4] hemmt irreversibel das Enzym Rhodocystis rubra mit der Affinität (auch als Inhibitionskonstante K_i) von 10 nM und der mittleren effektiven Konzentration (EC_{50}) von 43 μ M. Der Inhibitor K777-X mit X=F blockt reversibel, verlässt jedoch den nano-molaren Bereich der Hemmung durch den Wert von $K_i=190$ nM.^[28] Der neue Inhibitor K777-X-S3 mit X=F und S3=4-Pyridyl hemmt das Enzym Rhodocystis rubra kovalent und reversibel mit einem effektiven Wert der Affinität von $K_i=32$ nM im nano-molaren Bereich und dem EC_{50} -Wert von über 100 μ M.^{[5][28]}

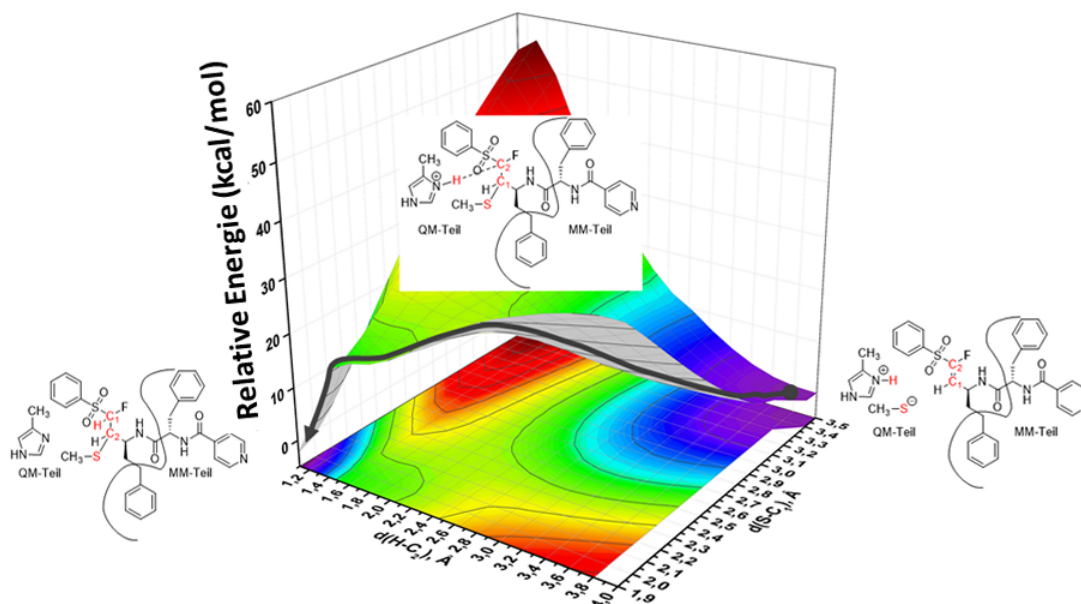


Abbildung 5.31: *Potentialhyperfläche (PES) der Additionsreaktion des Inhibitors K777-X-S3 mit X=F und S3=4-Pyridyl. Schwarzer Pfeil: Richtung der Berechnung und Richtung des Reaktionsablaufs. Die Startgeometrie ist das Frame 1000 der MD-Simulation.*

Substitution des Bromids

Ein weiterer Aspekt zur Beschreibung der Inhibition des Enzyms Rhodococcus durch den Inhibitor K777-X mit X=Br ist die Berechnung der Substitutionsreaktion des Bromid-Ions im Enzym. Die Substitution findet, wie bereits in dem der Berechnungen in wässriger Lösung gewidmeten Unterabschnitt gezeigt wurde (Abbildung 5.1), aus dem kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplex (Produkt der Additionsreaktion im Enzym) statt. Die relative Lage der beiden Substitutionsprodukte **S1*** und **S2*** ist in der Abbildung 5.32 zusammengefasst. Der nicht-kovalente Enzym-Inhibitor-Komplex **E ··· I-K**, welcher dem Modell-System **A*** (zwitterionische Edukte) bei Berechnungen in Lösung entspricht, wurde im Diagramm dem Referenzzustand (Nullpunkt) zugeordnet. Die energetische Lage der Geometrien der Enzym-Inhibitor-Komplexe stimmt zufriedenstellend überein mit den Daten, die durch die Berechnungen in der wässrigen Lösung (Modell-Berechnungen, Abbildung 5.1) erhalten wurden. Die relative Energie des kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplexes **E-I-K** stimmt ebenfalls überein innerhalb der Fehlerbalken der Rechnungen mit den Ergebnissen, die aus dem Screening-Schritt resultieren (vgl. mit dem Produkt **B** in Abbildung 5.3). Aus dem Diagramm in der Abbildung 5.32 erkennt man, dass die Geometrie **C1** in der enzymatischen Umgebung E-I-Komplex (**S1***) um ca. 3 kcal/mol über dem Produkt der Additionsreaktion **E-I-K** liegt. Hierbei besteht eine direkte Übereinstimmung der Berechnungen in wässriger Lösung auf dem Screening-Schritt mit der Berechnung im Enzym, denn es handelt sich um

das gleiche kovalente Produkt **C** (vgl. Abbildung 5.1). Die Geometrie **S1*** repräsentiert den kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplex, der durch die Freisetzung des Br-Ions entsteht. Dieser E-I-Komplex stellt kein Produkt, sondern ein Intermediat für die Substitutionsreaktion dar. Der Grund dafür besteht darin, dass der Histidin His162 Aminosäurerest in seiner protonierten Form vorliegt. Das freie Bromid-Ion ist durch die H-Bindungen, bestehend aus den Kontakten zu zwei Wassermolekülen und zum Aminosäurerest Trp184, stabilisiert.^[5] Daher zeigen die Berechnungen, dass die Barriere der Substitutionsreaktion über die Geometrie **S1*** einen Wert von 2,9 kcal/mol aufweist. Um den Austritt des Bromsubstituenten in seiner gesättigten Form als Bromwasserstoff zu berücksichtigen wurden die QM/MM-Berechnungen für die Geometrie **S2*** durchgeführt. Der kovalente E-I-Komplex dieser Substitutionsreaktion resultiert in einer leicht endothermen Reaktion von +12,3 kcal/mol (relativ zu dem Energiewert der Geometrie **E-I-K**, Produkt der Additionsreaktion). Die Substitutionsreaktion vom Bromid-Ion gilt als irreversibel, da das freie Bromid-Ion dem Gleichgewicht entzogen wird. Die Berechnung der Geometrie eines entsprechenden Enzym-Inhibitor-Komplexes, in der das Bromid-Anion mit den Wassermolekülen begünstigt koordiniert ist, ist jedoch aufgrund der statischen Natur der QM/MM-Berechnungen erschwert. Das flüchtige Bromwasserstoff wird dem Gleichgewicht der Gesamtreaktion ebenfalls entzogen, sodass die letzte irreversibel ist. Eine gute Referenz liefert an dieser Stelle das Ergebnis der Berechnung in wässriger Lösung mit einem deutlichen Wert der relativen Energie von ca. -30 kcal/mol (vgl. mit dem Produkt **C1** in Abbildung 5.3).

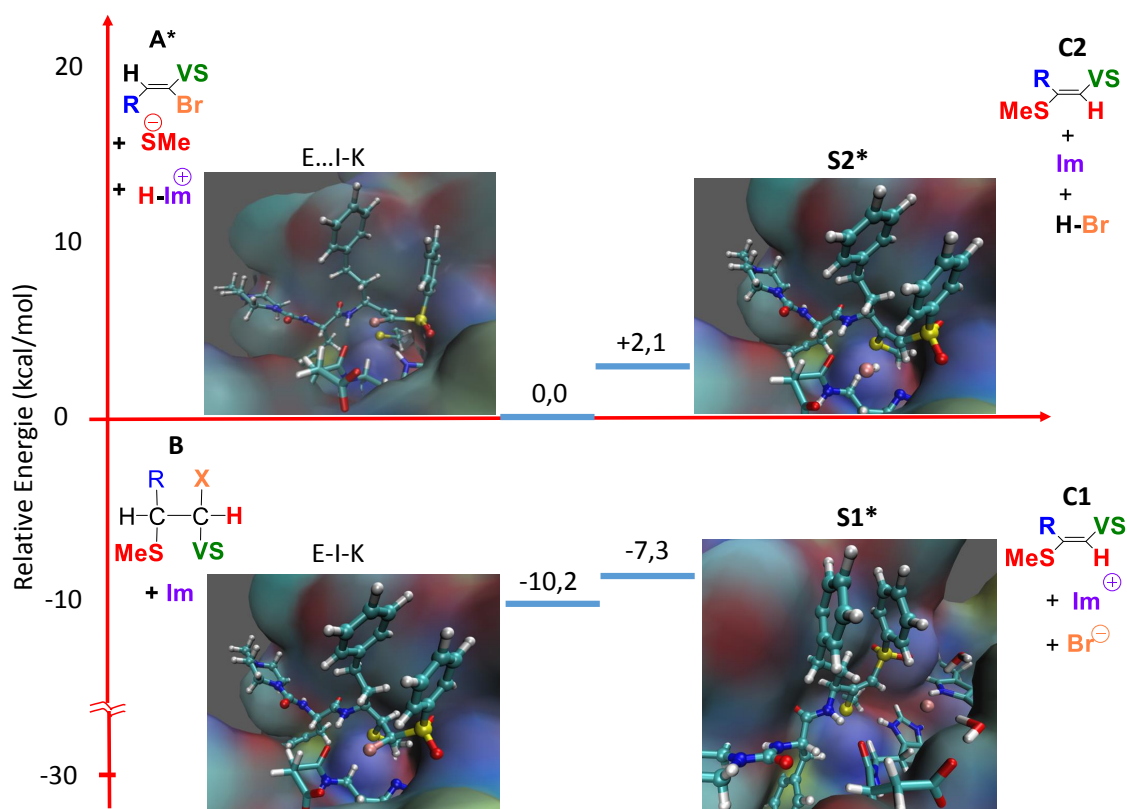


Abbildung 5.32: Relative Energien (Reaktionsenergien) der Substitutionsprodukte **S1*** und **S2*** im Enzym für den Inhibitor K11777 mit EWG-X Bromid (X=Br). Theorielevel der QM/MM-Berechnungen: QM-Berechnungen wurden mit RI-BLYP/def-TZVP durchgeführt. Die Geometrien der berechneten Enzym-Inhibitor-Komplexe wurden mit Hilfe von VMD^[87] dargestellt. Die in wässriger Lösung berechneten Modell-Systeme **C1** und **C2** entsprechen den QM-Bereichen der Komplexe E-I-Ks **S1*** und **S2***.

Analyse der Geometrien: Gründe der Unterschiede zwischen XP und NP

Alle berechneten Reaktionsprofile der Additionsreaktion des Inhibitors K777-X zeigen die konsistenten Verläufe innerhalb der Reihe X=H, F, Br und Cl. Zudem weisen diese eine ähnliche Form innerhalb der angewendeten Ansätze (XP- im ersten Teil der Arbeit und NP-Berechnungen im zweiten Teil der Arbeit) auf. Die Berechnungen mit verschiedenen Ansätzen ergeben jedoch eine stärkere Verschiebung für die Werte der Reaktionsenergien. Die XP-Reaktionsprofile, die ausgehend von den kovalenten E-I-Komplexen (Produkten) zu den Edukten berechnet wurden, sagen die Inhibitoren stärker exotherm vorher als die NP-Reaktionsprofile, die ausgehend von den nicht-kovalenten E···I-Komplexen (Edukten) zu den Produkten (in die Richtung des Reaktionsablaufs) berechnet wurden. Um die Diskrepanz in den Reaktionsenergien bei Verwendung der verschiedenen Ansätze für denselben Inhibitor (z.B. K777-X mit X=F) zu analysieren, wurden die nicht-kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplexe (E···I-Komplexe) der beiden Berechnungen im Detail betrachtet. In der Abbildung 5.33 ist die Atomnummerierung in den analysierten Geometrien gegeben.

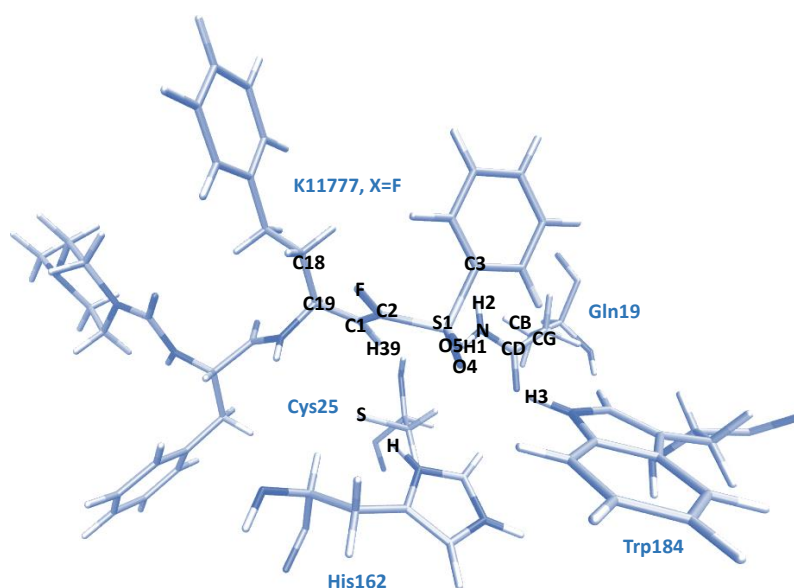


Abbildung 5.33: Darstellung der Geometrie des nicht-kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplexes mit der Atomnummerierung zur Analyse der Ergebnisse der NP- und XP-Berechnungen.

Die Unterschiede lassen sich am einfachsten erkennen, indem man die Geometrien durch die RMSD-Matrix überlagert. Das strukturelle Alignment (im Weiteren auch als strukturelle Ausrichtung)^[208] der Geometrien wurde mit Hilfe des VMD-Programmpakets^[87] durchgeführt. In der Abbildung 5.34 sind die Geometrien der

Enzym-Inhibitor-Komplexe und deren strukturelle Überlagerung durch die Atome des Proteinrückgrats dargestellt. Das Rückgrat des Inhibitors sowie der Cystein Aminosäurerest der aktiven Tasche der beiden nicht-kovalenten Komplexe (NP, die Geometrie Nr.1 in der Abbildung 5.27 und und XP, die Geometrien Nr.10 in der Abbildung 5.23) liegen faktisch aufeinander (Abbildung 5.34), sodass relativ kleine RMSD-Werte gemessen wurden (Tabelle 5.8). Die Abweichungen zwischen den Geometrien fallen höher aus an den Aminosäureresten Gln19 und Trp184 der aktiven Tasche sowie an den Substituenten der Erkennungseinheit des Inhibitors. Die Flexibilität der Seitenkette des Glutamin Gln19 Aminosäurerests ist sehr stark durch seinen hohen RMSD-Wert von 0,70 (Differenz zwischen den Werten 0,74 und 0,04 in Tabelle 5.8) ausgeprägt. Hierbei ist die Seitenkette der NP-Geometrie in Richtung des Cystein Aminosäurerests orientiert. Die Seitenkette der XP-Geometrie klappt dagegen in die entgegengesetzte Richtung.⁵ Die Differenz zwischen den beiden Positionen der Seitenketten in XP- und NP-Komplexen zu etwa 86° des Torsionswinkels (Tabelle 5.9, Messung Nr. 7) deutet auf den sogenannten Gln-Flip.

Die unterschiedlichen Gln19-Positionen resultieren aus der Startgeometrie des Enzym-Inhibitor-Komplexes, die durch die MD-Simulation berechnet wurde. In dem XP-Ansatz wurde die eine Position und in dem NP-Ansatz die andere Position des Glutamin Gln19 Aminosäurerests begünstigt, da die kovalente Bindung zum Cystein entweder bestand oder nicht. Durch die Berechnung des MEP wird die Position der Aminosäure Gln19 nicht geändert, weil diese nicht zu den Reaktionskoordinaten gehört. Aus diesem Grund unterscheiden sich die Startgeometrien der beiden Ansätze grundsätzlich durch die Seitenkette des Glutamin Gln19 Aminosäurerests.

