

**Kombinierte quanten- und
molekularmechanische
Untersuchungen zur Acylierung
von Klasse A β -Lactamasen**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Johannes C. Hermann

aus Frankfurt am Main

Düsseldorf 2004

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Hans-Dieter Höltje

1. Korreferent: Prof. Dr. Uwe Kuckländer

2. Korreferent: Prof. Dr. Michael Wiese

Tag der mündlichen Prüfung: 23. Januar 2004

Die vorliegende Arbeit wurde von März 2000 bis Dezember 2003 am Institut für Pharmazeutische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H.-D. Höltje angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. H.-D. Höltje für die Überlassung des interessanten Themas, für seine ständige Diskussionsbereitschaft und die idealen Arbeitsbedingungen am Lehrstuhl sowie seine große Unterstützung bei der Realisation von zwei längeren Forschungsaufenthalten an der Universität von Bristol in England.

Herrn Dr. A.J. Mulholland danke ich sehr für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe in Bristol mitarbeiten und die dort vorhandenen Computerressourcen nutzen zu können. Darüber hinaus danke ich ihm und Herrn Dr. L. Ridder für die problemlose Zusammenarbeit während der letzten drei Jahre und ihre Unterstützung beim Umgang mit QM/MM-Methoden.

Herrn Prof. Dr. U. Kuckländer und Herrn Prof. Dr. M. Wiese danke ich herzlich für die Anfertigung der Gutachten.

Für meine Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	13
1.1	Penicillin – ein Wundermittel gegen Infektionen?.....	15
1.2	Die Bakterienzellwand.....	18
1.2.1	Aufbau des Mureins.....	18
1.2.2	Murein-Biosynthese.....	20
1.3	<i>Penicillin Recognizing Enzymes</i>	21
1.3.1	Einteilung der PREs.....	21
1.3.1.1	<i>Penicillin Binding Proteins</i> (PBPs).....	21
1.3.1.2	β -Lactamasen.....	23
1.3.2	Struktur.....	25
1.3.2.1	Primärstruktur.....	25
1.3.2.2	Sekundär- und Tertiärstruktur.....	27
1.3.2.3	Aktives Zentrum von TEM1.....	29
1.4	β -Lactam-Antibiotika.....	31
1.4.1	Strukturen und Einteilung.....	31
1.4.2	Reaktivität gegenüber PBPs.....	32
1.4.3	Resistenzen gegen β -Lactam-Antibiotika.....	34
1.5	Kinetik.....	35
1.6	Reaktionsmechanismus der Klasse A β -Lactamasen.....	36
1.6.1	Acylierung.....	36
1.6.1.1	Lys73 als <i>General Base</i>	38
1.6.1.2	Glu166 als <i>General Base</i>	40
1.6.1.3	Weitere Mechanismushypothesen.....	41
1.6.1.4	Protonierung des β -Lactamstickstoffs.....	42
1.6.2	Deacylierung.....	43
2	PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG	45
3	METHODEN	49
3.1	Das CHARMM-Kraftfeld.....	51
3.1.1	Fixieren und <i>Restrainen</i> von Atomen.....	51
3.1.2	<i>Cutoff</i> und Dielektrizitätskonstante.....	52
3.1.3	Energien von Wasserstoffbrücken.....	52
3.1.4	„Shake“-Algorithmus.....	52

3.2	Geometrieoptimierungen und Moleküldynamik-Simulationen	53
3.3	Root-Mean-Square-Wert	54
3.4	QM/MM – Kombinierte quantenmechanische/molekularmechanische Methoden	54
3.4.1	Möglichkeiten der QM/MM-Anwendungen.....	54
3.4.2	Methodik.....	56
3.4.2.1	Partitionierung des Systems.....	56
3.4.2.2	Der System-Hamiltonian.....	58
3.4.2.3	Link-Atome	61
3.5	Energie-Korrekturen von AM1	64
3.6	Modellierung von Reaktionen	65
4	ERGEBNISSE	69
4.1	Vorgehensweise	71
4.1.1	Auswahl der Klasse A β -Lactamase	71
4.2	Moleküldynamik-Simulationen des aktiven Zentrums	72
4.2.1	RMSD-Wert Analyse.....	73
4.2.2	Wasserstoffbrücken des aktiven Zentrums.....	75
4.2.2.1	Ser70-Lys73 (neutral) Wasserstoffbrücke.....	76
4.2.2.2	Wasserstoffbrücken des katalytischen Wassers (Wat307)	76
4.3	Elektrostatistisches Umfeld von Lys73	78
4.4	Validierung der AM1-Methode für Benzylpenicillin	80
4.4.1	Ringgeometrie.....	81
4.4.2	sp^2 - Stickstoffgeometrie	83
4.4.3	Korrekturrechnungen der AM1-Energien	84
4.5	Aufbau des QM/MM-Systems	85
4.5.1	Kristallstruktur	86
4.5.2	Rückmutation der E166N-Mutante.....	86
4.5.3	Wasserstoffatome	87
4.5.4	Optimierung des katalytischen Wassers(Wat290) und der Wasserstoffatome.....	87
4.5.5	QM-Region.....	88
4.5.6	Solvatisierung und Formung des Systems	89
4.5.7	Relaxation und Vollminimierung	91
4.6	Michaelis-Menten Komplex	95
4.6.1	Wechselwirkungen: Benzylpenicillin – aktives Zentrum.....	96
4.6.2	Wechselwirkungen: Aktives Zentrum.....	98