Die Diskrepanzen im Inhibitor-Teil, die durch den höchsten RMSD-Wert von 1,45 registriert wurden, wurden visuell durch die konformationellen Unterschiede der Substituenten der Erkennungseinheit des Inhibitors (N-Methyl-Piperazyl-, Homophenylalanyl-Gruppen) charakterisiert. Diese waren jedoch nicht bei den Reaktionskoordinaten beteiligt. Im Gegensatz dazu wurde die VS-Kopfgruppe direkt an der Reaktion durch ihre Reaktionskoordinaten involviert. Die Doppelbindung der VS-Kopfgruppe in der XP-Geometrie ist durch eine leichte Verzerrung charakterisiert. Die Geometrie des Eduktes ähnelt visuell der **Inh**-Geometrie des zugehörigen Reaktionsprofils. Diese Verzerrung pflanzt sich von der Startgeometrie (der kovalente Enzym-Inhibitor-Komplex) fort. In der NP-Geometrie ist die Doppelbindung der VS-Kopfgruppe nahezu planar. Aufgrund der flexiblen Erkennungseinheit (ab Atom C19 in Abbildung 5.33) kann die Doppelbindung der VS-Kopfgruppe in die aktive Tasche so eindringen, dass diese nahezu planar bleibt. Hierbei ord-

⁵Das sogenannte *flipping* der Aminosäurereste Gln und Asn ist bekannt und kann in den Docking-Experimenten^[209] manipuliert werden.

net sich das Wasserstoffatom H39 in Richtung des nukleophilen Atoms S des Cystein Aminosäurerestes ein. Solche vollkommen relaxierten Geometrien der nicht-kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplexe wurden in der XP-Berechnung nicht erzielt. Diese wurden stattdessen durch die sukzessive Verlängerung der Reaktionskoordinate $d(S-C1)$, die die Änderung in Position des Atoms H39 nicht beeinflusst, erhalten. Das Erzeugen der Startgeometrie des kovalenten E-I-Komplexes durch die MD-Simulation an der Kristallstruktur entspricht dem State of the Art und ergibt eine relaxierte Geometrie des kovalenten E-I-Komplexes. Ausgehend von kovalenter Situation ist jedoch die planare Doppelbindung mit dem H39 nahe zum S-Atom des Cystein Aminosäurerests nicht mehr möglich, da der Wechsel des Hybridisierungszustandes stattfindet. D.h. die Geometrie in der XP-Situation ist mittels der MD-Simulation für die kovalente Anordnung des E-I-Komplexes optimiert und ihre geometrische Charakteristiken pflanzen sich in der statischen QM/MM-Geometrieoptimierung fort. Die nicht-kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplexe der XP-Berechnung stellen somit nur die lokalen Minima mit der verzerrten Geometrie des Inhibitors auf der PES dar. Das Verlassen dieses lokalen Minimums ist durch die statische Natur der QM/MM-Berechnung erschwert, sodass der Endpunkt der XP-Berechnung nicht in dem möglichen tiefer liegenden Minimum endet. Die Informationen über den Reaktionspfad mittels des XP-Ansatzes sollten aus diesem Grund durch die Informationen aus dem NP-Ansatz vervollständigt werden.

Tabelle 5.8: RMSD-Werte der Geometrien der nicht-kovalenten E-I-Komplexe des Inhibitors K777-X mit X-EWG Fluor vor und nach der strukturellen Ausrichtung (NP: Geometrie Nr.1 in Abbildung 5.27 und XP: Geometrie Nr.10 in Abbildung 5.23).

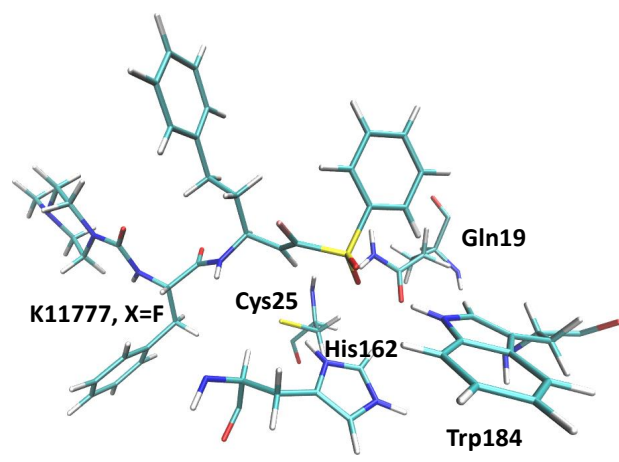
Messung Nr.	Objekt alle Atome oder nur Rückgrat	RMSD-Wert:	
		vor dem Alignment	nach dem Alignment
1	Protein: nur Rückgrat-Atome	0,94	0,93
2	Protein: alle Atome	1,46	1,45
3	Inhibitor: alle Atome	1,80	1,59
4	Histidin 162: alle Atome	0,32	0,05
5	Cystein 25: alle Atome	0,35	0,05
6	Cys25, His162: alle Atome	0,33	0,14
7	Inh, Cys25, His162: alle Atome	1,56	1,34
8	Gln19: alle Atome	0,98	0,74
9	Gln19: nur Rückgrat	0,34	0,04
10	Trp184: alle Atome	0,90	0,21
11	Trp184: nur Rückgrat	0,81	0,00

Die oben beschriebene planare Doppelbindung der VS-Kopfgruppe des Inhibi-

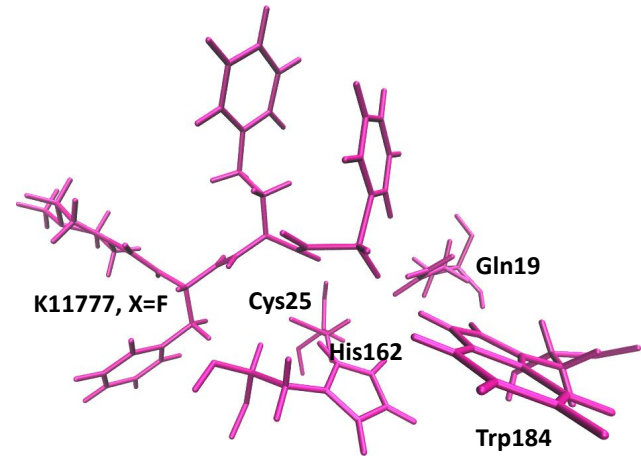
tors in dem NP-Komplex und ihre Wirkung auf die Erkennungseinheit wurden durch die Messungen der Diederwinkel bestätigt (Tabelle 5.9). Der Unterschied der Torsionswinkel C19-C18-C1-H39 der beiden Geometrien (XP und NP) liegt bei einem Wert von ca. 31° . Dies bewirkt auch die Unterschiede der Diederwinkel, die die benachbarten Atome umfassen. Visuell liegt das Wasserstoffatom H39 der NP-Geometrie in der Einflugschneise des Angriffs des Schwefelatoms von Cys25 Aminosäurerest an die Doppelbindung der VS-Kopfgruppe (Abbildungen 5.34, 5.35, 5.36). Um den nukleophilen Angriff zu ermöglichen, muss der VS-Teil des Inhibitors eine dem Produkt ähnliche Konformation annehmen, indem die Doppelbindung der VS-Kopfgruppe verzerrt ist. Solche aktive Konformationen werden in der Literatur oft als Biokonformationen genannt. Konformationen der Enzym-Inhibitor-Komplexe mit der verzerrten VS-Doppelbindung wurden ursprünglich durch die XP-Berechnungen festgestellt. Durch den Vergleich der Geometrien entlang der berechneten Reaktionsprofile (NP und XP) wurde deutlich, dass die **Int**-Geometrie der NP- mit der kovalenten Geometrie der XP-Berechnung eine sehr große Ähnlichkeit in Bezug auf die Verzerrung des VS-Molekülteils des Inhibitors aufweist. Die größte visuelle Ähnlichkeit wurde zwischen der Geometrie Nr. 4 der NP-Berechnung und der Geometrie des nicht-kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplexes festgestellt, die als Endpunkt der XP-Berechnung resultiert (Abbildung 5.36). An dieser Stelle lässt sich folgern, dass der XP-Ansatz die Edukte der Reaktion oder E··I-Komplexe in etwa höher liegenden Konformationen ergibt. Diese sind anhand der Parameter (Tabelle 5.9, Messungen Nr. 1, 3, 7, 10) den Geometrien Nr. 4 und **Int** ähnlich. Die **Int**-Geometrie wurde als Intermediat, z.B. die Biokonformation im Enzym, bereits diskutiert. Die Analyse mit Hilfe der Parametervergleiche bestätigen die Annahme, dass die **Int**-Geometrie Biokonformation der Additionsreaktion des Inhibitors K777-X an die aktive Seite des Enzyms Rhodocain darstellt. Die Anion-ähnliche Geometrie Nr. 7 (Messungen Nr. 9 und 12) ist dagegen die alternative, höher liegende intermediäre Geometrie, deren Ausbildung aus den Energieunterschieden ungünstig ist.

Tabelle 5.9: Charakteristische Diederwinkel und Bindungsparameter in den Geometrien der nicht-kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplexe der XP- und NP-Berechnungen.

Messung		Geometrien der				
		E···I-Komplexe aus		der Barrieren (NP)		
Nr.	Parameter	NP-Ansatz	XP-Ansatz	Nr. 7	Nr. 4	Int.
	Diederwinkel (in °)					
1	C19-C18-C1-H39	-149,21	-118,39	-71,77	-127,94	-87,14
2	H39-C1-C2-S1	15,42	16,96	3,25	9,99	1,31
3	C1-C2-S1-C3	91,38	75,90	48,06	79,99	59,90
4	C18-C1-C2-S1	-168,23	-152,59	-124,16	-165,34	-135,55
5	F-C2-C1-H39	-172,49	177,79	126,81	-177,13	153,89
6	F-C2-S1-O5	31,15	26,75	46,84	23,58	27,14
7	CB-CG-CD-N _{Gln19}	-89,11	-175,10	-88,19	-88,51	-87,16
	Bindung (in Å)					
8	S _{Cys25} -C1	3,32	3,05	1,98	3,07	2,25
9	C2-H _{His162}	3,85	3,63	1,89	3,47	2,24
10	S _{Cys25} -H _{His162}	1,97	2,07	2,90	2,08	2,86
	H-Bindung (in Å)					
11	O ₄ -H1 _{Gln19}	2,00	1,83	1,90	1,98	1,90
12	O ₄ -H3 _{Trp184}	2,09	1,98	1,88	2,05	1,92
	Winkel (in °)					
13	C1-C2-H _{His162}	70,90	73,48	109,71	79,19	99,93
	„Improper“ (in °)					
14	Gln19: C-N-H1-H2	163,06	173,89	148,12	159,00	150,49



NP: Cyan-and-color



XP: Magenta

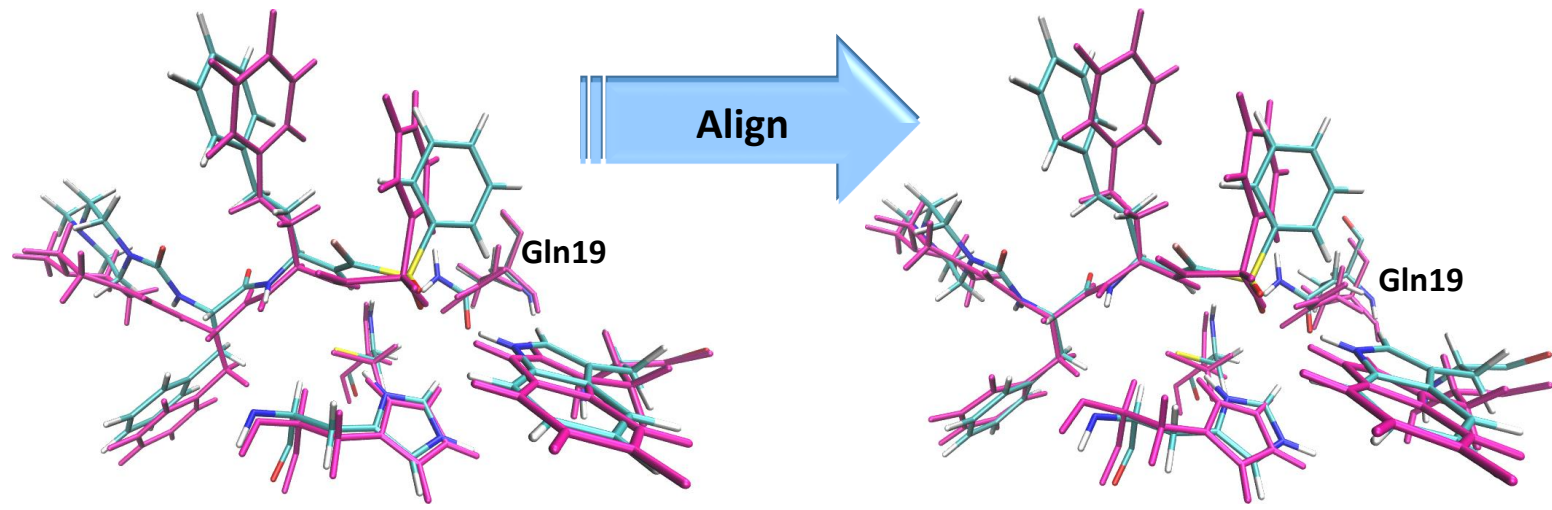


Abbildung 5.34: Strukturelle Überlagerung der Geometrien durch die RMSD-Matrix. Geometrien der nicht-kovalenten $E \cdots I$ -Komplexe für Inhibitor K777-X mit $X=F$ berechnet mit den Ansätzen NP und XP.

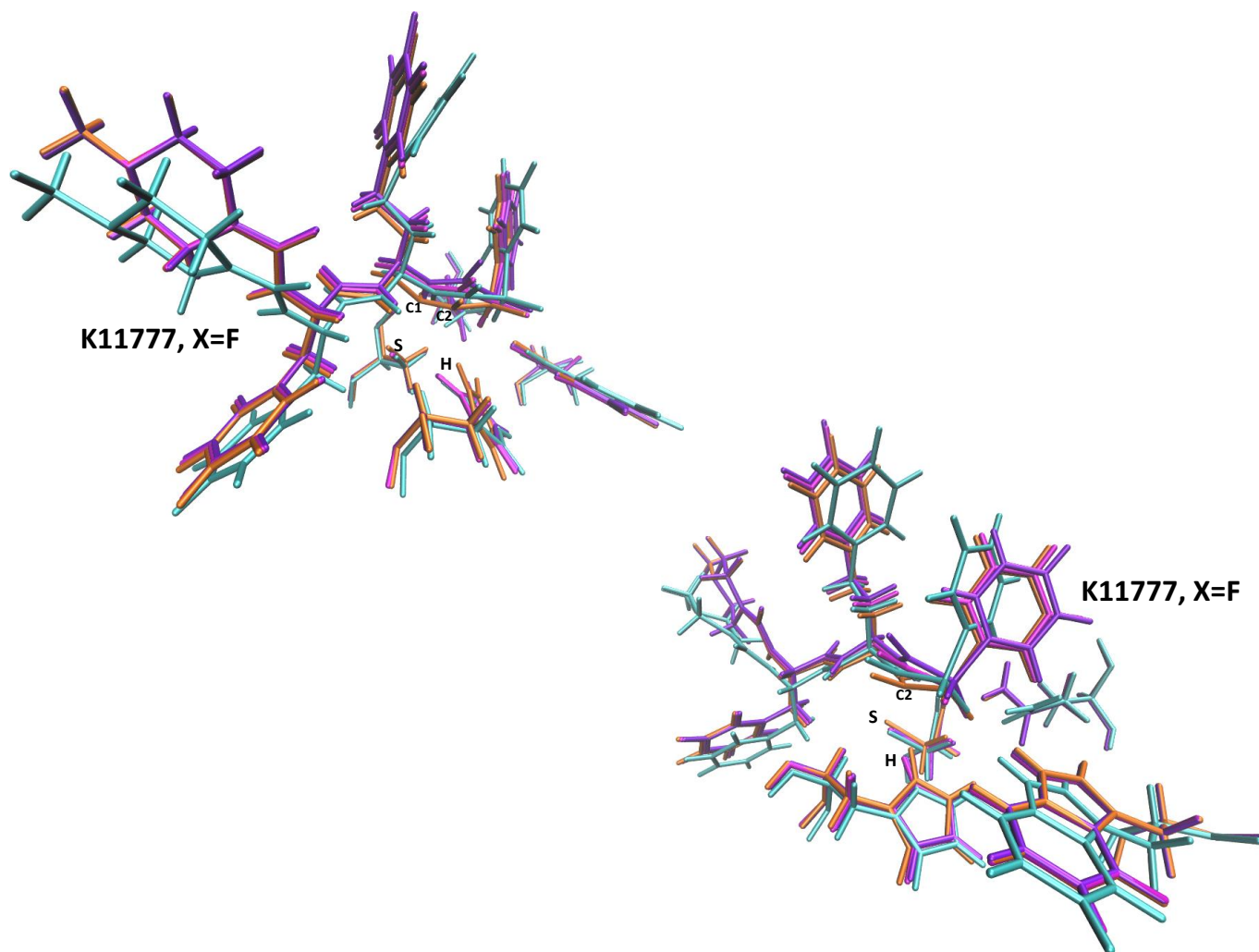
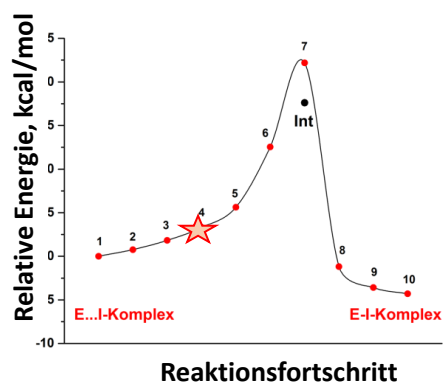
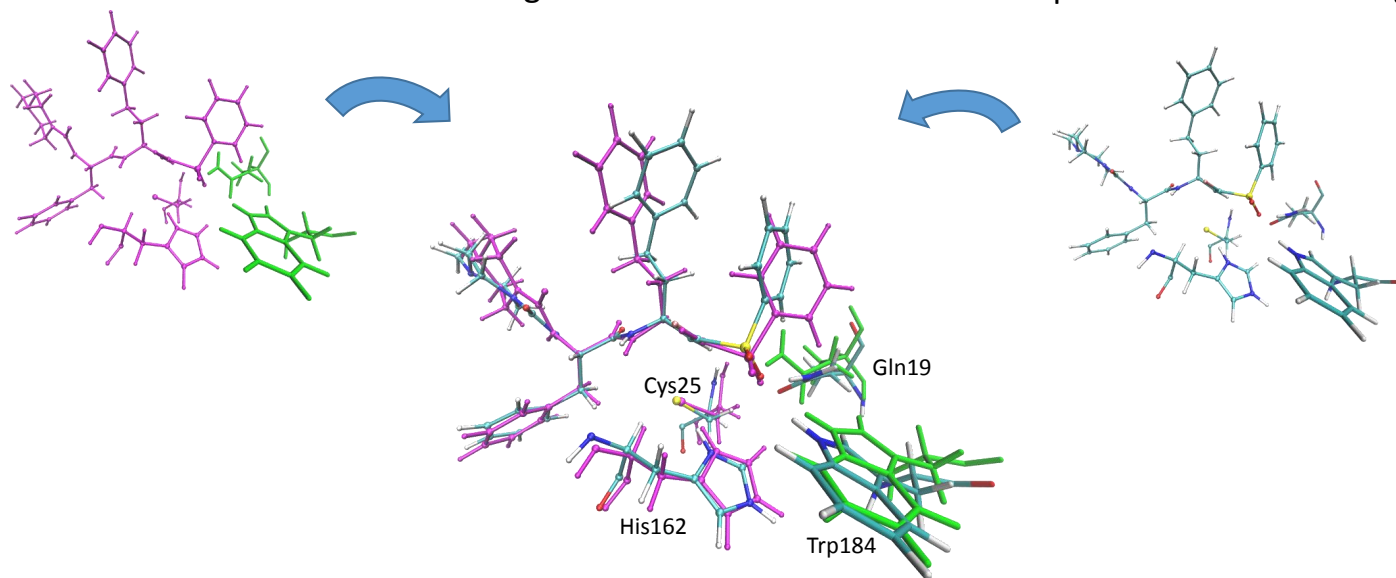


Abbildung 5.35: Geometrien der nicht-kovalenten $E \cdots I$ -Komplexe für Inhibitor K777-X mit $X=F$ berechnet mit den Ansätzen NP (links oben) und XP (rechts unten). Im Fokus steht der VS-Teil, speziell die Doppelbindung $C1=C2$ des Inhibitors und die katalytischen Aminosäurereste mit den Atomen S und H. Strukturelle Überlagerung der Geometrien durch die RMSD-Matrix. Violett: $E \cdots I$ -Komplex mit NP-Ansatz, Cyan: $E \cdots I$ -Komplex mit XP-Ansatz, Orange: Geometrie **Int**, Magenta: Geometrie Nr. 4 der NP-Berechnung mit Hilfe von NEB-Dimer-Methode.

Geometrie Nr. 4 der NP-Berechnung

E...I-Komplex der XP-Berechnung



Align

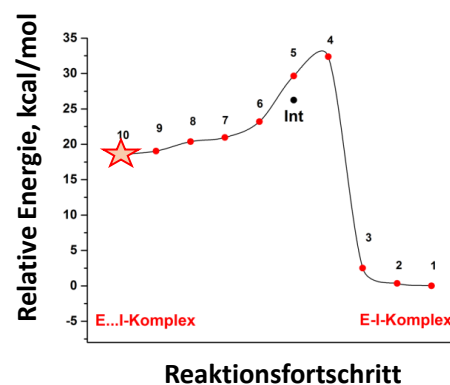


Abbildung 5.36: Geometrien der nicht-kovalenten E...I-Komplexe für Inhibitor K777-X mit X=F berechnet mit den Ansätzen NP (unten links) und XP (unten rechts).

6.1 Berechnungen in Lösung

6.1.1 Zusätzliche QM-Berechnungen zum System GM II in wässriger Lösung (COSMO)

Die QM-Bereiche der Geometrien des Edukts (nicht-kovalenter Enzym-Inhibitor-Komplex) und des Produkts (kovalenter Enzym-Inhibitor-Komplex) wurden in wässriger Umgebung mit COSMO^[158] optimiert. Die oktaedrische Umgebung des Zink-Dikations des nicht-kovalenten Komplexes ist ohne die enzymatische Umgebung nicht stabil und konvergiert in Lösung zu der Geometrie mit der perfekten tetraedrischen Anordnung um das Zink-Dikation (Abbildung 6.1). Durch die Optimierung des kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplexes in Lösung erhält man die verzerrte Pyramide durch Verlust der H-Bindung zwischen dem Zink-Ion und dem Ester-Addukt der Reaktion (Abbildung 6.2).



Abbildung 6.1: *QM-Geometrieoptimierung in Lösung des QM-Teils des nicht-kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplexes (lokales Minimum der QM/MM-Optimierung). Links: Input: oktaedrische Umgebung, Rechts: Ergebnis: tetraedrische Umgebung des Zink Ions.*



Abbildung 6.2: *Quantenmechanische Geometrieoptimierung in Lösung des QM-Teils des kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplexes (lokales Minimum der QM/MM-Optimierung). Links: Input: oktaedrische Umgebung, Rechts: Ergebnis: pyramidale Umgebung des Zink-Ions.*

6.1.2 Modell-Berechnungen zum System Rhodesain (VS-Liganden) mit zwei expliziten Wassermolekülen (COSMO)

Im Folgenden werden die ergänzende Diagramme zur Untersuchung am System Rhodesain dargestellt. Diese zeigen die relativen Reaktionsenergien der Produktbildung (**A'**, **B**, **C'**, **C''**, etc.) mit der Berücksichtigung der H-Brücken zu den zwei expliziten Wassermolekülen (COSMO^[158]). Die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Wassermolekülen und den entsprechenden Atomen der Modell-Moleküle sind mit den dreifachen Punkten skizziert.

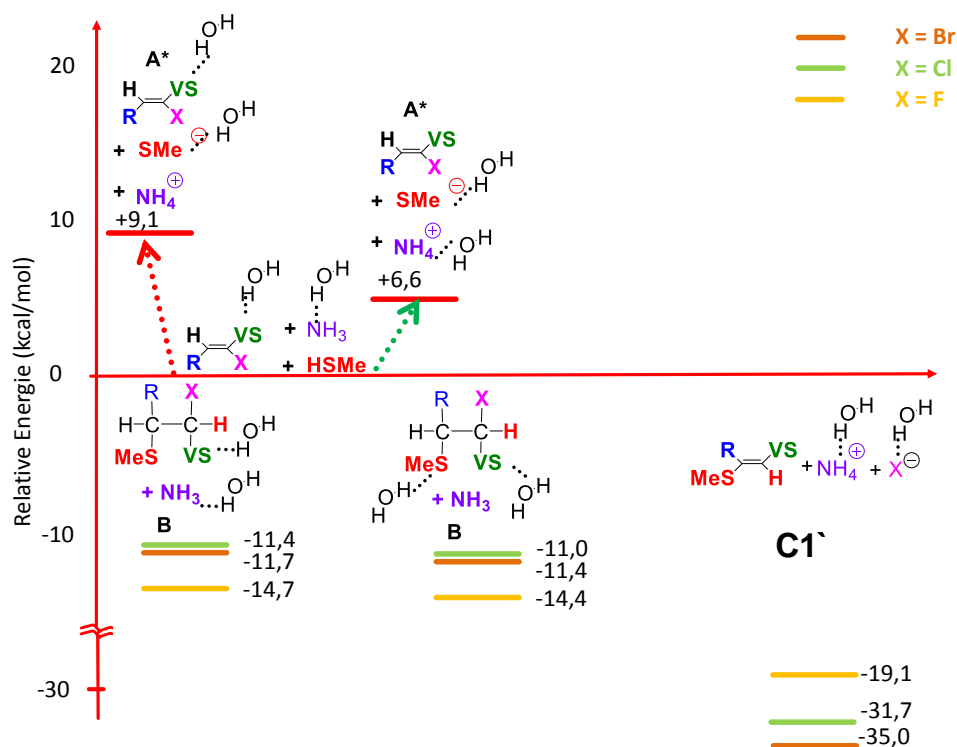


Abbildung 6.3: Berechnung der Reaktionsenergien in Lösung mit zwei expliziten Wassermolekülen.

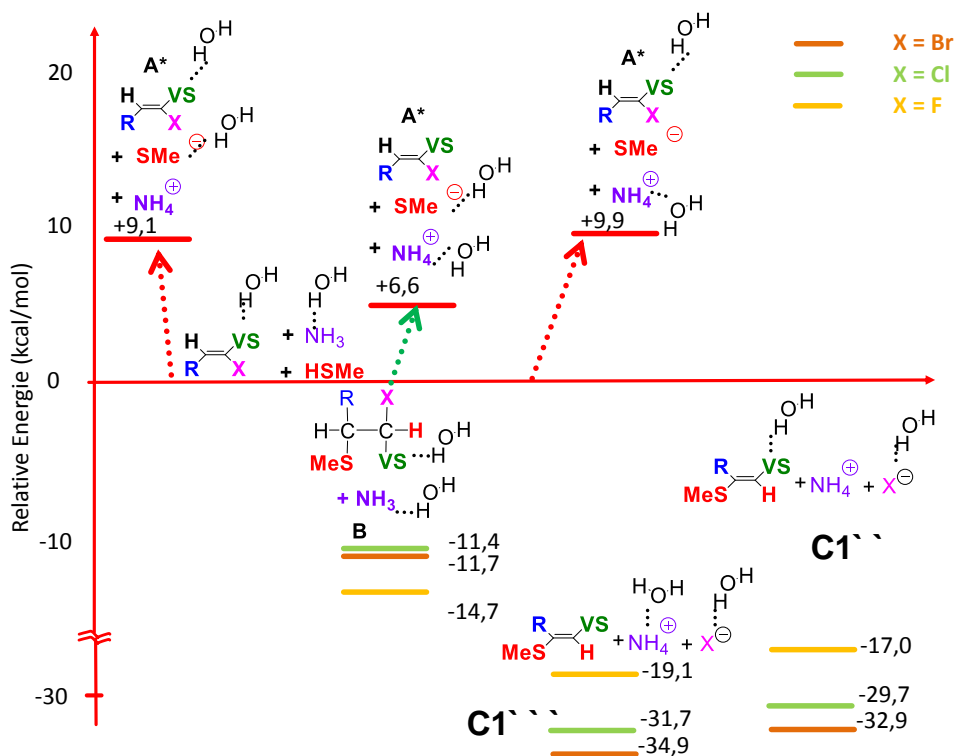


Abbildung 6.4: Berechnung der Reaktionsenergien in Lösung mit zwei Wassermolekülen.

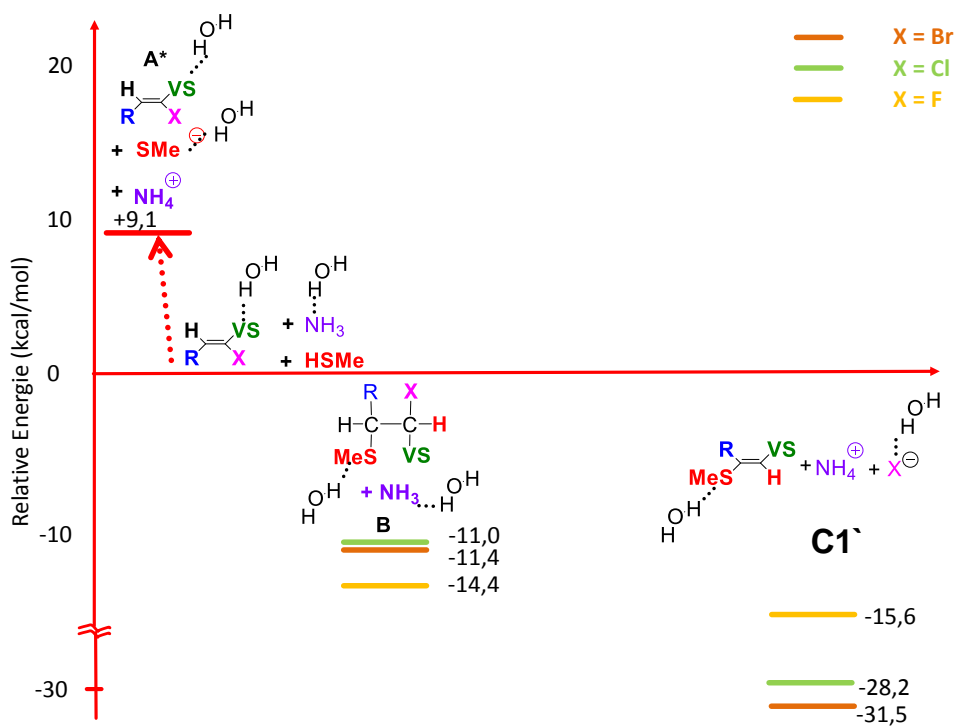


Abbildung 6.5: Berechnung der Reaktionsenergien in Lösung mit zwei Wassermolekülen.

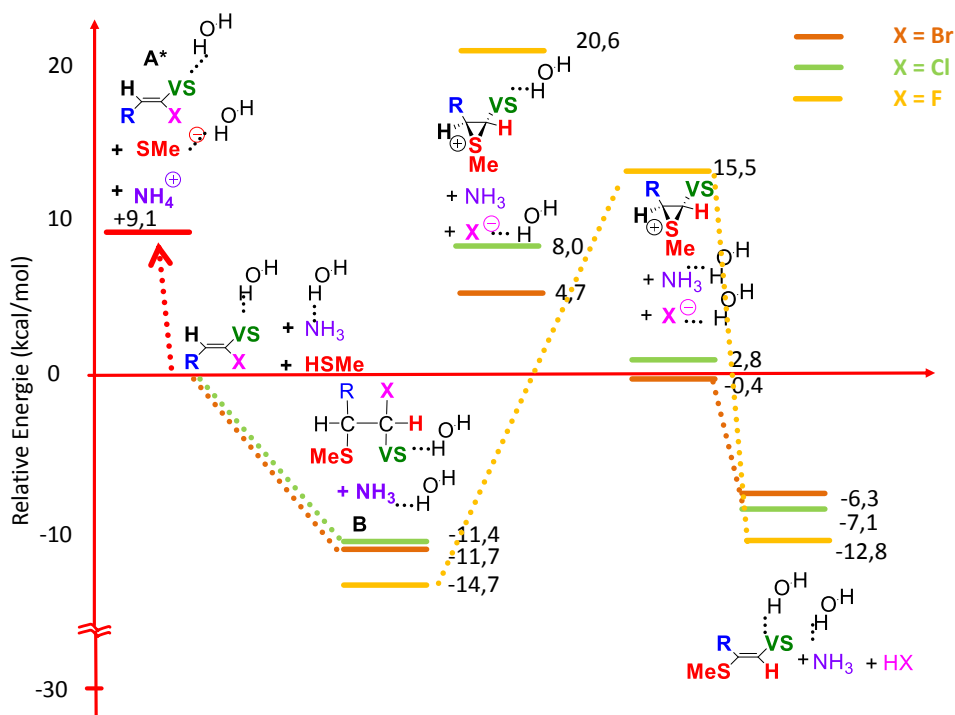


Abbildung 6.6: Berechnung der Reaktionsenergien in Lösung mit zwei Wassermolekülen.

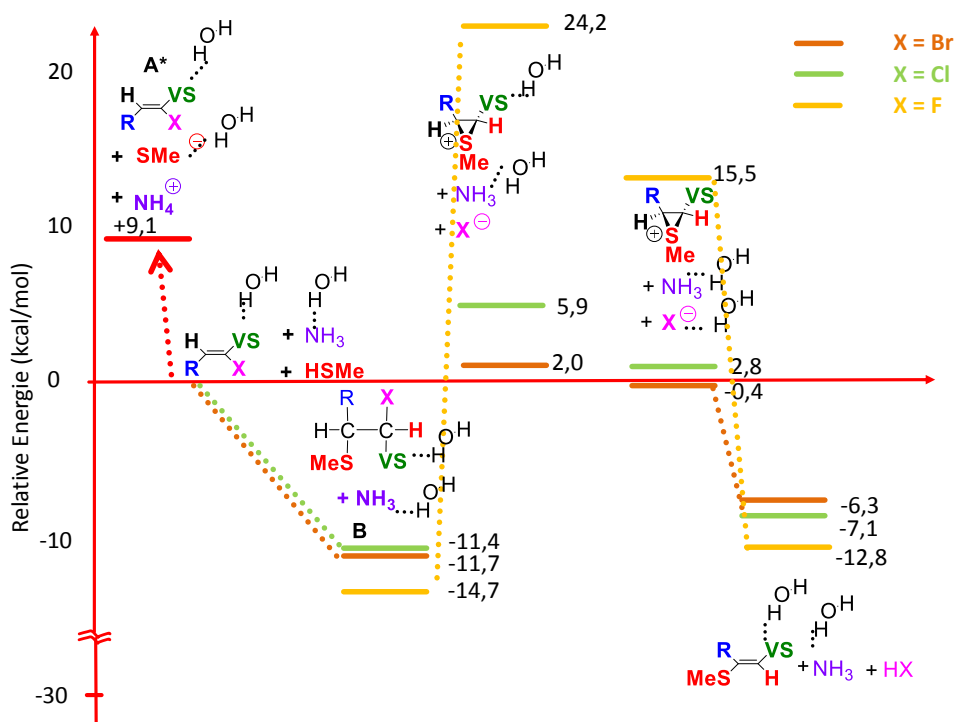


Abbildung 6.7: Berechnung der Reaktionsenergien in Lösung mit zwei Wassermolekülen.