4.7	Berechnung der Acylierungsreaktion.....	99
4.7.1	Acylierung 1. Schritt: Bildung des tetrahedralen Zwischenprodukts.....	99
4.7.1.1	Aktivierung von Ser70	100
4.7.1.2	Nucleophiler Angriff und Ser70-Deprotonierung	105
4.7.1.3	Nucleophiler Angriff, Ser70 Deprotonierung und Protonentransfer zu Glu166	109
4.7.2	Acylierung 2. Schritt: Bildung des Ser70-Enzym-Esters.....	114
4.7.2.1	Protonierung des Thiazolidinstickstoffs und Ser130-Reprotonierung	115
4.7.2.2	β -Lactamringspaltung und Protonierung des Thiazolidinstickstoffs	118
4.7.2.3	β -Lactamringspaltung und Protonenverschiebung von Lys73 über Ser130 zu dem Thiazolidinstickstoff	120
4.7.2.4	Protonentransfer von Glu166 zu Lys73.....	126
4.8	Aminosäuren-Dekompositionsanalyse	130
4.8.1	Met69, Ser70, Gly236, Ala237 - <i>Oxyanion Hole</i>	134
4.8.2	Asn132.....	138
4.8.3	Asn170.....	142
4.8.4	Lys234, Ser235, Arg244 und Arg275	145
5	DISKUSSION	153
5.1	General Base.....	155
5.2	Molekularer Reaktionsmechanismus	158
5.3	Einfluss der Proteinumgebung	164
5.4	Vergleich von Ergebnissen.....	167
5.4.1	Ergebnisse experimenteller Untersuchungen.....	167
5.4.2	Ergebnisse theoretischer Untersuchungen.....	168
6	ZUSAMMENFASSUNG	171
7	LITERATUR	175
8	ANHANG	189

1 EINLEITUNG

1.1 Penicillin – ein Wundermittel gegen Infektionen?

Die Entdeckung des Penicillins gilt als größter Meilenstein in der Geschichte der Entwicklung von Antibiotika. Als Entdecker des Penicillins wird der Schotte Alexander Fleming angesehen, der 1929 nach einer zufälligen Verunreinigung einer pathogenen *Staphylococcus aureus*-Kultur mit Pilzsporen von *Penicillium notatum* einen Hemmhof feststellte und so auf die bakterizide Wirkung von Stoffwechselprodukten des Pilzes schloss [1]. Tatsächlich war er jedoch nicht der Erste, dem dieser Effekt auffiel. Bereits 1872 hat der Arzt Joseph Lister in einem Brief geschrieben: „Sollte sich ein geeigneter Fall einstellen, werde ich *Penicillium glaucum* [-Extrakt] einzusetzen versuchen und beobachten, ob das Wachstum der Organismen [Bakterien] in menschlichem Gewebe gehemmt wird.“ 1892 war es der französische Medizinstudent Ernest Duchesne, der eine Arbeit über die Wirkung von *Penicillium*-Pilzen auf Bakterienwachstum anfertigte, die allerdings nicht die entsprechende Aufmerksamkeit fand, andernfalls hätte die Erfolgsgeschichte des Penicillins unter Umständen schon 50 Jahre früher beginnen können.



Abbildung 1.1 Die *Staphylococcus aureus*-Petrischale Flemings mit durch *Penicillium notatum*-Sporen verursachten Hemmhöfen

Fleming hatte wohl die Bedeutung seiner Entdeckung erkannt, es gelang ihm jedoch nicht, die verantwortliche Substanz aufgrund ihrer Instabilität zu isolieren, so dass er seine Bemühungen einstellte und seine letzte Publikation über das Penicillin 1931 veröffentlichte.

Um 1940 gelangen dem Australier (Lord) Howard Walter Florey und (Sir) Ernst Boris Chain, einem jüdischen Flüchtling deutsch-russischer Abstammung, in Oxford nicht nur die Isolierung der bakteriziden Verbindungen, sondern auch die Durchführung einer ersten erfolgreichen klinischen Testreihe, so dass das

Penicillin und dessen Derivate von da an ihren Siegeszug durch Therapie und Pharmaentwicklung antreten konnten [2]. Sowohl Fleming als auch Florey und Chain erhielten 1945 für ihre Forschungen den Nobelpreis für Physiologie und Medizin.

Bereits während ihrer Untersuchungen fiel Florey und Chain auf, dass einige Stämme von *Escherichia Coli* Bakterien in der Lage waren Penicillin zu spalten. Die damals sogenannten „Penicillinase“-Enzyme wurden schnell in β -Lactamasen umbenannt. Sie verbreiteten sich unaufhaltsam über die meisten Bakterienarten. 1941 waren noch alle *Staphylococcus aureus* Stämme Benzylpenicillin-sensibel, 1944 wurde jedoch schon von Problemen in der Therapie berichtet. Die große Influenza-Pandemie 1957/58 wurde begleitet von der Verbreitung eines Penicillin-resistenten Stamms von *Staphylococcus aureus*. Die Entwicklung von „Super- β -Lactamen“, den sogenannten „ β -Lactamase-stabilen“ Penicillinen, brachte nur kurzen Aufschub. Die nun als „Superbugs“ bezeichneten Mikroorganismen, allen voran die MRSA-Keime (MRSA – *Methicillin resistant Staphylococcus aureus*) entwickelten erneut Resistenzen. Die verschiedenen MRSA-Stämme stellen bei den Infektionen durch Hospitalkeime die größte Gruppe dar und ihre Verbreitung scheint unaufhaltsam. Allein im deutschsprachigen Raum ist von 1998 bis 2001 der MRSA-Anteil aller isolierten *Staphylococcus aureus* Stämme von 15 auf 20 % angestiegen [3].