6.2 Berechnungen im Enzym: Listings

6.2.1 AMBER^{[41][42]}-Skript zur Anwendung des harmonischen Potentials mit Hilfe einer Kraftkonstante

Listing 6.1: Definition der Atompaae, welche die Anwendung der *rst*-Option^[196] erfahren und somit zu den definierten Atomabständen (in Å) im harmonischen Potential (rk2 und rk3 in kcal/mol · Å) forciert werden. Zwischen den Werten r1 und r2 wirkt die Kraftkonstante rk2, zwischen r3 und r4 die Kraftkonstante rk3.

```
&rst iat = 2859, 16188,
  r1=2.5,r2=3.5,r3=3.5,r4=4.5,rk2=200.00,rk3=200.00, /
...
&rst iat = 16216,1024,
  r1=0.3,r2=1.3,r3=1.3,r4=2.3,rk2=200.00,rk3=200.00, /
```

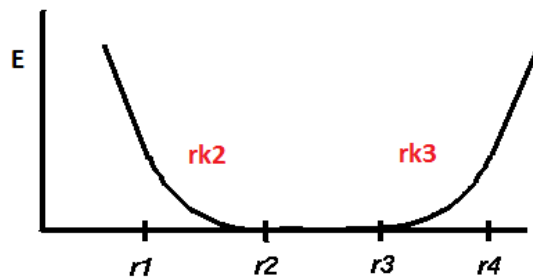


Abbildung 6.8: Schematische Darstellung der *rst*-Option^[196] in AMBER^{[41][42]}.

6.2.2 VMD-Skript zur Reduktion der Wassersphäre

Listing 6.2: Definition für die Reduktion der Wassersphäre (VMD^[87]-Skript). Hier: Die Wassermoleküle im Radius von 24,0 Å um das Atom mit der Nummer 375 wurden als ein ganzes *residue* auserwählt.

```
mol new frame_496.pdb
```

```
set qmmm_cutted [atomselect top "{water and same residue as name O \
and within 24 of index 375} or protein or {not protein and not water}"]
$qmmm_cutted writepdb cut_qmmm.pdb
quit
```

6.2.3 CHEMSHELL^[43]-Skript zur Berechnung des Reaktionsprofils als *relaxed scan*

Listing 6.3: Die Schleife zur Pre-Optimierung von Geometrien mit definierten Bindungsabständen *begin*=2.4 und *end*=3.3 mit Hilfe eines harmonischen Potentials (*restraints*-Option^[210] des DL-FIND-Moduls^[21] (eine *relaxed-scan*-Berechnung) und den anschließenden QM/MM-GO und Einzelpunkt-Berechnung der Energie (QM/MM-SP).

```

...
set qm_theory turbomole

#####

# Bohr conversion factor
set bohr 1.889716

# Input parameters in Angstrom
set begin 2.40
set end 3.30
set step 0.10

#Definitions
set begin2 [expr $begin*$bohr]
set end2 [expr $end*$bohr]
set step2 [expr $step*$bohr]

#exec cp beg.c restraintscoord.c
exec cp ${sys_name_id}.c restr.c

# loop over the potential energy surface
for {set bond1 $begin2 } {$bond1 < $end2} {
    set bond1 [ expr $bond1 + $step2 ] } {
    set angbon [expr $bond1/$bohr]

# DL-FIND OPTIMIZER restraint-Function #
dl-find coords=restr.c active_atoms= [ list 2860 16188 ] \
    theory=restraint : [ list \
        restraints= [ list [ list bond 2860 16188 $bon 3.0 ] ] ] \

```



```

result=moved.c

#####
puts stdout " ACTUAL RUN run is OPT using $angbon COORDINATE "
puts stdout "###"
dl-find coords= ${dir}/moved.c \
  coordinates=hdlc \
  result=resultn$angbon.c \
  maxcycle=1000 \
  tolerance=0.00045 \
  active_atoms= $act \
  residues= $residues \
  constraints= {{bond 2860 16188}} \
  theory=hybrid : [ list \
    coupling= $embedding_scheme \
    qm_theory= $qm_theory : [ list ri_memory=800 \
      hamiltonian= $qm_ham \
      maxcyc=500 \
      charge= $qm_ch \
      basis= $qm_basis ] \
    qm_region= $qmatoms \
    debug=no \
    mm_theory=dl_poly : [ list \
      list_option=none \
      conn=moved.c \
      mm_defs=$amber_prmtop \
      exact_srf=yes \
      mxlist=16000 \
      cutoff=1000 \
      scale14 = { 1.2 2.0 } \
      amber_prmtop_file=$amber_prmtop ] ]

exec cp resultn$angbon.c restr.c

# tar and zip the important TURBOMOLE files
exec tar -cf result$angbon.tar coord control basis mos energy gradient
exec gzip result$angbon.tar

puts stdout "### ACTUAL RUN run is SP using $angbon COORDINATE ###"

energy coords=resultn$angbon.c \

```

```

theory=hybrid : [ list \
    coupling= $embedding_scheme \
    qm_theory= $qm_theory : [ list \
        hamiltonian= $sp_ham \
        maxcyc=500 \
        charge= $qm_ch \
        basis= $qm_basis ] \
    qm_region= $qmatoms \
    debug=no \
    mm_theory=dl_poly : [ list \
        list_option=none \
        conn=resultn$angbon.c \
        mm_defs=$amber_prmtop \
        exact_srf=yes \
        mxlist=16000 \
        cutoff=1000 \
        scale14 = { 1.2 2.0 } \
        amber_prmtop_file=$amber_prmtop ] ]\
energy=e
}
delete_object hybrid.${qm_theory}.coords

close $control_input_settings
times

return Ok

```

Listing 6.4: Auszug aus der *relaxed scan*^[210]-Schleife zur Pre-Optimierung von Geometrien mit definierten Bindungsabständen *begin*=2.4 und *end*=1.5 mit Hilfe eines harmonischen Potentials (*restraints*-Option^[211] des DL-FIND-Moduls^[21] von CHEMSHELL^[180]) und einer anschließenden QM/MM-Geometrieoptimierung. Die Optimierung und Energieberechnung ist analog dem Code in Listing 6.3.

```

...
# Input parameters in Angstrom
set begin 2.40
set end 1.50
set step 0.10
...
# loop over the potential energy surface
for {set bond1 $begin2 } {$bond1 > $end2} {

```

```

set bond1 [ expr $bond1 - $step2 ] }
{
    set angbon [ expr $bond1/$bohr]

```

...

6.2.4 CHEMSHELL^[43]-Skripte zur Berechnung des MEP mit Hilfe des CI-NEB-Dimer^{[15][14][23][24]}-Ansatzes

Listing 6.5: CHEMSHELL-Skript^{[43][21]} zur Berechnung des Reaktionspfades (Geometrien neb_1.c bis neb_6.c) zwischen den zwei Geometrien (react.c und prod.c) und anschließend der *climbing image*-(CI)-Geometrie resultneb.c (CI-NEB-Methode).

...

```

dl-find neb=free nimage=7 nebk=0.01 list_option=full \
    coords=react.c coords2=prod.c theory=hybrid : [ list $args ] \
    active_atoms= $act residues= $residues \
result=resultneb.c result2=resultneb_ts_mode.c \
coordinates= hdlc \
    maxcycle=1000 maxene=3000 \
    tolerance=0.0045 maxstep=0.9 \
    ...
set vars {1 2 3 4 5 6 }
foreach i $vars {
write_pdb file= neb_${i}.pdb coords=neb_${i}.c
}

```

Listing 6.6: CHEMSHELL-Skript^{[43][21]} zur Berechnung des Übergangszustandes (resultdimer.c) eines Reaktionsprofils ausgehend von der berechneten CI-Geometrie (resultneb.c) mit Hilfe der Dimer-Methode.

...

```

dl-find dimer=true delta=0.02 list_option=full \
    coords=resultneb.c coords2=resultneb_ts_mode.c \
    theory=hybrid : [ list $args_TS ] \
active_atoms= $act residues= $residues \
result=resultdimer.c result2=resultdimer_ts_mode.c \

```

```

coordinates= hdlc \
maxcycle=10000 maxrot=40 tolrot=2. \
maxene=3000 tolerance=0.00045 \
...

```

Listing 6.7: CHEMSHELL-Skript^{[43][21]} zur Optimierung der Dimer-Geometrie zum ÜZ (Start mit den Atomkoordinaten resultdimer.c) mit dem PRFO-Algorithmus^[21].

```

...
dl-find coords=resultdimer.c \
        coordinates=hdlc \
        optimizer=prfo \
        result=result-TS.c \
        maxcycle=1000 \
        tolerance=0.00045 \
        active_atoms= $act \
        residues= $residues \
        theory=hybrid : [ list \
...

```

Listing 6.8: CHEMSHELL-Skript^[43] zur Berechnung der Schwingungsfrequenzen der Geometrie (Atomkoordinaten result-TS.c), die ein Kandidat zum Übergangszustand des Reaktionspfades darstellt, mit Hilfe des FORCE^[198]-Moduls.

```

...
force formula=twopoint hessian=h \
        coords=result-TS.c \
        active_atoms= $qmatoms \
        theory=hybrid : [ list \
            coupling= $embedding_scheme \
            qm_theory= $qm_theory : [ list ri_memory=500 \
                hamiltonian= $qm_ham \
                maxcyc=200 \
                charge= $qm_ch \
                basis= $qm_basis ] \
        qm_region= $qmatoms debug=no \
        mm_theory=dl_poly : [ list \
            list_option=none \
            conn=result-TS.c \
            debug=no \
            exact_srf=yes \
            cutoff=1000 \

```

```
mxexcl=2000 \
debug_memory=no \
scale14 = { 1.2 2.0 } \
mm_defs=$amber_prmtop \
amber_prmtop_file=$amber_prmtop ] ]

# diagonalise the hessian and output eigenvecs and eigenvals
diagonalise_matrix matrix=h evecs=hessian.evecs evals=hessian.evals

...

return Ok
```

6.2.5 Test-Standard-PES der Inhibitionsreaktion der Mannosidase GM II durch den O,O-Acetal-Inhibitor

Die Standard-PES zeigt die überschätzten Werte der Barriere des nukleophilen Angriffs von ca. 200 kcal/mol.

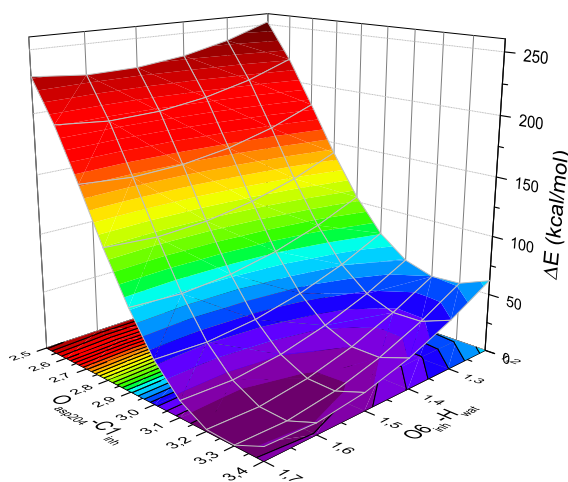


Abbildung 6.9: QM/MM-PES für die Inhibitionsreaktion berechnet ohne die explizite Berücksichtigung des Protontransfers durch die Wassermoleküle.

6.2.6 Details zu den Dispersionseffekten im Enzym-Inhibitor-Komplex der GM II mit dem N,O-Acetal-Inhibitor

Die Geometrieoptimierungen der NEB-Berechnung der E-I-Komplexe der Mannosidase GM II mit dem Inhibitor Nr. **7** zeigen Konvergenzfehler, welche bei den analogen Berechnungen mit dem Inhibitor Nr. **1** nicht zustande kamen. Diese können durch die Erhöhung der Azidität der OH-Gruppe des C3-Atoms des N,O-Acetal Inhibitors, die durch sehr nahe liegende Aspartat Asp472 Aminosäurerest (Abbildung 6.10) in der Nähe des aktiven Zentrums, hervorgerufen werden. Die konvergierte Geometrie, mit dem Rest der Aminosäure Asp472 in dem QM-Bereich der Berechnung im Enzym, ist in der Abbildung 6.10 gezeigt. Der Aspartat Asp472 Aminosäurerest erscheint dadurch basischer als die OH-Gruppe des Inhibitors und abstrahiert das Proton, wenn die Korrekturen der Dispersionseffekte nicht berücksichtigt sind. Unter Berücksichtigung der Dispersionseffekte konnten die Berechnungen im Enzym zur Entwicklung von kovalent-reversiblen Inhibitoren der Mannosidase GM II mit dem konsistent gewählten QM-Bereich durchgeführt werden.

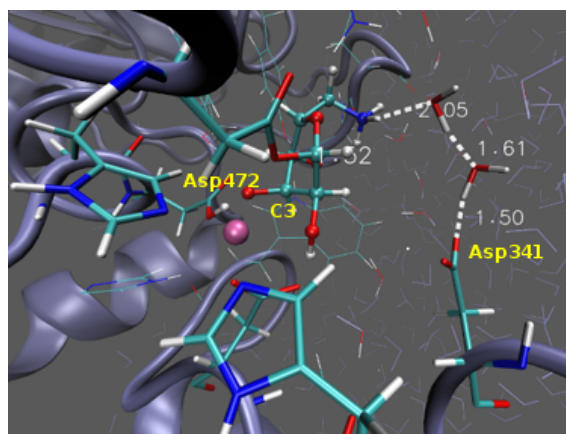


Abbildung 6.10: Erhöhte Polarisierung der OH-Gruppe des C3-Atoms des Inhibitors Nr. **7** im Enzym-Inhibitor-Komplex der Mannosidase GM II durch den Aspartat Asp472 Aminosäurerest.

6.3 Berechnungen im Enzym: NEB-Geometrien

Im Folgenden werden die charakteristischen Bindungsabstände der Geometrien von Enzym-Inhibitor-Komplexen Rhodensain-K777-X, die durch die NEB-QM/MM-Berechnungen resultierten, in tabellarischer Form dargestellt.

Tabelle 6.1: Charakteristische Bindungsabstände der Geometrien von Enzym-Inhibitor-Komplexen Rhodensain-K1177-X ($X=H$), entlang des MEP, die in der Abbildung 5.19 graphisch dargestellt sind. QM-Berechnungen wurden mit RI^{[33][34]}-BLYP^{[36][37]}/def-TZVP^{[38][39]} durchgeführt.

Geom. Nr.	Energie		Bindungsabstände in Å			
	absolut (a.u.)	relativ (kcal/mol)	d(S-C1)	d(C2-H)	d(N-H)	d(S-H)
1	-1842,5527	0,0	1,90	1,10	2,17	-
2	-1842,5519	0,48	1,93	1,10	2,15	-
3	-1842,5492	2,17	1,94	1,11	2,09	-
4	-1842,5281	15,45	1,97	1,36	1,58	-
5	-1842,5155	23,35	2,13	2,22	1,05	2,91
Int	-1842,5172	22,26	2,37	2,51	1,03	2,65
6	-1842,5157	23,22	2,39	2,59	1,03	2,64
7	-1842,5184	21,54	2,55	2,88	1,05	2,38
8	-1842,5200	20,53	2,64	3,02	1,05	2,28
9	-1842,5212	19,77	2,72	3,12	1,06	2,19
10	-1842,5218	19,38	2,83	3,26	1,08	2,10

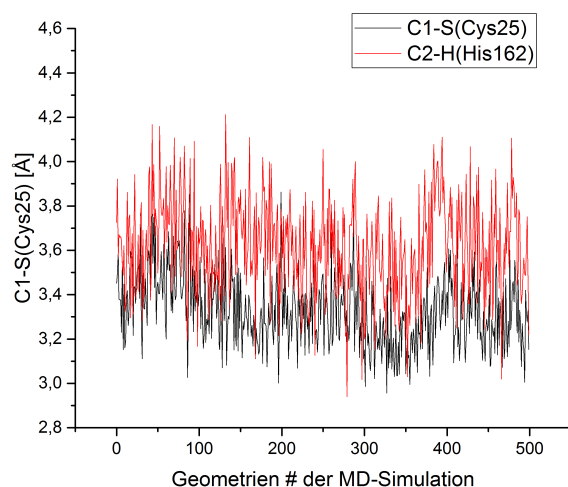


Abbildung 6.11: Bindungsabstände $d(S-C1)$ (blau) und $d(C2-H)$ (rot) im Verlauf der MD-Simulation des nicht-kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplexes des Inhibitors K11777 ($X=H$).

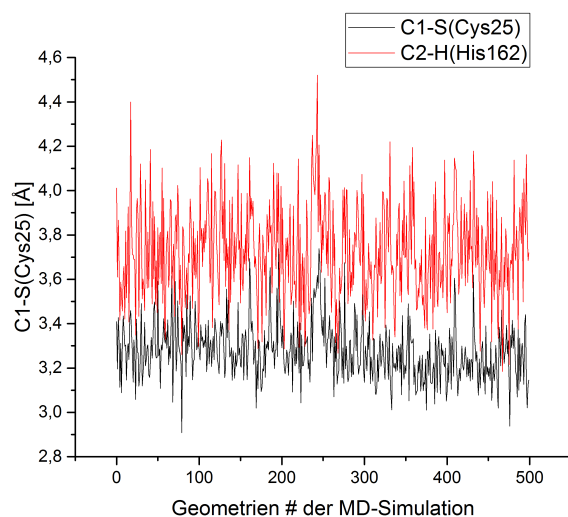


Abbildung 6.12: Bindungsabstände $d(S-C1)$ (blau) und $d(C2-H)$ (rot) im Verlauf der MD-Simulation des nicht-kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplexes des Inhibitors K777-X ($X=F$).