Gegenwärtig sind *Pseudomonas aeruginosa*-, *Serratia spp.*-, *Enterobacter cloacae*- und vor allem MRSA-Kulturen bekannt, die gegen fast¹ jedes β -Lactam² (und viele andere Antibiotika) resistent geworden sind.

Die Kenntnis des molekularen Wirkungsmechanismus von β -Lactam-Antibiotika könnte die Möglichkeit zu einer zielorientierten Modifikation dieser Verbindungen eröffnen und damit einen entscheidenden Fortschritt bei der Bekämpfung von Bakterien ermöglichen. Allerdings konnte bisher weder der Reaktionsmechanismus der Enzyme, die als Zielstruktur der β -Lactam-Antibiotika dienen, noch der der defensiven β -Lactamasen aufgeklärt werden.

¹ Für neue in die Therapie eingeführte β -Lactam-Antibiotika wie z.B. Ertapenem gelten MRSA-Stämme noch als sensibel.

² Im pharmazeutischen Sprachgebrauch versteht man unter der eigentlich nicht ausreichenden Bezeichnung „ β -Lactam“ die Gruppe der β -Lactam-Antibiotika.

Die vorliegende Arbeit soll durch Anwendung aktuellster *Molecular Modelling* Methoden einen Beitrag zur Aufklärung des Reaktionsmechanismus von β -Lactamasen leisten.

Im Folgenden werden die Wirkungsweise und die Zielstrukturen von β -Lactam-Antibiotika sowie Abwehrmechanismen der Bakterien dargestellt werden.

1.2 Die Bakterienzellwand

Für die Entwicklung nebenwirkungsarmer Chemotherapeutika¹ ist es wichtig, Zielstrukturen in der prokaryotischen Bakterienzelle zu adressieren, die sich von denen der eukaryotischen Säugetierzelle weitgehend unterscheiden oder im Idealfall erst gar nicht vorhanden sind.

Die Zellwand von Bakterien ist ein derartiges „ideales“ *Target*², da sie in Form des Mureins eine essenzielle Struktur besitzt, die in der Säugetierzelle nicht vorhanden ist. Sowohl die Zellwände gramnegativer als auch die der grampositiven Bakterien besitzen als unverzichtbaren Bestandteil das Murein, auch wenn sich der restliche Aufbau der Zellwände stark unterscheidet [4].

Zum besseren Verständnis der Wirkungsweise von β -Lactam-Antibiotika und der Notwendigkeit für ein Bakterium Abwehrmechanismen, wie die Enzymklasse der β -Lactamasen zu entwickeln, soll der grundsätzliche Aufbau und die Synthese des Mureins kurz erläutert werden.

1.2.1 Aufbau des Mureins

Die Grundstruktur des Mureins ist in grampositiven und in gramnegativen Bakterienstämmen identisch. Im Murein sind Polysaccharidketten über Peptidbrücken, die mehr oder weniger stark verzweigt sein können, miteinander verknüpft, daher wird das Murein auch als Peptidoglykan bezeichnet (s. Abbildung 1.2). Eine einzelne Polysaccharidkette setzt sich aus einer sich wiederholenden Disaccharideinheit zusammen, die aus mit β -D-N-Acetyl-Glucosamin 1-4 glykosidisch verknüpfter β -D-N-Acetyl-Muraminsäure besteht. Die N-Acetyl-Muraminsäuren sind über ihre Carbonsäurefunktion mit einem L-Alanin verbunden, das alternierend mit weiteren L- und D-Aminosäuren peptidisch verknüpft ist. Das Ende der Seitenkette besteht jedoch immer aus einem D-Alanyl-D-alanin-Rest. Zur Stabilisierung des Mureins sind benachbarte Proteoglykan-Ketten über ihre Peptidseitenketten kovalent miteinander verbunden. Gramnegative Bakterien sind über die Aminosäuren an Position 3 und 4 (jeweils eine Diaminosäure und ein D-Alanin) zweier verschiedener

¹ β -Lactame sind aufgrund ihrer Herkunft aus einem Organismus als Antibiotika zu bezeichnen. Der Begriff Chemotherapeutika, der sich ursprünglich nur auf rein synthetisch gewonnene Substanzen bezog, hat sich jedoch als Oberbegriff weitgehend durchgesetzt.

² Ein „*Target*“ ist die Struktur, mit der ein Wirkstoff interagiert und dadurch eine Wirkung hervorruft.