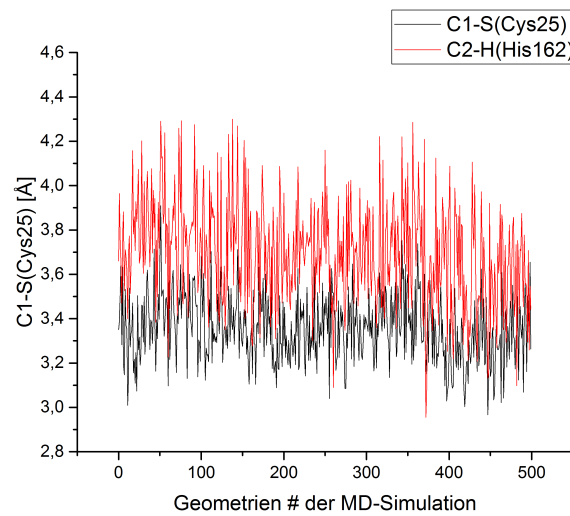


Abbildung 6.13: Bindungsabstände $d(S-C1)$ (blau) und $d(C2-H)$ (rot) im Verlauf der MD-Simulation des nicht-kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplexes des Inhibitors K777-X ($X=Br$).

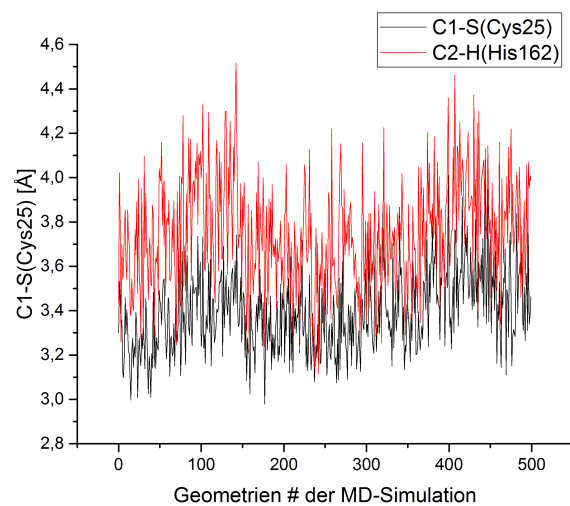


Abbildung 6.14: Bindungsabstände $d(S-C1)$ (blau) und $d(C2-H)$ (rot) im Verlauf der MD-Simulation des nicht-kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplexes des Inhibitors K777-X ($X=Cl$).

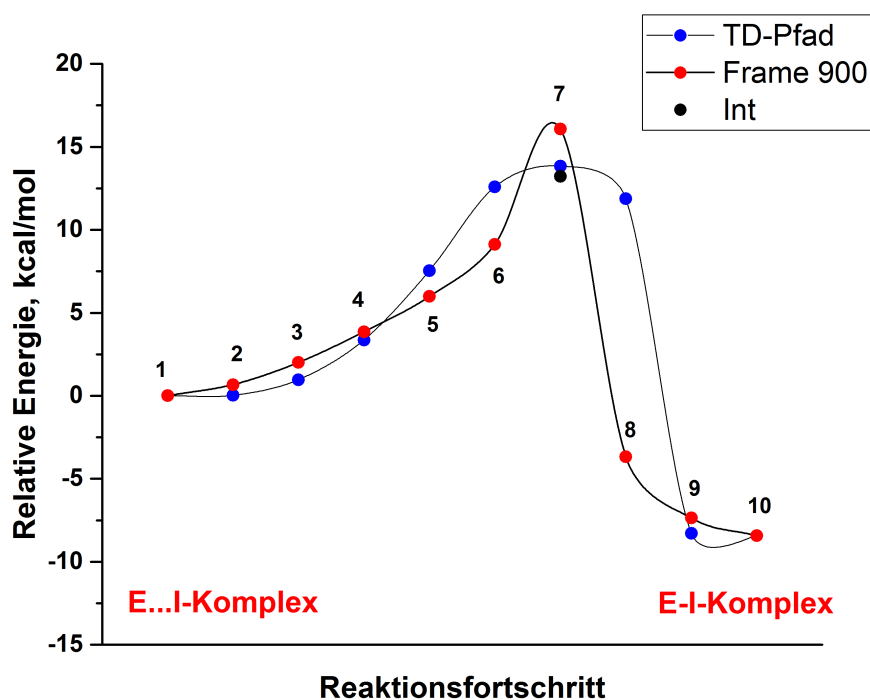


Abbildung 6.15: MEP der Inhibitionsreaktion von Rhodesain durch den Inhibitor K11777 ($X=H$), berechnet mit Hilfe der $CI^{[15]}$ - $NEB^{[14]}$ -Methode (Frame 900). Berechnung des E-I-K aus $E \cdots I$ -K (TD-Pfad). Relative energetische Lage des Intermediats (Int), ermittelt mit Hilfe des $Dimer^{[24]}$ -Algorithmus. Theorielevel der QM-Berechnungen: $B3LYP^{[135][134]}/cc-pVDZ^{[205]}$.

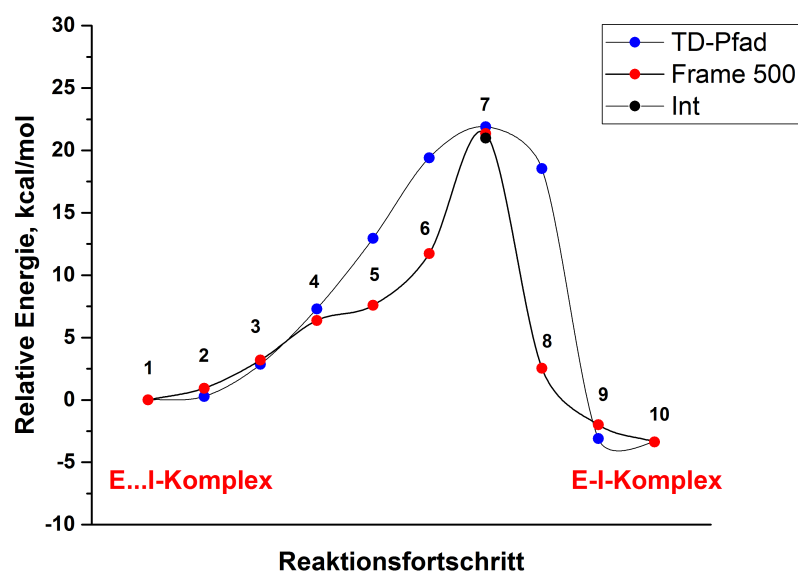
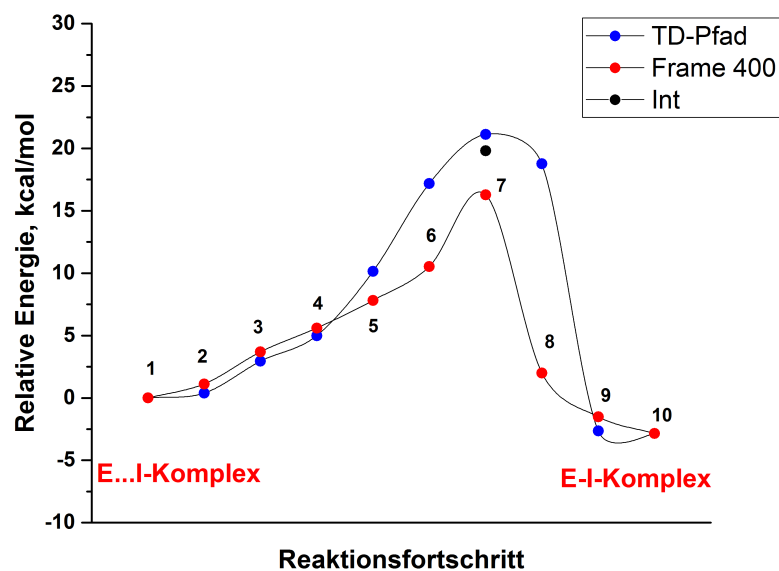


Abbildung 6.16: MEP der Inhibitionsreaktion von Rhodesain durch den Inhibitor K777-X mit $X=F$. MEP wurde mit Hilfe der $CI^{[15]}$ - $NEB^{[14]}$ -Methode berechnet. Berechnung des E-I-K aus $E \cdots I$ -K (**TD-Pfad** in der Legende). Startgeometrie siehe Legende (Frame 400, Frame 500). Relative energetische Lage des Intermediats (**Int** in der Legende), berechnet mit Hilfe des Dimer-Algorithmus. Theorielevel der QM-Berechnungen: $B3LYP^{[135][134]}/cc-pVDZ^{[205]}$.

Tabelle 6.2: Charakteristische Bindungsabstände der Geometrien von Enzym-Inhibitor-Komplexen Rhodocain-K777-X (X=H) entlang des MEP, die in der Abbildung 5.22 graphisch dargestellt sind. QM-Berechnungen wurden mit B3LYP^{[36][37][134][135][131]}/def-TZVP^{[38][39]} durchgeführt.

Geom. Nr.	Energie		Bindungsabstände in Å			
	absolut (a.u.)	relativ (kcal/mol)	d(S-C1)	d(C2-H)	d(N-H)	d(S-H)
1	-1842,2373	0,0	1,88	1,10	2,19	-
2	-1842,2356	1,1	1,91	1,09	2,17	-
3	-1842,2322	3,2	1,92	1,10	2,12	-
4	-1842,1966	25,6	1,97	1,44	1,57	-
5	-1842,1916	26,2	2,10	2,28	1,03	2,81
Int	-1842,1984	24,4	2,33	2,59	1,02	2,51
6	-1842,1956	26,2	2,47	2,76	1,03	2,48
7	-1842,1995	23,7	2,67	3,02	1,05	2,28
8	-1842,2012	22,7	2,77	3,16	1,06	2,18
9	-1842,2015	22,5	2,86	3,26	1,06	2,15
10	-1842,2012	22,7	2,98	3,40	1,07	2,07

Tabelle 6.3: Charakteristische Bindungsabstände der Geometrien von Enzym-Inhibitor-Komplexen (K777-X, X=F) entlang des MEP, die in der Abbildung 5.23 graphisch dargestellt sind. QM-Berechnungen wurden mit B3LYP^{[36][37][134][135][131]}/def-TZVP^{[38][39]} durchgeführt.

Geom. Nr.	Energie		Bindungsabstände in Å			
	absolut (a.u.)	relativ (kcal/mol)	d(S-C1)	d(C2-H)	d(N-H)	d(S-H)
1	-1941,4657	0,0	1,90	1,10	2,21	-
2	-1941,4652	0,3	1,91	1,09	2,14	-
3	-1941,4617	2,5	1,95	1,19	1,89	-
4	-1941,4142	32,4	2,01	1,63	1,41	2,81
5	-1941,4185	29,7	2,18	2,14	1,08	2,88
Int	-1941,4239	26,3	2,32	2,44	1,03	2,67
6	-1941,4288	23,2	2,44	2,53	1,02	2,77
7	-1941,4324	21,0	2,64	2,85	1,03	2,53
8	-1941,4333	20,4	2,81	3,18	1,05	2,29
9	-1941,4354	19,0	2,96	3,44	1,07	2,14
10	-1941,4362	18,6	3,05	3,62	1,07	2,07

Tabelle 6.4: Charakteristische Bindungsabstände der Geometrien von Enzym-Inhibitor-Komplexen (Inhibitor K11777, X=H) entlang des MEP, die in der Abbildung 5.25 graphisch dargestellt sind.

Geom. Nr.	Energie		Bindungsabstände in Å			
	absolut (a.u.)	relativ (kcal/mol)	d(S-C1)	d(C2-H)	d(N-H)	d(S-H)
1	-1828,2122	0,0	3,45	4,14	1,08	2,03
2	-1828,2105	1,1	3,32	3,96	1,07	2,10
3	-1828,2075	2,9	3,24	3,81	1,07	2,14
4	-1828,2035	5,4	3,15	3,65	1,07	2,19
5	-1828,2045	4,8	3,08	3,48	1,07	2,19
6	-1828,2003	7,5	2,85	3,12	1,04	2,37
7	-1828,1918	12,8	2,38	2,55	1,03	2,88
8	-1828,2149	-1,7	1,93	1,14	2,06	-
9	-1828,2210	-5,5	1,90	1,11	2,40	-
10	-1828,2234	-7,0	1,89	1,11	2,36	-
Int	-1828,1954	10,5	2,27	2,50	1,03	2,96

Tabelle 6.5: Charakteristische Bindungsabstände der Geometrien von Enzym-Inhibitor-Komplexen (Inhibitor K777-X mit X=F) entlang des MEP, die in der Abbildung 5.27 graphisch dargestellt sind. Geometrie 7 ist eine anionische Geometrie des E-I-Komplexes.

Geom. Nr.	Energie		Bindungsabstände in Å			
	absolut (a.u.)	relativ (kcal/mol)	d(S-C1)	d(C2-H)	d(N-H)	d(S-H)
1	-1927,2596	0,0	3,32	3,85	1,10	1,97
2	-1927,2584	0,8	3,21	3,70	1,08	2,04
3	-1927,2567	1,8	3,15	3,59	1,09	2,04
4	-1927,2544	3,3	3,07	3,47	1,08	2,08
5	-1927,2507	5,6	2,96	3,30	1,07	2,15
6	-1927,2397	12,5	2,69	2,84	1,04	2,45
7	-1927,2243	22,2	1,98	1,89	1,12	2,90
8	-1927,2615	-1,2	1,92	1,12	2,20	-
9	-1927,2654	-3,6	1,90	1,11	2,28	-
10	-1927,2665	-4,3	1,89	1,10	2,28	-
Int	-1927,2316	17,6	2,25	2,24	1,03	2,86

Tabelle 6.6: Charakteristische Bindungsabstände der Geometrien von Enzym-Inhibitor-Komplexen mit dem Inhibitor K777-X (X=Br) entlang des MEP, die in der Abbildung 5.29 graphisch dargestellt sind. Geometrien 4-2, 5-2 und 6-2 wurden durch die zweite zusätzliche Reaktionsprofilberechnung (NEB) erhalten.

Geom.	Energie		Bindungsabstände in Å				
	Nr	absolut (a.u.)	relativ (kcal/mol)	d(S-C1)	d(C2-H)	d(N-H)	d(S-H)
1		-4400,9281	0,0	3,34	3,55	1,09	2,02
2		-4400,9239	2,6	3,05	3,16	1,07	2,17
3		-4400,9132	9,3	2,76	2,78	1,04	2,35
4		-4400,9015	16,7	2,40	2,29	1,04	2,61
5		-4400,9051	14,4	2,04	1,35	1,63	2,63
6		-4400,9294	-0,9	1,90	1,12	1,98	-
4-2		-4400,9080	12,60	2,24	2,20	1,03	-
5-2		-4400,9055	14,1	1,94	1,52	1,33	-
6-2		-4400,9294	-0,9	1,90	1,12	1,98	-
Int		-4400,9080	12,6	2,24	2,20	1,03	2,80
Int*		-4400,9104	11,1	1,94	1,56	1,20	-

Tabelle 6.7: Charakteristische Bindungsabstände der Geometrien von Enzym-Inhibitor-Komplexen mit dem Inhibitor K11777 (X=H) entlang des MEP, die in der Abbildung 6.15 graphisch dargestellt sind.

Geom.	Energie		Bindungsabstände in Å				
	Nr.	absolut (a.u.)	relativ (kcal/mol)	d(S-C1)	d(C2-H)	d(N-H)	d(S-H)
1		-1828,97908	0,0	3,39	3,97	1,10	1,97
2		-1828,97802	0,7	3,28	3,80	1,08	2,03
3		-1828,97588	2,0	3,19	3,65	1,09	2,06
4		-1828,97293	3,9	3,09	3,49	1,08	2,11
5		-1828,96954	6,0	2,98	3,32	1,08	2,18
6		-1828,96455	9,1	2,80	3,05	1,05	2,34
7		-1828,95346	16,1	2,36	2,39	1,03	2,84
8		-1828,98494	-3,7	1,95	1,12	2,16	-
9		-1828,99082	-7,4	1,90	1,11	2,20	-
10		-1828,99252	-8,4	1,89	1,11	2,18	-
Int		-1828,95801	13,2	2,29	2,23	1,03	2,82

Tabelle 6.8: Charakteristische Bindungsabstände der Geometrien von Enzym-Inhibitor-Komplexen mit dem Inhibitor K777-X (X=F) entlang des MEP für Frame 400 (Abbildung 6.16).

Geom.	Energie		Bindungsabstände in Å			
	Nr.	absolut (a.u)	relativ (kcal/mol)	d(S-C1)	d(C2-H)	d(N-H)
1	-1927,4427	0,0	3,38	4,09	1,09	2,00
2	-1927,4410	1,1	3,27	3,92	1,08	2,05
3	-1927,4369	3,7	3,18	3,76	1,07	2,10
4	-1927,4338	5,6	3,11	3,62	1,07	2,11
5	-1927,4303	7,8	3,02	3,46	1,07	2,14
6	-1927,4260	10,2	2,86	3,21	1,06	2,25
7	-1927,4168	16,3	2,62	2,67	1,03	2,65
8	-1927,4396	2,0	1,93	1,13	2,00	-
9	-1927,4452	-1,5	1,89	1,11	2,28	-
10	-1927,4473	-2,8	1,88	1,10	2,25	-
Int	-1927,4112	19,8	2,22	2,16	1,04	2,89

Tabelle 6.9: Charakteristische Bindungsabstände der Geometrien von Enzym-Inhibitor-Komplexen mit dem Inhibitor K777-X (X=F) entlang des MEP für Frame 500 (Abbildung 6.16).

Geom.	Energie		Bindungsabstände in Å			
	Nr.	absolut (a.u)	relativ (kcal/mol)	d(S-C1)	d(C2-H)	d(N-H)
1	-1927,8488	0,0	3,50	4,11	1,09	2,05
2	-1927,8473	0,9	3,35	3,93	1,08	2,11
3	-1927,8437	3,2	3,25	3,77	1,07	2,17
4	-1927,8387	6,4	3,14	3,61	1,06	2,22
5	-1927,8367	7,6	3,09	3,50	1,07	2,18
6	-1927,8301	11,7	2,92	3,22	1,05	2,36
7	-1927,8148	21,4	2,62	2,73	1,02	2,90
8	-1927,8448	2,5	1,95	1,12	2,19	-
9	-1827,8520	-2,0	1,90	1,11	2,22	-
10	-1827,8542	-3,4	1,88	1,11	2,17	-
Int	-1827,8154	21,0	2,30	2,24	1,03	2,91

- [1] Gerber-Lemaire, S.; Juillerat-Jeanneret, L. Studies toward New Anti-Cancer Strategies Based on alpha-Mannosidase Inhibition. *CHIMIA International Journal for Chemistry* **2010**, *64*, 634–639.
- [2] Shah, N.; Kuntz, D. A.; Rose, D. R. Golgi alpha-mannosidase II cleaves two sugars sequentially in the same catalytic site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, 9570–9575.
- [3] Ettari, R.; Tamborini, L.; Angelo, I. C.; Micale, N.; Pinto, A.; De Micheli, C.; Conti, P. Inhibition of Rhodesain as a Novel Therapeutic Modality for Human African Trypanosomiasis BT - Journal of Medicinal Chemistry. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 5637–5658.
- [4] Kerr, I. D.; Lee, J. H.; Farady, C. J.; Marion, R.; Rickert, M.; Sajid, M.; Pandey, K. C.; Caffrey, C. R.; Legac, J.; Hansell, E.; McKerrow, J. H.; Craik, C. S.; Rosenthal, P. J.; Brinen, L. S. Vinyl sulfones as antiparasitic agents and a structural basis for drug design. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 25697–25703.
- [5] Schirmeister, T.; Kesselring, J.; Jung, S.; Schneider, T. H.; Weickert, A.; Becker, J.; Lee, W.; Bamberger, D.; Wich, P. R.; Distler, U.; Tenzer, S.; Johé, P.; Hellmich, U. A.; Engels, B. Quantum Chemical-Based Protocol for the Rational Design of Covalent Inhibitors. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 8332–8335.
- [6] Schmidt, T. C.; Welker, A.; Rieger, M.; Sahu, P. K.; Sotriffer, C. A.; Schirmeister, T.; Engels, B. Protocol for Rational Design of Covalently Interacting Inhibitors. *ChemPhysChem* **2014**, *15*, 3226–3235.
- [7] Arbeitskreis Prof.Dr. B. Engels. <http://www.phys-chemie.uni-wuerzburg.de/arbeitsgruppen/engels/startseite/>.
- [8] Senn, H. M.; O'Hagan, D.; Thiel, W. Insight into enzymatic C-F bond formation from QM and QM/MM calculations. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 13643–13655.
- [9] Schmidt, T. C.; Paasche, A.; Grebner, C.; Ansorg, K.; Becker, J.; Lee, W.; Engels, B. QM/MM Investigations Of Organic Chemistry Oriented Questions. *Top. Curr. Chem.* **2012**, 1–77.
- [10] Senn, H. M.; Thiel, W. QM/MM methods for biomolecular systems. *Angewandte Chemie - International Edition* **2009**, *48*, 1198–1229.

- [11] Bakowies, D.; Thiel, W. Hybrid Models for Combined Quantum Mechanical and Molecular Mechanical Approaches. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 10580–10594.
- [12] Sheppard, D.; Terrell, R.; Henkelman, G. Optimization methods for finding minimum energy paths. *The Journal of chemical physics* **2008**, *128*, 134106.
- [13] Buback, V.; Mladenovic, M.; Engels, B.; Schirmeister, T. Rational Design of Improved Aziridine-Based Inhibitors of Cysteine Proteases. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 5282–5289.
- [14] Henkelman, G.; Jónsson, H. Improved tangent estimate in the nudged elastic band method for finding minimum energy paths and saddle points. *Journal of Chemical Physics* **2000**, *113*, 9978–9985.
- [15] Henkelman, G.; Uberuaga, B. P.; Jónsson, H. Climbing image nudged elastic band method for finding saddle points and minimum energy paths. *J. Chem. Phys.* **2000**, *113*, 9901–9904.
- [16] Arbeitskreis Prof.Dr. J. Seibel. <https://www.chemie.uni-wuerzburg.de/oc/seibel-group/home/>.
- [17] Arbeitskreis Prof.Dr. T. Schirmeister. <https://ak-schirmeister.pharmazie.uni-mainz.de/team/prof-dr-tanja-schirmeister/>.
- [18] Vollhardt, K. P. C.; Schore, N. E. *Organische Chemie*; Wiley-VCH, 2005; Chapter 2: Struktur und Reaktivität: Säuren und Basen, polare und unpolare Moleküle, pp 64–65.
- [19] Clayden, J.; Greeves, N.; Warren, S.; Wothers, P. *Organic Chemistry*; Oxford, 2008; Chapter 5: Organic Reactions, pp 116–120.
- [20] Jensen, F. *Introduction to computational chemistry*; John Wiley & Sons, Ltd, Second Edition, 2007; Chapter 12: Optimization techniques, pp 400–401.
- [21] DL-FIND. <https://www.chemshell.org/sites/www.chemshell.org/files/docs/tcl-chemshell/manual/dlfind.html>.
- [22] Jensen, F. *Introduction to computational chemistry*; John Wiley & Sons, Ltd, Second Edition, 2007; Chapter 12: Optimization techniques, pp 405, 419.
- [23] Henkelman, G.; Jónsson, H. A dimer method for finding saddle points on high dimensional potential surfaces using only first derivatives. *The Journal of Chemical Physics* **1999**, *111*, 7010–7022.

- [24] Klimeš, J.; Bowler, D. R.; Michaelides, A. A critical assessment of theoretical methods for finding reaction pathways and transition states of surface processes. *Journal of physics. Condensed matter : an Institute of Physics journal* **2010**, *22*, 074203.
- [25] Schramm, V. L.; Shi, W. Atomic motion in enzymatic reaction coordinates. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2001**, *11*, 657–65.
- [26] Schaftenaar, G.; Noordik, J. H. Molden: a pre- and post-processing program for molecular and electronic structures. *J. Comput.-Aided Mol. Design* **2000**, *14*, 123–134.
- [27] K777 [K11777]. <https://www.biomol.com/de/produkte/chemikalien/biochemikalien/k777-k11777-ag-cr1-0158-m001>.
- [28] Kesselring, J. Rationales Design, Synthese und Testung kovalent-reversibler Cysteinproteaseinhibitoren. https://publications.ub.uni-mainz.de/theses/frontdoor.php?source_opus=100001142.
- [29] Mladenovic, M.; Fink, R. F.; Thiel, W.; Schirmeister, T.; Engels, B. On the origin of the stabilization of the zwitterionic resting state of cysteine proteases: A theoretical study. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130*, 8696–8705.
- [30] Klebe, G. *Wirkstoffdesign: Entwurf und Wirkung von Arzneistoffen*; Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 2009; pp 1–634.
- [31] Bernasconi, C.; Rappoport, Z. Recent Advances in Our Mechanistic Understanding of S_NV Reaktionen. *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 993–1003.
- [32] Bernasconi, C. F.; Ali, M.; Nguyen, K.; Ruddat, V.; Rappoport, Z. Reactions of substituted (methylthio)benzylidene Meldrum's acids with secondary alicyclic amines in aqueous DMSO. Evidence for rate-limiting proton transfer. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 9248–54.
- [33] Häser, M.; Ahlrichs, R. Improvements on the direct SCF method. *Journal of Computational Chemistry* **1989**, *10*, 104–111.
- [34] Treutler, O.; Ahlrichs, R. Efficient molecular numerical integration schemes. *The Journal of Chemical Physics* **1995**, *102*, 346–354.
- [35] Ahlrichs, R.; Bär, M.; Häser, M.; Horn, H.; Kölmel, C. Electronic structure calculations on workstation computers: The program system TURBOMOLE. *Chem. Phys. Lett.* **1989**, *162*, 165–169.

- [36] Becke, A. D. Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. *Physical Review A* **1988**, *38*, 3098–3100.
- [37] Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Physical Review B* **1988**, *37*, 785–789.
- [38] Weigend, F.; Ahlrichs, R. Balanced basis sets of split valence, triple zeta valence and quadruple zeta valence quality for H to Rn: Design an assessment of accuracy. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2005**, *7*, 3297–3305.
- [39] Eichkorn, K.; Weigend, F.; Treutler, O.; Ahlrichs, R. Auxiliary basis sets for main row atoms and transition metals and their use to approximate Coulomb potentials. *Theor. Chem. Acc.* **1997**, *97*, 119–124.
- [40] Becke, A. D. Density-functional thermochemistry. V. Systematic optimization of exchange-correlation functionals. *The Journal of Chemical Physics* **1997**, *107*, 8554–8560.
- [41] Case, D.; Darden, T.; Cheatham, T.; Simmerling, C.; Wang, J.; Duke, R.; Luo, R.; Walker, R.; Zhang, W.; Merz, K.; Roberts, B.; Hayik, S.; Roitberg, A.; Kollmann, P. A. (2010), AMBER 11, University of California, San Francisco. <http://ambermd.org/>.
- [42] Case, D. A.; Cheatham, T. E.; Darden, T.; Gohlke, H.; Luo, R.; Merz, K. M.; Onufriev, A.; Simmerling, C.; Wang, B.; Woods, R. J. The Amber biomolecular simulation programs. *J. Comput. Chem.* **2005**, *26*, 1668–88.
- [43] Metz, S.; Kästner, J.; Sokol, A. A.; Keal, T. W.; Sherwood, P. ChemShell—a modular software package for QM/MM simulations. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science* **2014**, *4*, 101–110.
- [44] Singh, J.; Petter, R. C.; Baillie, T. A.; Whitty, A. The resurgence of covalent drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2011**, *10*, 307–317.
- [45] Wu, P.; Nielsen, T. E.; Clausen, M. H. FDA-approved small-molecule kinase inhibitors. *Trends Pharmacol. Sci.* **2015**, *36*, 422–439.
- [46] Drag, M.; Salvesen, G. S. Emerging principles in protease-based drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, *9*, 690–701.
- [47] Miller, J. A. The metabolism of xenobiotics to reactive electrophiles in chemical carcinogenesis and mutagenesis: a collaboration with Elizabeth Cavert Miller and our associates. *Drug Metab. Rev.* **1998**, *30*, 645–674.

- [48] Burcham, P. C. *An Introduction to Toxicology*. 2014.
- [49] Bauer, R. A. Covalent inhibitors in drug discovery: From accidental discoveries to avoided liabilities and designed therapies. *Drug Discov. Today* **2015**, *20*, 1061–1073.
- [50] Ghosh, A. K.; Samanta, I.; Mondal, A.; Liu, W. R. Covalent Inhibition in Drug Discovery. *ChemMedChem* **2019**, *14*, 889–906.
- [51] Schneider, T. H.; Rieger, M.; Ansorg, K.; Sobolev, A. N.; Schirmeister, T.; Engels, B.; Grabowsky, S. Vinyl sulfone building blocks in covalently reversible reactions with thiols. *New J. Chem.* **2015**, *39*, 5841–5853.
- [52] SciFinder Scholar, version 2004.2; Chemical Abstracts Service: Columbus, OH, 2004; RN 133876-92-3 (accessed September 28, 2005). <https://www.cas.org/products/scifinder>.
- [53] Copeland, R. A.; Pompliano, D. L.; Meek, T. D. Drug-target residence time and its implications for lead optimization. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, *5*, 730–739.
- [54] Kuntz, I. D.; Chen, K.; Sharp, K. A.; Kollman, P. . A. The maximal affinity of ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 9997–10002.
- [55] Kuntz, D. A.; Nakayama, S.; Shea, K.; Hori, H.; Uto, Y.; Nagasawa, H.; Rose, D. R. Structural investigation of the binding of 5-substituted swainsonine analogues to golgi alpha-mannosidase II. *ChemBioChem* **2010**, *11*, 673–680.
- [56] Smith, A. J. T.; Zhang, X.; Leach, A. G.; Houk, K. N. Beyond Picomolar Affinities: Quantitative Aspects of Noncovalent and Covalent Binding of Drugs to Proteins. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 225–233.
- [57] Copeland, R. A. *Enzymes. A practical Introduction to Structure, Mechanism and Data Analysis*; VCH Publishers, New York, 1996; p 322pp.
- [58] Pappalardi, M. B.; Martin, J. D.; Jiang, Y.; Burns, M. C.; Zhao, H.; Ho, T.; Sweitzer, S.; Lor, L.; Schwartz, B.; Duffy, K.; Gontarek, R.; Tummino, P. J.; Copeland, R. A.; Luo, L. Rapid Reports. *Biochemistry* **2008**, *47*, 11165–11167.
- [59] Oballa, R. M.; Truchon, J. F.; Bayly, C. I.; Chauret, N.; Day, S.; Crane, S.; Berthelette, C. A generally applicable method for assessing the electrophilicity and reactivity of diverse nitrile-containing compounds. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 998–1002.

- [60] Paasche, A.; Schiller, M.; Schirmeister, T.; Engels, B. Mechanistic study of the reaction of thiol-containing enzymes with α,β -unsaturated carbonyl substrates by computation and chemoassays. *ChemMedChem* **2010**, *5*, 869–880.
- [61] WHO report on cancer. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
- [62] Barrett, M. P.; Burchmore, R. J.; Stich, A.; Lazzari, J. O.; Frasch, A. C.; Cazzulo, J. J.; S., K. The trypanosomiasis. *Lancet (London, England)* **2003**, *362*, 1469–1480.
- [63] WHO report on trypanosomes. www.who.int/mediacentre/factsheets/fs259/en/.
- [64] Number of new reported cases of Human African trypanosomiasis: 2015. https://apps.who.int/neglected_diseases/ntddata/hat/hat.html.
- [65] Bryant, C.; Kerr, I. D.; Debnath, M.; Ang, K. K. H.; Ratnam, J.; Ferreira, R. S.; Jaishankar, P.; Zhao, D.; Arkin, M. R.; McKerrow, J. H.; Brinen, L. S.; Renslo, A. R. Novel non-peptidic vinylsulfones targeting the S2 and S3 subsites of parasite cysteine proteases. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 6218–6221.
- [66] Varki, A.; Cummings, R. D.; Esco, J. D.; Freeze, H. H.; Stanley, P.; Etzler, M. E.; Hart, G. W.; Bertozzi, C. R. *Essentials of Glycobiology*; Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 2009.
- [67] Lasky, L. A. Selectins: Interpreters of Cell-Specific Carbohydrate Information during Inflammation. *Science* **1992**, *258*, 964–969.
- [68] Reis, C. A.; Osorio, H.; Silva, L.; Gomes, C.; David, L. Alterations in glycosylation as biomarkers for cancer detection. *J. Clin. Pathol.* **2010**, *63*, 322–329.
- [69] Kim, Y. J.; Borsig, L.; Varki, N. M.; Varki, A. P-selectin deficiency attenuates tumor growth and metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95*, 9325–9330.
- [70] Kim, Y. J.; Varki, A. Perspectives on the significance of altered glycosylation of glycoproteins in cancer. *Glycoconj. J.* **1997**, *14*, 569–576.
- [71] Springer, T. A.; Lasky, L. A. Sticky Sugars for Selectins. *Nature* **1991**, *349*, 196–197.

- [72] de Leoz, M. L. A.; Young, L. J. T.; An, H. J.; Kronewitter, S. R.; Kim, J.; Miyamoto, S.; Borowsky, A. D.; Chew, H. K.; Lebrilla, C. B. High-Mannose Glycans are Elevated during Breast Cancer Progression. *Mol. Cell. Proteomics* **2011**, *10*, 1–9.
- [73] Fujita, T.; Murayama, K.; Hanamura, T.; Okada, T.; Ito, T.; Harada, M.; Komatsu, A.; Koyama, H.; Kanai, T.; Maeno, K.; Mochizuki, Y.; Hama, Y.; Ito, K. I.; Amano, J.; Fujimori, M. CSLEX (sialyl Lewis X) is a useful tumor marker for monitoring of breast cancer patients. *Jpn. J. Clin. Oncol.* **2011**, *41*, 394–399.
- [74] Saeland, E.; Belo, A. I.; Mongera, S.; Van Die, I.; Meijer, G. A.; Van Kooyk, Y. Differential glycosylation of MUC1 and CEACAM5 between normal mucosa and tumour tissue of colon cancer patients. *Int. J. Cancer* **2012**, *131*, 117–128.
- [75] Bernacki, R. J.; Niedbala, M. J.; Korytnyk, W. Glycosidases in cancer and invasion. *Cancer Metastasis Rev.* **1985**, *4*, 81–101.
- [76] Goss, P. E.; Baker, M.; Dennis, J. W.; Carver, J. Inhibitors of Anticancer. *Clin. Cancer Res.* **1995**, *1*, 935–944.
- [77] Arafa, H. M. M. Possible contribution of beta-glycosidases and caspases in the cytotoxicity of novel glycoconjugates in colon cancer cells. *Invest. New Drugs* **2010**, *28*, 306–317.
- [78] van den Elsen, J. M.; Kuntz, D. A.; Rose, D. R. Structure of Golgi alpha-mannosidase II: a target for inhibition of growth and metastasis of cancer cells. *EMBO J.* **2001**, *20*, 3008–3017.
- [79] Kuntz, D. A.; Tarling, C. A.; Withers, S. G.; Rose, D. R. Structural analysis of Golgi alpha-mannosidase II inhibitors identified from a focused glycosidase inhibitor screen. *Biochemistry* **2008**, *47*, 10058–10068.
- [80] Acton, A. Q. *Glycoside Hydrolases: Advances in Research and Application*, 2011th ed.; A ScholarlyEditions eBook, Atlanta, Georgia, USA, 185 p, 2011; Chapter 11: Mannosidases, pp 128–136.
- [81] Fernandes, J.; Dennis, J. W. A Phase I Study of Swainsonine in Patients with Advanced Malignancies1. *Cancer Res.* **1994**, *54*, 1450–1457.
- [82] Goss, P. E.; Reid, C. L.; Bailey, D.; Dennis, J. W. Phase IB clinical trial of the oligosaccharide processing inhibitor swainsonine in patients with advanced malignancies. *Clin. Cancer Res.* **1997**, *3*, 1077–1086.