Proteoglykan-Seitenketten direkt miteinander verbunden. Grampositive Bakterien dagegen verknüpfen in der Regel diese Aminosäuren über ein Interpeptid, dessen Zusammensetzung je nach Bakterienstamm stark variieren kann. Der Hauptunterschied neben der Quervernetzungsart besteht jedoch in der Dicke der Mureinschicht. Bei gramnegativen Bakterien ist diese nur ca. 25 Å dünn, bei grampositiven Bakterien kann sie bis zu 100 Å dick werden.

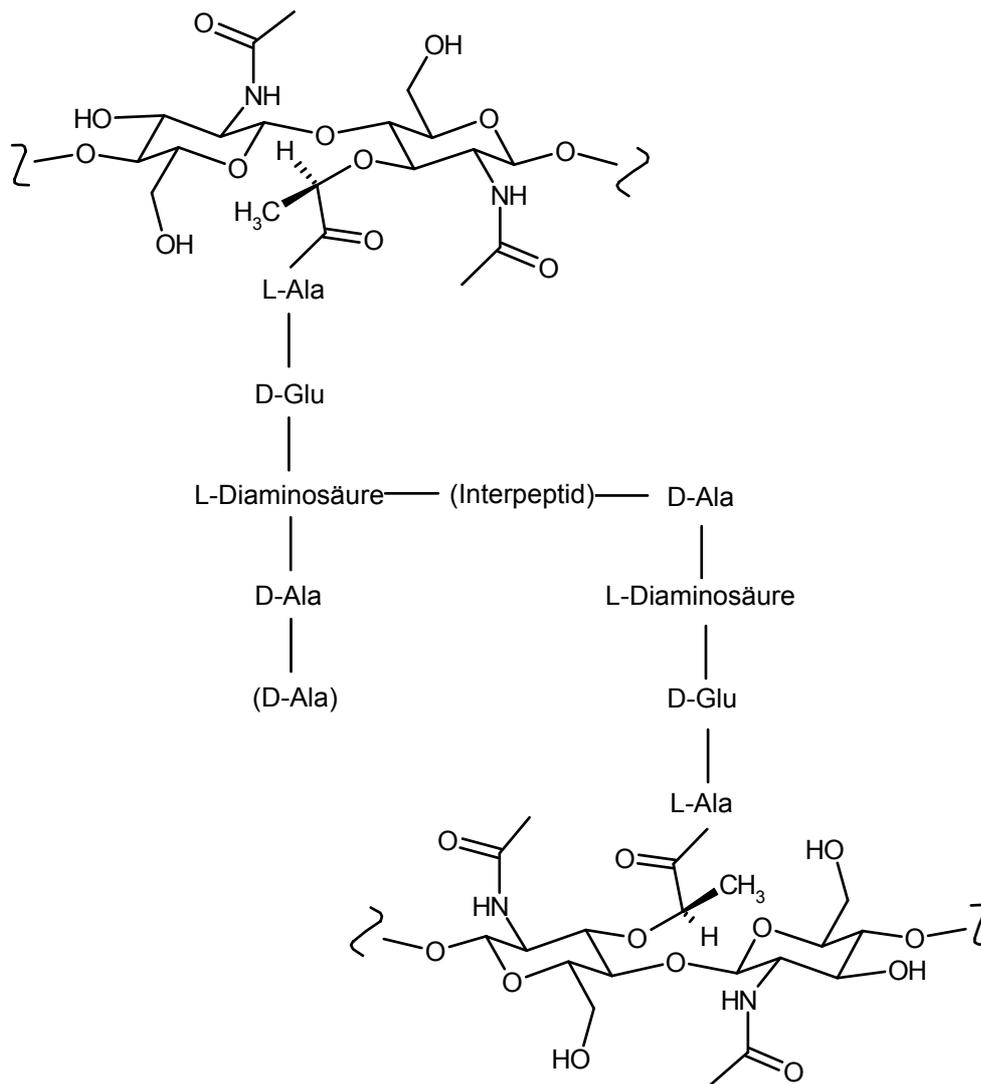


Abbildung 1.2 Aufbau der Mureinschicht in der bakteriellen Zellwand.
 G = N-Acetyl-Glucosamin
 M = N-Acetyl-Muraminsäure

Im Gegensatz zu dem in Funktion und Struktur ähnlichen Chitin¹ ist die Struktur des Mureins nicht kristallin [5], sondern gleicht eher der eines viskosen Gels [6], das sich bis zu dem Vierfachen seiner Breite dehnen lässt [7]. Das Murein ist dennoch der stabilitätsgebende Bestandteil der Zellwand [8][9]. Bei einer nicht intakten Mureinschicht kann die Plasmamembran allein dem intrazellulären osmotischen Druck nicht standhalten und es kommt zur Zellyse.

1.2.2 Murein-Biosynthese

Die Biosynthese des Mureins ist ein komplexer Prozess und gliedert sich in einen intrazellulären und einen extrazellulären Teil [10][11]. Intrazellulär werden die Bestandteile synthetisiert, die später nach Transport in den extrazellulären Raum (grampositiv) oder in den periplasmatischen Raum (gramnegativ) polymerisiert werden.