- [83] Henrissat, B.; Davies, G. Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1997**, *7*, 637–644.
- [84] CAZy:Carbohydrate-Active enZYmes. <http://www.cazy.org/>.
- [85] Enzyme Commission (EC) number. http://www.cazypedia.org/index.php/Glycoside_hydrolases#Enzyme_Commission_.28EC.29_number.
- [86] Howard, S.; He, S.; Withers, S. G. Identification of the active site nucleophile in jack bean alpha-mannosidase using 5-fluoro-beta-L-gulosyl fluoride. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 2067–2072.
- [87] Humphrey, W.; Dalke, A.; Klaus, S. VMD - Visual Molecular Dynamics. *J. Mol. Graph.* **1996**, *14*, 33–38.
- [88] Koshland, J., D. E Stereochemistry and the mechanism of enzymatic reactions. *Biol. Rev.* **1953**, *28*, 416–436.
- [89] Davies, G.; Henrissat, B. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* **1995**, *3*, 853–859.
- [90] Rempel, B. P.; Withers, S. G. Covalent inhibitors of glycosidases and their applications in biochemistry and biology. *Glycobiology* **2008**, *18*, 570–586.
- [91] Zechel, D. L.; Withers, S. G. Glycosidase mechanisms: anatomy of a finely tuned catalyst. *Acc. Chem. Res.* **2000**, *33*, 11–18.
- [92] Petersen, L.; Ardèvol, A.; Rovira, C.; Reilly, P. J. Mechanism of cellulose hydrolysis by inverting GH8 endoglucanases: a QM/MM metadynamics study. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 7331–7339.
- [93] Barker, I. J.; Petersen, L.; Reilly, P. J. Mechanism of xylobiose hydrolysis by GH43 β -xylosidase. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 15389–15393.
- [94] Petersen, L.; Arde, A.; Rovira, C.; Reilly, P. J. Molecular Mechanism of the Glycosylation Step Catalyzed by Golgi. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 8291–8300.
- [95] Liu, J.; Wang, X.; Xu, D. QM/MM study on the catalytic mechanism of cellulose hydrolysis catalyzed by cellulase Cel5A from acidothermus cellulolyticus. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 1462–1470.
- [96] Soliman, M. E. S.; Ruggiero, G. D.; Pernía, J. J. R.; Greig, I. R.; Williams, I. H. Computational mutagenesis reveals the role of active-site tyrosine in stabilising a boat conformation for the substrate: QM/MM molecular dynamics studies of wild-type and mutant xylanases. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 460–688.

- [97] Soliman, M. E. S.; Pernia, J. J. R.; Greig, I. R.; Williams, I. H. Mechanism of glycoside hydrolysis: A comparative QM/MM molecular dynamics analysis for wild type and Y69F mutant retaining xylanases. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 5236–5244.
- [98] Bowman, A. L.; Grant, I. M.; Mulholland, A. J. QM/MM simulations predict a covalent intermediate in the hen egg white lysozyme reaction with its natural substrate. *Chem. Commun.* **2008**, 4425–4427.
- [99] MEROPS. <http://merops.sanger.ac.uk>.
- [100] Rawlings, N. D.; Barrett, A. J.; Finn, R. Twenty years of the MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, D343–D350.
- [101] Rawlings, N. D.; Barrett, a. J. Evolutionary families of peptidases. *Biochem. J.* **1993**, *290*, Pt 1, 205–218.
- [102] Otto, H.-H.; Schirmeister, T. Cysteine Proteases and Their Inhibitors. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 133–172.
- [103] Powers, J. C.; Asgian, J. L.; Ekici, O. D.; James, K. E. Irreversible inhibitors of serine, cysteine, and threonine proteases. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4639–4750.
- [104] Rudenskaya, G. N.; Pupov, D. V. Cysteine proteinases of microorganisms and viruses. *Biochem.* **2011**, *73*, 1–13.
- [105] Scory, S.; Caffrey, C. R.; Stierhof, Y.-d.; Steverding, D. Trypanosoma brucei. *Exp. Parasitol.* **1999**, *91*, 327–333.
- [106] Rullmann, J. A. C.; Bellidot, M. N. The Active Site of Papain. *J. Mol. Biol.* **1989**, *206*, 101–118.
- [107] Liu, S.; Hanzlik, R. P. Structure-activity relationships for inhibition of papain by peptide Michael acceptors. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 1067–1075.
- [108] Brinen, L. S.; Hansell, E.; Cheng, J.; Roush, W. R.; Mckerrow, J. H.; Fletcher, R. J. A target within the target: probing cruzains P1 site to define structural determinants for the Chagas disease protease. *Structure* **2000**, *8*, 831–840.
- [109] Schlechter, I.; Berger, A. Nomenclature. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1967**, *27*, 157–162.

- [110] Withers, S. G.; Aebersold, R.; Withers, S. G.; Aebersold, R. Approaches to labeling and identification of active site residues in glycosidases Approaches to labeling and identification of active site residues in glycosidases. *Protein Sci* **1995**, *4*, 361–372.
- [111] McCarter, J. D.; Adam, M. J.; Hartman, N. G.; Withers, S. G. In vivo inhibition of beta-glucosidase and beta-mannosidase activity in rats by 2-deoxy-2-fluoro-beta-glycosyl fluorides and recovery of activity in vivo and in vitro. *Biochem. J.* **1994**, *301*, 343–348.
- [112] Numao, S.; He, S.; Evjen, G.; Howard, S.; Tollersrud, O. K.; Withers, S. G. Identification of Asp197 as the catalytic nucleophile in the family 38 alpha-mannosidase from bovine kidney lysosomes. *FEBS Lett.* **2000**, *484*, 175–178.
- [113] Numao, S.; Kuntz, D. A.; Withers, S. G.; Rose, D. R. Insights into the Mechanism of Drosophila melanogaster Golgi alpha-Mannosidase II through the Structural Analysis of Covalent Reaction Intermediates. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 48074–48083.
- [114] Thompson, S. A.; Andrews, P. R.; Hanzlik, R. P. Carboxyl-modified amino acids and peptides as protease inhibitors. *J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 104–111.
- [115] Palmer, J. T.; Rasnick, D.; Klaus, J. L.; Bromme, D. Vinyl Sulfones as Mechanism-Based Cysteine Protease Inhibitors. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 3193–3196.
- [116] Rasnick, D. Small synthetic inhibitors of cysteine proteases. *Perspect. Drug Discov. Des.* **1996**, *6*, 47–63.
- [117] Engel, J. C.; Doyle, P. S.; Hsieh, I.; McKerrow, J. H. Cysteine protease inhibitors cure an experimental Trypanosoma cruzi infection. *J Exp Med* **1998**, *188*, 725–734.
- [118] Bodur, C.; Kutuk, O.; Karsli-Uzunbas, G.; Isimjan, T. T.; Harrison, P.; Basaga, H. Pramanicin Analog Induces Apoptosis in Human Colon Cancer Cells: Critical Roles for Bcl-2, Bim, and p38 MAPK Signaling. *PLoS ONE* **2013**, *8*.
- [119] Coombs, G.; North, M. *Biochemical Protozoology As A Basis For Drug Design*; Taylor and Francis, London, Washington DC, 1991; pp 264–265.
- [120] Rosenthal, P. J. *Antimalarial Chemotherapy: Mechanisms of Action, Resistance, and New Directions in Drug Discovery.*; Springes-Science + Business Media, LCC, 2001; pp 331–339.

- [121] Jensen, F. *Modern Quantum chemistry*, 2nd ed.; 2007; pp 1-599.
- [122] Püschner, D. *Quantitative Rechenverfahren der Theoretischen Chemie Ein Einstieg in Hartree-Fock, Configuration Interaction und Dichtefunktionale*; 2017; pp 1-59.
- [123] Warshel, A.; Levitt, M. Theoretical Studies of Enzymic Reactions :. **1976**, *103*, 227-249.
- [124] Scabo, A.; Ostlund, S., Neil *Introduction to Computational chemistry: Introduction to advanced electronic structure theory*, Dover ed.; 1996; pp 1-466.
- [125] Hohenberg, P.; Kohn, W. Inhomogeneous electron gas. *Physical Review* **1964**, *136*, B864 - B871.
- [126] Jensen, F. Polarization consistent basis sets. VIII. The transition metals Sc-Zn. *J. Chem. Phys.* **2013**, *138*, 014107.
- [127] Perdew, J. P.; Ruzsinszky, A.; Tao, J.; Staroverov, V. N.; Scuseria, G. E.; Csonka, G. I. Prescription for the design and selection of density functional approximations: More constraint satisfaction with fewer fits. *Journal of Chemical Physics* **2005**, *123*, 062201-1 -062201-9.
- [128] Perdew, J. P.; Schmidt, K. Jacob's ladder of density functional approximations for the exchange-correlation energy. American Institute of Physics Conference Series. 2001; pp 1-20.
- [129] Koch, W.; Holthausen, M. C. *A Chemist's Guide to Density Functional Theory*; WILEY-VCH, 2001; pp 29-85.
- [130] Slater, J. C. A Simplification of the Hartree-Fock Method. *Phys. Rev.* **1951**, *81*, 385-390.
- [131] Vosko, S. H.; Wilk, L.; Nusair, M. Accurate spin-dependent electron liquid correlation energies for local spin density calculations: a critical analysis. *Canadian Journal of Physics* **1980**, *58*, 1200-1211.
- [132] Perdew, J. P.; Wang, Y. Accurate und simple analytic representation of the electron-gas correlation energy. *Physical Review B* **1992**, *45*, 244-249.
- [133] Perdew, J. P.; Burke, K.; Ernzerhof, M. Generalized Gradient Approximation Made Simple. *Physical Review Letters* **1996**, *77*, 3865-3868.
- [134] Becke, A. D. Density-functional thermochemistry.III. The role of exact exchange. *The Journal of Chemical Physics* **1993**, *98*, 5648-5652.

- [135] Stephens, P. J.; Devlin, F. J.; Chabalowski, C. F.; Frisch, M. J. Ab Initio Calculation of Vibrational Absorption and Circular Dichroism Spectra Using Density Functional Force Fields. **1994**, *98*, 11623–11627.
- [136] Perdew, J. P.; Yue, W. Accurate and simple density functional for the electronic exchange energy: Generalized gradient approximation. *Physical Review B* **1986**, *33*, 8800–8802.
- [137] Handy, N. C.; Cohen, A. J. Left-right correlation energy. *Molecular Physics* **2001**, *99*, 403–412.
- [138] Perdew, J. P.; Ruzsinszky, A.; Csonka, G. I.; Vydrov, O. A.; Scuseria, G. E.; Constantin, L. A.; Zhou, X.; Burke, K. Generalized gradient approximation for solids and their surfaces. *Phys. Rev. Lett.* **2008**, *100*, 136406.
- [139] Zhao, Y.; Truhlar, D. G. Construction of a generalized gradient approximation by restoring the density-gradient expansion and enforcing a tight Lieb-Oxford bound. *Journal of Chemical Physics* **2008**, *128*, 184109.
- [140] Tao, J.; Perdew, J. P.; Staroverov, V. N.; Scuseria, G. E. Climbing the Density Functional Ladder: Non-Empirical Meta-Generalized Gradient Approximation Designed for Molecules and Solids. *Phys. Rev. Lett.* **2003**, *91*, 146401.
- [141] Becke, A.; Roussel, M. General physics. *Phys. Rev. A* **1989**, *39*, 925–930.
- [142] Becke, A. D. Density-functional thermochemistry. IV. A new dynamical correlation functional and implications for exact-exchange mixing. *The Journal of Chemical Physics* **1996**, *104*, 1040–1046.
- [143] Van Voorhis, T.; Scuseria, G. E. A novel form for the exchange-correlation energy functional (vol 109, pg 400, 1998). *Journal of Chemical Physics* **2008**, *129*, 400–410.
- [144] Perdew, J. P.; Kurth, S.; Zupan, A.; Blaha, P. Accurate Density Functional with Correct Formal Properties: A Step Beyond the Generalized Gradient Approximation. *Physical Review Letters* **1999**, *82*, 2544–2547.
- [145] Curtiss, L. A.; Redfern, P. C.; Raghavachari, K. Gaussian-4 theory. *Journal of Chemical Physics* **2007**, *126*.
- [146] Piella, L. *Ideas of Quantum Chemistry*; Elsevier, 2007; pp 591–592.
- [147] Perdew, J. P.; Ernzerhof, M.; Burke, K. Rationale for mixing exact exchange with density functional approximations. *The Journal of Chemical Physics* **1996**, *105*, 9982–9985.

- [148] Heyd, J.; Scuseria, G. E.; Ernzerhof, M. Hybrid functionals based on a screened Coulomb potential. *Journal of Chemical Physics* **2003**, *118*, 8207–8215.
- [149] Staroverov, V. N.; Scuseria, G. E.; Tao, J.; Perdew, J. P. Comparative assessment of a new nonempirical density functional: Molecules and hydrogen-bonded complexes. *Journal of Chemical Physics* **2003**, *119*, 12129–12137.
- [150] Staroverov, V. N.; Scuseria, G. E.; Tao, J.; Perdew, J. P. Comparative assessment of a new nonempirical density functional: Molecules and hydrogen-bonded complexes. *Journal of Chemical Physics* **2003**, *119*, 11507.
- [151] Zhao, Y.; Truhlar, D. G. Comparative DFT study of van der Waals complexes: Rare-gas dimers, alkaline-earth dimers, zinc dimer and zinc-rare-gas dimers. *Journal of Physical Chemistry A* **2006**, *110*, 5121–5129.
- [152] Zhao, Y.; Truhlar, D. G. Exploring the limit of accuracy of the global hybrid meta density functional for main-group thermochemistry, kinetics, and noncovalent interactions. *Journal of Chemical Theory and Computation* **2008**, *4*, 1849–1868.
- [153] Barlett, R.; Lotrich V.F, J., Schweihert *Phys. Rev. A* **2005**, *122*, 034104.
- [154] Grabowski, I.; Hirata, S.; Ivanov, S.; Bartlett, R. J. Ab initio density functional theory: OEP-MBPT(2). A new orbital-dependent correlation functional. *Journal of Chemical Physics* **2002**, *116*, 4415–4425.
- [155] Talman, J. D.; Shadwick, W. F. Optimized effective atomic central potential. *Phys. Rev. A* **1976**, *14*, 36–40.
- [156] Grimme, S. Semiempirical hybrid density functional with perturbative second-order correlation. *Journal of Chemical Physics* **2006**, *124*.
- [157] Jensen, F. *Introduction to computational chemistry*; John Wiley & Sons, Ltd, Second Edition, 2007; Chapter 14: Simulation techniques, pp 475–484.
- [158] Klamt, A.; Schüürmann, G. COSMO: A New Approach to dielectric screening in solvents with explicit expressions for thr screening energy and its gradients. *J. Chem.Soc. Perkin Trans.2* **1993**, *5*, 799–805.
- [159] Schäfer, A.; Klamt, A.; Sattel, D.; Lohrenz, J. W. C.; Eckert, F. COSMO Implementation in Turbomole: Extension of an efficient quantum chemical code towards liquid systems. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2000**, *2*, 2187–2193.

- [160] Andzem, J.; Kölmel, C.; Klamt, A. Incorporation of solvent effects into density functional calculations of molecular energies and geometries. *J. Chem. Phys.* **1995**, *103*, 9312–9320.
- [161] Hornak, V.; Abel, R.; Okur, A.; Strockbine, B.; Roitberg, A.; Simmerling, C.; Brook, S. Comparison of Multiple Amber Force Fields and Development of Improved Protein Backbone Parameters. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **2006**, *65*, 712–725.
- [162] Duan, Y.; Wu, C.; Chowdhury, S.; Lee, M. C.; Xiong, G.; Zhang, W.; Yang, R.; Cieplak, P.; Luo, R.; Lee, T.; Caldwell, J.; Wang, J.; Kollman, P. A point-charge force field for molecular mechanics simulations of proteins based on condensed-phase quantum mechanical calculations. *J. Comput. Chem.* **2003**, *24*, 1999–2012.
- [163] Kirschner, K. N.; Yongye, A. B.; Tschaampel, S. B. GLYCAM06: A Generalizable Biomolecular Force Field. Carbohydrates. *J. Comput. Chem.* **2008**, *29*, 622–655.
- [164] Yang, L.; Tan, C.-H.; Hsieh, M.-J.; Wang, J.; Duan, Y.; Cieplak, P.; Caldwell, J.; Kollman, P. a.; Luo, R. New-generation amber united-atom force field. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 13166–76.
- [165] Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D.; Impey, R. W.; Klein, M. L. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *The Journal of Chemical Physics* **1983**, *79*, 926–935.
- [166] Pengyu, R.; Ponder, J. W. Polarizable Atomic Multipole Water Model for Molecular Mechanics Simulation. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 5933–5947.
- [167] Cornell, W. D.; Cieplak, P.; Bayly, C. I.; Gould, I. R.; Merz, K. M.; Ferguson, D. M.; Spellmeyer, D. C.; Fox, T.; Caldwell, J. W.; Kollman, P. a. A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5179–5197.
- [168] Shi, Y.; Xia, Z.; Zhang, J.; Best, R.; Wu, C.; Ponder, J. W.; Ren, P. The Polarizable Atomic Multipole-based AMOEBA Force Field for Proteins. *J. Chem. Theory Comput.* **2013**, *9*, 4046–4063.
- [169] Warshel, A.; Levitt, M. Theoretical studies of enzymic reactions: Dielectric, electrostatic and steric stabilization of the carbonium ion in the reaction of lysozyme. *Journal of Molecular Biology* **1976**, *103*, 227–249.
- [170] Ponder, J. W.; Wu, C.; Ren, P.; Pande, V. S.; Chodera, J. D.; Schnieders, M. J.; Haque, I.; Mobley, D. L.; Lambrecht, D. S.; DiStasio, R. A.;

- Head-Gordon, M.; Clark, G. N. I.; Johnson, M. E.; Head-Gordon, T. Current status of the AMOEBA polarizable force field. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 2549–64.
- [171] Loco, D.; Polack, É.; Caprasecca, S.; Lagardère, L.; Lipparini, F.; Piquemal, J. P.; Mennucci, B. A QM/MM Approach Using the AMOEBA Polarizable Embedding: From Ground State Energies to Electronic Excitations. *Journal of Chemical Theory and Computation* **2016**, *12*, 3654–3661.
- [172] Wang, J.; Wang, W.; Kollman, P.; Case, D. Antechamber, An Accessory Software Package For Molecular Mechanical Calculations. <http://ambermd.org/antechamber/antechamber.pdf>.
- [173] AMBER Tools 12 Reference Manual. <http://physics.ujep.cz/~mmaly/vyuka/ruzne/AmberTools12.pdf>.
- [174] Jakalian, A.; Bush, B. L.; Jack, D. B.; Bayly, C. I. Fast, Efficient Generation of High-Quality Atomic Charges. AM1-BCC Model: I. Method. *J. Comput. Chem.* **2000**, *21*, 132–146.
- [175] AMBER: First steps. <http://ambermd.org/tutorials/advanced/tutorial2/section2.htm>.
- [176] Equilibrirung. <http://ambermd.org/tutorials/advanced/tutorial26/section1.html>.
- [177] NVT, Landevin-Dynamik. <http://ambermd.org/tutorials/advanced/tutorial26/section2.html>.
- [178] Roncharich, R. J.; Brooks, B. R.; Pastor, R. W. Langevin dynamics of peptides: The frictional dependence of isomerization rates of N-acetylalanyl-N-methylamide. *Biopolymers* **1992**, *32*, 523–535.
- [179] ChemShell, a Computational Chemistry Shell. <https://www.chemshell.org/sites/www.chemshell.org/files/docs/tcl-chemshell/manual/index.html>.
- [180] Sherwood, P. et al. QUASI: A general purpose implementation of the QM/MM approach and its application to problems in catalysis. *Theochem* **2003**, *632*, 1–28.
- [181] Kästner, J.; Carr, J. M.; Keal, T. W.; Thiel, W.; Wander, A.; Sherwood, P. DL-FIND: an open-source geometry optimizer for atomistic simulations. *J. Phys. Chem. A* **2009**, *113*, 11856–11865.

- [182] Brunk, E.; Rothlisberger, U. Mixed Quantum Mechanical/Molecular Mechanical Molecular Dynamics Simulations of Biological Systems in Ground and Electronically Excited States. *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 6217–6263.
- [183] Link atoms and the charge shift scheme. https://www.chemshell.org/sites/www.chemshell.org/files/docs/tcl-chemshell/manual/hyb_new.html.
- [184] Stoddard, J. *Stereochemistry of Carbohydrates*; Wiley-interscience, 1971; pp 47–122.
- [185] Conformational Itinerary. https://www.cazypedia.org/index.php/Conformational_itinerary.
- [186] Karaveg, K. A Dissertation Submitted to the Graduate Faculty of The University of Georgia in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree DOCTOR OF PHILOSOPHY. ATHENS, GEORGIA, page 60, 2005; https://getd.libs.uga.edu/pdfs/karaveg_khanita_200505_phd.pdf.
- [187] Kawatkar, S. P. A Dissertation Submitted to the Graduate Faculty of The University of Georgia in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree DOCTOR OF PHILOSOPHY. ATHENS, GEORGIA, chapter 3: CATALYTIC MECHANISM OF GOLGI alpha-MANNOSIDASE II: A QUANTUM MECHANICAL STUDY, 2006; https://getd.libs.uga.edu/pdfs/kawatkar_sameer_p_200608_phd.pdf.
- [188] Thompson, A. J.; Dabin, J.; Iglesias-Fernández, J.; Ardèvol, A.; Dinev, Z.; Williams, S. J.; Bande, O.; Siriwardena, A.; Moreland, C.; Hu, T. C.; Smith, D. K.; Gilbert, H. J.; Rovira, C.; Davies, G. J. The reaction coordinate of a bacterial GH47 α -mannosidase: A combined quantum mechanical and structural approach. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2012**, *51*, 10997–11001.
- [189] Davies, G. J.; Ducros, V. M.; Varrot, A.; Zechel, D. L. Mapping the conformational itinerary of beta-glycosidases by X-ray crystallography. *Biochem Soc Trans* **2003**, *31*, 523–527.
- [190] Clayden, J.; Greeves, N.; Warren, S.; Wothers, P. *Organic Chemistry*; Oxford, 2008; Chapter 18: Conformational analysis, pp 448–475.
- [191] Wang, J.; Wolf, R. M.; Caldwell, J. W.; Kollman, P. A.; Case, D. A. Development and Testing of a General Amber Force Field. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1157–1174.
- [192] Stote, R. H.; Karplus, M. Zinc binding in proteins and solution: a simple but accurate nonbonded representation. *Proteins* **1995**, *23*, 12–31.

- [193] Hoops, S. C.; Anderson, K. W.; Merz, K. M. Force field design for metallo-proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 8262–8270.
- [194] Davidchack, R. L.; Handel, R.; Tretyakov, M. V. Langevin thermostat for rigid body dynamics. *The Journal of Chemical Physics* **2009**, *130*, 1–15.
- [195] NVT. <https://www.chem.pku.edu.cn/liujian/tutorials/551780.htm>.
- [196] 1. Distance restraints. <http://ambermd.org/tutorials/advanced/tutorial4/index.htm>.
- [197] Listing: disang.120. <http://ambermd.org/tutorials/advanced/tutorial17/section2.htm>.
- [198] FORCE: Numeric frequencies. <https://www.chemshell.org/sites/www.chemshell.org/files/docs/tcl-chemshell/manual/force.html>.
- [199] Serafimova, I. M.; Pufall, M. A.; Krishnan, S.; Duda, K.; Cohen, M. S.; Maglathlin, R. L.; McFarland, J. M.; Miller, R. M.; Frödin, M.; Taunton, J. Reversible targeting of noncatalytic cysteines with chemically tuned electrophiles. *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8*, 471–476.
- [200] Cohen, M. S.; Zhang, C.; Shokat, K. M.; Taunton, J. Structural Bioinformatica-Based Design of Selective, Irreversible Kinase Inhibitors. *Science* **2005**, *308*, 1318–1321.
- [201] Liu, Q.; Sabnis, Y.; Zhao, Z.; Zhang, T.; Buhrlage, S. J.; Jones, L. H.; Gray, N. S. Developing irreversible inhibitors of the protein kinase cysteinome. *Chem. Biol.* **2013**, *20*, 146–159.
- [202] Weickert, A. Theoretical study on covalent reversible inhibitors of rhodesain. Diplomarbeit, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, 2012.
- [203] Rappoport, Z. The rich mechanistic world of nucleophilic vinylic substitution. *Recl. des Trav. Chim. des Pays-Bas* **1985**, *104*, 309 – 349.
- [204] Fernandez, I.; Bickelhaupt, M. F.; Uggerud, E. Reactivity in Nucleophilic Vinylic Substitution. *J. Org. Chem.* **2013**, 8574–8584.
- [205] Weigend, F.; Köhn, A.; Hättig, C. Efficient use of the correlation consistent basis sets in resolution of the identity MP2 calculations. *Journal of Chemical Physics* **2002**, *116*, 3175–3183.
- [206] Casanovas, R.; Ortega-Castro, J.; Frau, J.; Donoso, J.; Munoz, F. Theoretical pKa calculations with continuum model solvents, alternative protocols to thermodynamic cycles. *Int. J. Quantum Chem.* **2014**, *114*, 1350–1363.

- [207] Takano, Y.; Houk, K. N. Benchmarking the conductor-like polarizable continuum model (CPCM) for aqueous solvation free energies of neutral and ionic organic molecules. *Journal of Chemical Theory and Computation* **2005**, *1*, 70–77.
- [208] VMD: RMS Fit and Alignment. <https://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/current/ug/node201.html>.
- [209] GOLD User Guide. <https://www.ccdc.cam.ac.uk/support-and-resources/ccdcresources/748e2e78b0384715a462f17d38dfff5c.pdf>.
- [210] relaxed scan mit CHEMSHELL. https://www.chemshell.org/sites/www.chemshell.org/files/docs/tcl-chemshell/tutorial/pe_surface.html#dlf.
- [211] ChemShell Tools: Restraints. <https://www.chemshell.org/sites/www.chemshell.org/files/docs/tcl-chemshell/manual/tools.html#restraints>.

Liste der verwendeten Abkürzungen

Asp	Aspartat
CI	<i>Climbing Image</i>
Cys	Cystein
DFT	Dichtefunktionaltheorie
E···I-K	nicht-kovalenter Enzym-Inhibitor-Komplex
E-I-K	kovalenter Enzym-Inhibitor-Komplex
EWG	<i>electron withdrawing group</i> , elektronenziehende Gruppe
GM II	Golgi α -1,3-1,6-Mannosidase II
GO	Geometrieoptimierung
Hal	Halogen
H-Bindung	Wasserstoffbrückenbindung
HF	Hartree-Fock
His	Histidin
Int	Intermediat
KP	kovalenter Pfad
MEP	Minimumenergiepfad
MD	Molekulardynamik-Simulation
MM	Molekularmechanik
NEB	<i>Nugded Elastic Band</i>
N-Me-Pip	N-Methyl-Piperazyl-
NP	nicht-kovalenter Pfad
OCI	Oxo-Carbenium Ion
PDB	Protein Data Bank
PES	<i>Potential Energy Surface</i> , Potentialhyperfläche
QM	Quantenmechanik
QM/MM	Quantenmechanik/Molekularmechanik
RMSD	<i>Root Mean Square Deviation</i>
SO	<i>Single Point</i> , Einzelpunkt-Berechnung der Energie
TD	Thermodynamik
VS	Vinylsulfon
WW	Wechselwirkung
ÜZ	Übergangszustand
XP	X-ray-Pfad

Liste der wissenschaftlichen Beiträge

Teile dieser Arbeit wurden in Form von Posterbeiträgen und (Kurz-)Vorträgen auf den folgenden Konferenzen und Workshops vorgestellt:

1. 11/2012, Apetizer und Poster "Theoretical study on new covalent reversible inhibitors" auf 7. Joint Ph.D. Students Meeting in Freudenstadt/Lauterbad: "New drugs and targets to fight against infectious diseases" (SFB 766, SFB 633).
2. 12/2014, Poster "Design of new covalent reversible inhibitors of Golgi-alpha-Mannosidase II" auf 8th Joint Ph.D. Students Meeting in Retzbach: "New Trends in infectious disease research" (SFB 630, SFB 766 und FOR 854)
3. 04/2015, Poster "Theoretical study on new covalent reversible inhibitors" auf AMBER Workshop in Haifa: "Molecular Dynamics Simulation with the Amber Modeling Suite".
4. 07/2015, Poster "Design of New Covalent Reversible Inhibitors" auf Conclusion - Final Symposium "Best of SFB 630" in Würzburg
5. 08/2015, Talk "Design of New Covalent Reversible Inhibitors" auf 10. European Conference on Computational Chemistry (EuCOCC 2015) in Fulda.

Teile dieser Arbeit wurden in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Tanja Schirmeister, Jochen Kesselring, Sascha Jung, Thomas H. Schneider, Anastasia Weickert, Johannes Becker, Wook Lee, Denise Bamberger, Peter R. Wich, Ute Distler, Stefan Tenzer, Patrick Johè, Ute A. Hellmich and Bernd Engels,
Quantum Chemical-Based Protocol for the Rational Design of Covalent Inhibitors.

J. Chem. Soc., 2016, 138, pp. 8332-8335. doi:10.1021/jacs.6b030

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die durch ihre fachliche oder persönliche Unterstützung zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben. In erster Linie danke ich herzlich Prof.Dr. Bernd Engels für die hochinteressante und interdisziplinäre Themenstellung in einem praxisnahen Forschungsgebiet der Theoretischen Chemie. Sein hervorragendes Fachwissen und seine umfassende und individuelle Betreuung förderten meine eigenständige wissenschaftliche Arbeit und trugen maßgeblich zum Gelingen dieser Dissertation bei. Vielen dank, dass ich die Ergebnisse in Haifa (AMBER-Workshop) als Poster und in Fulda (10th EuCO-CC 2015) als Talk präsentieren durfte. Die wissenschaftlichen Workshops im Kleinwalsertal haben meine Liebe zum Skifahren und zu den Bergen geweckt, an denen auch meine Familie teilnehmen konnte. Die Erinnerungen an die schönen Tage sind ein ständiger Begleiter meiner Skiferien mit der Familie! Außerdem danke ich ihm für die angenehme Arbeitsatmosphäre in der TC (Institut der Theoretischen Chemie) auf dem Campus Hubland Nord, wo die Antwort 42 lautet (und nicht nur durch die Berechnung)! Ich möchte mich auch bei Frau Ursula Rüppel für die angenehme Arbeitsatmosphäre (nicht zuletzt durch die ermöglichten Dailys an der tollen Jura!) und die gute kollegiale Führung der TC bedanken: Liebe Uschi vielen Dank, dass Du mir immer mit Rat und Tat zur Seite standest! Für das gute Miteinander danke ich auch Prof.Dr. Volker Engel und seinen Mitarbeitern. Ein zusätzlicher Dank gebührt ihm für die Bereitschaft diese Arbeit als Zweitgutachter zu bewerten.

Einen ganz herzlichen Dank möchte ich Dr. Wook Lee und Dr. Thomas Schmidt aussprechen, da sie auf die vielen Fragen meinerseits eingegangen und mir den Einstieg in die wissenschaftliche Arbeit durch ihre zahlreichen Erfahrungen ermöglicht haben. Ich möchte zudem Dr. Jochen Kesselring für die Durchführung der Inhibitionsassays für Rhodesain am Johannes Gutenberg-Universität Mainz danken, da er mir einen Praxisbezug meiner Arbeit an der Enzyminhibition im Labor ermöglicht hat. Zudem danke ich ihm für die konstruktiven Vorbereitungen zu den gemeinsamen Vorträgen der SFB630-Tagungen. An dieser Stelle danke ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG), die im Rahmen des SFB630 zur finanziellen Unterstützung meiner Arbeit beigetragen hat. Einen ganz besonderen Dank geht an Dr. Daniel Bellinger für die Korrektur dieser Dissertation, da er mir die Abgabe dieser Arbeit auf den Weg gebracht hat.

Ein weiterer dank gilt allen (ehemaligen) Mitgliedern der Arbeitskreise Engels/Engel, dass sie mich sehr freundlich aufgenommen und mir eine sehr gute und familiäre Arbeitsatmosphäre (bereits bei der Anfertigung der Diplomarbeit) bereitet haben. An dieser Stelle geht mein besonderer Dank an

- Dr. Vera Stehr für die tollen Unterhaltungen bezüglich Skriptsprachen und

die netten Zeiten bei den Unterhaltungen in den Kaffeepausen

- Dr. Volker Settels für die tolle Einführung in die Welt der DFT und eine unvergessliche Stimmung auf dem Erlanger Bergfest
- Dr. Thomas Schmidt für die Unterstützung bei den technischen Schwierigkeiten der laufenden QM/MM-Berechnungen und einem tollen Austausch bei den Kaffeepausen, CHEMSHELL-World!
- Dr. Wook Lee für die Unterstützung beim technischen Einstieg in die MM-Berechnungen, AMBER-World!
- Dr. Kai Ansorg, Dr. Johannes Becker und Dr. Daniel Bellinger und allen im Arbeitskreis Prof. Dr. Engels danke ich besonders für die tolle und unvergessliche Zeit in der TC abseits TC wie z.B. beim ChemCup, Grillabenden, Weißwurst-Frühstücken, Gartenpartys, Faschings- und Themenpartys, Festivals, einer Hochzeit, beim Computerbauen, Kino- und Bowlingabenden uvm.

Nicht zuletzt möchte ich natürlich meiner Familie danken, dass sie mir auf dem langen Weg zur Promotion stets den Rücken freigehalten hat und mich emotional unterstützt hat. Vielen Vielen Dank!

Anastasia Weickert