An der Innenseite der Plasmamembran befinden sich die Enzyme, die ausgehend von Fructose-6-Phosphat über einen mehrstufigen Prozess ein C₅₅-Disaccharid-pentapeptid, das Undecaprenol, synthetisieren. Diese kleinste Untereinheit des Mureins wird nach Transport aus der Zelle während der extrazellulären Syntheseschritte an die Murein-Glykankette durch eine Transglycosylierungsreaktion geknüpft und über eine Transpeptidation im peptidischen Teil quervernetzt. Sowohl die Transglycosylierung als auch die Quervernetzung werden von der gleichen Klasse von Enzymen, den Penicillin-bindenden Proteinen (PBPs siehe Kapitel 1.3.1.1), katalysiert. Den entscheidenden, durch β -Lactam-Antibiotika hemmbaren Schritt, stellt hierbei die Quervernetzung des Peptidteils dar. Das PBP reagiert im ersten Schritt mit dem endständigen D-Alanyl-D-alanin-Rest der Peptidseitenkette. Dabei kommt es zur Acylierung des PBPs an seiner aktiven Aminosäure, einem Serin, und zur Abspaltung eines D-Alanins an der Peptidbindung. Drei Reaktionen können nun konkurrierend ablaufen:

1. Das Acylenzym akzeptiert als Nucleophil die terminale Aminogruppe des Interpeptids (grampositiv) bzw. der L-Diaminosäure (gramnegativ) einer anderen Peptidseitenkette. Es kommt zur Quervernetzung des Mureins und zur Aminolyse des Serinesters, wobei das Enzym regeneriert wird [12][13].

¹ Chitin ist ein 1-4 glykosidisch verknüpftes β -D-N-Acetyl-Glucosamin-Polysaccharid.

2. Das Acylenzym wird durch Wasser hydrolysiert. Das Enzym regeneriert sich, aber die Untereinheit kann nicht mehr über den eigenen D-Alanyl-D-alanin-Rest quervernetzt werden, da ein Alanin abgespalten wurde [14]. Das ist eine wichtige Reaktion zur Steuerung des Ausmaßes der Quervernetzung.
3. Das Acylenzym wird durch das bereits abgespaltene Alanin wieder regeneriert. Es ist dabei zwar zu keiner Quervernetzung gekommen, aber diese ist noch möglich, da das Substrat des PBPs, der D-Alanyl-D-alanin-Rest wiederhergestellt wurde [15].

1.3 Penicillin Recognizing Enzymes

Penicillin Recognizing Enzymes (PREs) bilden die Gesamtheit aller Enzyme, die mit Penicillin bzw. anderen β -Lactam-Strukturen interagieren können, diese also aufgrund ihrer strukturellen Eigenschaften „erkennen“ können. Sie lassen sich weiter unterteilen und werden im Folgenden vorgestellt.

1.3.1 Einteilung der PREs

1.3.1.1 Penicillin Binding Proteins (PBPs)

Die penicillinbindenden Proteine, die PBPs, sind die eigentlichen *Targets* von β -Lactam-Antibiotika und wurden erst wegen ihrer Eigenschaft, Penicillin zu binden, entdeckt und 1972 das erste Mal isoliert. Zu dieser Zeit konnte man sich jedoch noch nicht ihre Funktion oder den Grund ihrer Bindungseigenschaft für Penicilline erklären [16]. 1974 gelang die Aufklärung ihrer Funktion und 1975 konnten durch Gel-Elektrophorese die PBPs weiter voneinander getrennt werden, so dass ein System zu ihrer Einteilung etabliert werden konnte, das bis heute Gültigkeit besitzt [17]-[19].

Nahezu alle PBPs sind membrangebundene Enzyme, die durch einen „Membran-*linker*“ mit der Zellmembran verbunden, im periplasmatischen Spalt bzw. im Extrazellulärraum lokalisiert sind. Die physiologische Funktion von PBPs ist der Auf- bzw. Abbau sowie die Instandhaltung der Mureinschicht in der bakteriellen Zellwand. Mit Ausnahme eines zinkabhängigen Proteins enthalten alle Enzyme dieser Klasse in ihrem aktiven Zentrum ein katalytisch essenzielles Serin, haben aber keinerlei strukturelle oder sequenzielle Ähnlichkeit mit der großen Familie der Serin-Proteasen. Dies kann als Beispiel dafür angesehen werden, wie sich in der Evolution das gleiche mechanistische Grundprinzip,

nämlich die Nutzung eines als Nucleophil wirkenden Serins als katalytisch unabdingbare Aminosäure, durchgesetzt hat.

Bei der Behandlung von Bakterien mit Penicillinderivaten binden die PBPs die β -Lactame aufgrund deren Strukturähnlichkeit zu ihrem natürlichen Substrat, dem D-Alanyl-D-alanin (s. Kapitel 1.4). Im Gegensatz zum natürlichen Substrat können PBPs das β -Lactam nicht oder nur sehr langsam wieder abgeben, so dass sie nicht mehr imstande sind ihre physiologische Funktion auszuüben. Das Bakterium kann sich ohne die Funktion der PBPs weder ausdifferenzieren noch den Umgebungsbedingungen anpassen oder sich durch Zellteilung vermehren. Durch fehlende Erneuerung der Quervernetzung der Mureinschicht kann es zur Lyse der Zelle kommen.

Ob ein β -Lactam-Antibiotikum bakteriostatisch oder bakterizid wirkt, hängt, außer von den Resistenzmechanismen des betroffenen Keims, im Wesentlichen vom Spektrum der inhibierten PBPs ab. Jedes Bakterium besitzt eine Vielzahl von verschiedenen PBPs, die sich außer in ihrer Struktur und Funktion auch in ihrer Sensibilität gegenüber den unterschiedlichen β -Lactam-Antibiotika unterscheiden. Für einige Ausnahmen (z.B. PBPs 2, 3 von *E.Coli*) konnte gezeigt werden, dass unter β -Lactam-Behandlung deren Inhibition alleine für die bakterizide Wirkung verantwortlich ist [20], generell aber hängt dies von dem Ausmaß der Inhibierung aller PBPs ab. Es gibt auch PBPs, die nicht in die Zellwandsynthese involviert sind, sondern als empfindlicher Signal-Geber für β -Lactam-Antibiotika dienen und so die Abwehrmechanismen eines Bakteriums steuern (z.B. Synthese von β -Lactamasen, s. Kapitel 1.3.1.2) [21].

PBPs werden untereinander entsprechend ihrer Masse eingeteilt, wobei zwei Hauptklassen unterschieden werden, die jeweils aufgrund von Sequenzhomologien in drei weitere Klassen unterteilt werden [15].

Die sogenannten **High Mr PBPs** (HMW-PBPs, Klasse A-C, Molekulargewicht ~60 kDa – 100 kDa) sind bifunktionelle Enzyme und aus mehreren Domänen zusammengesetzt. Die penicillin-bindende Domäne hat die Funktion einer DD-Transpeptidase und ist für die Quervernetzung des Mureins verantwortlich. Die Inhibition von *High Mr* PBPs ist ausschlaggebend für das Absterben des Bakteriums unter β -Lactam-Einfluss. Die Funktionen der anderen Domänen der verschiedenen *High Mr* PBPs sind weiterhin nicht endgültig geklärt, wenn auch

für einige (z.B. PBPs 1A, 1B¹ von *E.Coli*) Transglycosylaseaktivität gezeigt werden konnte [22][23].

Die niedermolekularen **Low Mr PBPs** (LMW-PBPs, Klasse A-C, Molekulargewicht ~25 kDa – 40 kDa; EC 3.4.16.4) sind monofunktionale Enzyme. Sie stammen von *High Mr* PBPs ab [24][25] und können auch als DD-Transpeptidase wirken, haben aber überwiegend den Charakter einer DD-Carboxypeptidase. Durch Abspalten des terminalen D-Alanins haben sie so einen regelnden Einfluss auf die Transpeptidaseaktivität der *High Mr* PBPs und das Ausmaß der Quervernetzung. Bakterien sind allerdings bei Inaktivierung von *Low Mr* PBPs im Gegensatz zu einer Inhibition von *High Mr* PBPs zumeist noch überlebensfähig, so dass die bakterizide Wirkung von β -Lactam-Antibiotika nicht auf die Blockade von *Low Mr* PBPs zurückgeführt werden kann [26].

1.3.1.2 β -Lactamasen

Durch die natürliche Konfrontation mit β -Lactam-Antibiotika und den dadurch entstandenen Evolutionsdruck, hat sich ausgehend von den PBPs eine neue PRE - Klasse entwickelt, die der β -Lactamasen (EC 3.5.2.6) [25][27][28].

Diese ca. zwischen 30 und 40 kDa schweren Enzyme haben im Unterschied zu PBPs die Fähigkeit, ein β -Lactam nicht nur zu binden, sondern nach Spaltung des Lactamrings auch wieder abzugeben. Die entlassenen Substanzen haben dann einen hydrolysierten Lactamring und so keine antibiotische Potenz mehr. Einige besitzen einen Membran-*Linker* [29], die Mehrheit aber sind lösliche Enzyme. Als defensive Enzyme zum Schutze von PBPs sind β -Lactamasen dort, wo PBPs aktiv sind, ebenfalls in hoher Aktivität vorhanden. Grampositive Bakterien sezernieren ihre β -Lactamasen in das umgebende Milieu, wohingegen gramnegative Bakterien sie im periplasmatischen Spalt konzentrieren.

Der Selektionsvorteil von β -Lactamase-produzierenden Bakterien ist so groß gewesen, dass es zu Parallelentwicklungen unterschiedlicher Klassen von β -Lactamasen gekommen ist. Die stetige Weiterentwicklung ist zudem durch den breiten Einsatz von β -Lactam-Antibiotika in der Therapie verstärkt worden. Bis heute sind bereits über 250 verschiedene β -Lactamasen beschrieben

¹ Auch die Unterklassen wie z.B. PBP 1 lassen sich inzwischen weiter unterteilen (PBP 1A, PBP 1B etc.)

worden. Meist sind β -Lactamasen plasmidcodiert, so dass deren Gene eine hohe Mobilität besitzen und die Vererbung auch zwischen verschiedenen Spezies möglich ist.

Die ersten Einteilungen der β -Lactamasen richteten sich nach Substratspektrum [30], Genlokalisierung [31] sowie dem isoelektrischen Punkt [32]. Sie erwiesen sich jedoch allesamt als nicht ausreichend genug.

1980 wurde von *Ambler et al.* eine Einteilung der β -Lactamasen in 4 Klassen (A, B, C und D) entsprechend ihrer Aminosäure-Sequenzhomologien vorgestellt, die bis heute Gültigkeit besitzt [33]. Danach zählen die β -Lactamasen der Klasse A, C und D zu den „*Active-Site-Serine*“-Enzymen, die ein aktives Serin in ihrem katalytischen Zentrum enthalten. Vertreter der Klasse B gehören zu den zinkabhängigen Enzymen.

Bezeichnungen einzelner Klassen nach ihrem Spektrum sind vereinzelt noch gebräuchlich, so dass die β -Lactamasen der Klasse A auch als Penicillinasen, die der Klasse C als Cephalosporinasen und die der Klasse D auch als Oxacillinasen bezeichnet werden [34]. Diese Bezeichnungen sind allerdings nicht sehr sinnvoll, da das Spektrum der einzelnen Klassen breiter ist und durch Mutationen stetig größer wird. Trotzdem lässt sich aus der ursprünglichen relativen Substratspezifität, die Entwicklung der unterschiedlichen Klassen von unterschiedlichen PBPs und eine nähere Verwandtschaft zu PBPs als zu anderen Lactamase-Klassen ableiten. Diese Vermutung von *Kelly et al.* [35] konnte später von *Matagne et al.* durch Bestimmung verschiedener Substratprofile sowie durch Untersuchungen zur Sequenzabstammung von *Massova & Mobashery* bestätigt werden (s. Abbildung 1.3) [25][36].

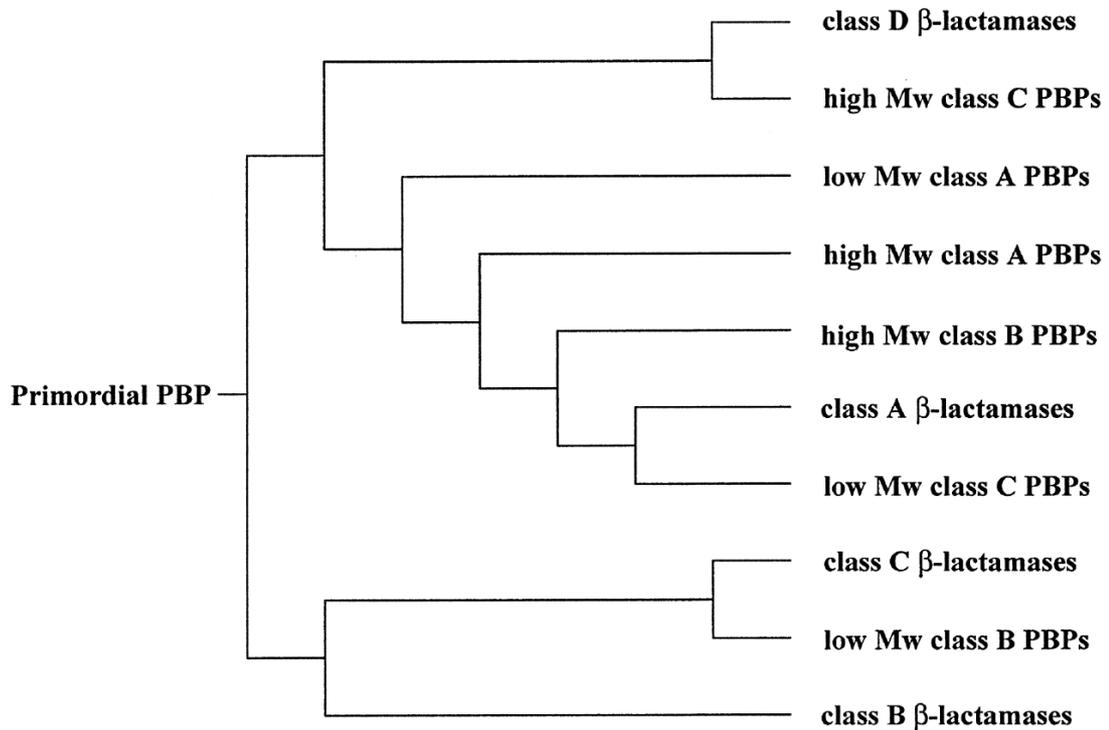


Abbildung 1.3 Vereinfachter Stammbaum der PREs [25]

Die Inaktivierung von β -Lactamen durch β -Lactamasen stellt den wichtigsten Resistenzmechanismus von Bakterien gegen diese Antibiotika dar. Dabei sind Klasse A β -Lactamasen die am weitesten verbreiteten [27], zu denen auch TEM1 von *E.Coli* gehört, das als Modellenzym für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen eingesetzt wurde.

1.3.2 Struktur

1.3.2.1 Primärstruktur

High Mr PBPs haben eine Sequenzhomologie von nur ca. 20%, was aber vor allem auf die Unterschiede in den nicht-penicillin-bindenden Domänen zurückzuführen ist [25]. In den penicillin-bindenden Domänen ist die Homologie zueinander sowie zu *Low Mr* PBPs und Lactamasen weitaus größer und kann innerhalb einer Klasse von β -Lactamasen bis zu 75% betragen. Drei strukturell konservierte Sequenzabschnitte werden in allen *Active-Site-Serine*-PREs wiedergefunden [25][33]: S*XXK, S(Y)XN und K(H/R)T(S)G (s. Abbildung 1.4; für Ein- und Dreibuchstabencode der Aminosäuren s. Anhang D).

Klasse A β -Lactamasen

	S*XXX	S(Y)XN	K(H/R)T(S)G
TEM-1, <i>E. coli</i>	61-EERFPMSTFKVLLCGAV-78	122-SAAITMSDNFAANL-135	223-LPAGWFIADKSGAGERGSR-241
Sme-I, <i>S. marcescens</i> S6	66-DERFPLCSSFKGLAAAV-83	127-SAALQYSDNGATNI-140	229-VPADVWVGLKTCSCGAIGT-247
<i>S. typhimurium</i> CAS-5	66-DERFAMCSTSKVMAAAV-83	127-AAALQYSDNTAMNK-140	228-LPKSWVVGDKTSGSDYGT-246
ROB-1, <i>H. influenzae</i> F990/LNPB51/A1	79-DERFAYASTFKALLAGAV-96	138-EAAVRESDNSATNL-151	239-TPTSWKVYDKSGAGKYGVR-257
I, <i>B. cereus</i> 5/B	82-NERFAYASTYKALAAGVL-99	141-EAAVRYSDNTAGNI-154	242-VPTDWDADKSGAGSYGTR-260
<i>B. subtilis</i> 168/6GM	82-NERFAYASTYKLAAGGF-99	141-EAAIRYSDNTAGNI-154	242-APIGWEVGDKSGAGSYGTR-260
<i>S. albus</i> G	82-DELFPMGSVFKLSSAAV-99	149-EVSITASDNCAANL-162	250-LPDDWTLGDKTACAGRYGTN-268
<i>S. aureus</i> PCI/SK456/NCTC9789	56-DKRFAYASTSKAINSAIL-73	115-EASMTYSDNTANNK-128	216-VPKDYKVAKSKQAITTYAS-234
OHIO-1, <i>E. cloacae</i>	59-DERFPMNSTFKVLCGAG-76	120-AAAITNSDNAAANL-133	221-LPAGWFIADKTCAGGERGAR-239
SHV-1, <i>K. pneumoniae</i>	59-DERFPMNSTFKVLCGAV-76	120-AAAITNSDNAAANL-133	222-LPAGWFIADKTCAGGERGAR-240

Klasse C β -Lactamasen

<i>C. freundii</i> OS60/GN346	77-QTLFELGSVSKTFNGVLG-94	164-PGAKRLYANSSIGL-177	326-PAVKASVWHKTCSTGGFGS-344
<i>E. coli</i> K12/MG1655	73-QTLFELGSVSKTFNGVLG-90	160-PGTQRLYANSSIGL-173	322-PAVRASVWHKTCSTGGFGS-340
P99, <i>E. cloacae</i> P99/Q908R/MHNI	77-QTLFELGSISKTFNGVLG-94	164-PGTTRLYANSSIGL-177	326-PPVKASVWHKTCSTGGFGS-344
<i>K. pneumoniae</i> NU2936	82-QTLFEIGSVSKTLTATLG-99	170-PGSHRQYNSPSIGL-183	328-ESGSQVLFNKTCSSNGFGA-346
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	83-ETLFEIGSVSKTFTATLA-100	171-PGSRQYNSPSIGL-184	333-ALEGQRLLNKTCSTNGFGA-351

Klasse D β -Lactamasen

OXA-18, <i>P. aeruginosa</i> Mus	58-DKAFAPMSTFKLFLAIMG-75	134-YVQRFYDGNKDVSG-147	201-EAGDWDVQKTCSTGLSDA-219
OXA-9, <i>K. pneumoniae</i>	56-ARRVSPCSSFKLFLAIMG-73	134-YVKKFEYGNQDVSG-147	202-AAEGWAVHCKSGSGWLRDN-220
OXA-2, <i>S. typhimurium</i> Type 1A	65-KKRYSPASTFKIHTLFA-82	140-YLKKIDYGNADPST-153	201-AGRNWILRAKTCSTWEGRMGW-219

High Mr PBPs

PBP1a, <i>M. leprae</i>	391-LVGDGAGSVFKIFTTAAA-408	458-TDALATSPNTAFAK-471	604-AGWDLPMSCKTGTTEAHR-624
PBP2, <i>S. aureus</i> SRM705	391-TDPHPGSSSLKPELAYGP-408	448-YDALRQSFNIPALK-461	574-GVSGVNMGAKTGTGTGAE-594
PBP1, <i>N. gonorrhoeae</i> FA19	454-QAMRQPGSTFKPFVYSAA-471	515-RQALTSKMNVSIR-528	642-ALGRTDIACKTGTNDNKD-662
PBP2x, <i>S. pneumoniae</i> R6	330-QSNYEPGSTMKVMMLAAA-347	389-SQGFASNSVGMTL-402	538-TVPGQNVALKSGTAQIAD-556
PBP2, <i>N. meningitidis</i> IDA	303-TDMIEPGSAMKPTIATA-320	356-RGIMQKSSNVGTSK-369	488-AVDGFDVGAKTGTARKLVN-506
PBP3, <i>E. coli</i> K12	300-TDVFEFGSTVKMVMVMTA-317	353-TGVLQKSSNVGVSK-366	485-AIKGYRIALKTGTAKKVG-503
PBP3, <i>H. influenzae</i> RD/KW20	320-TDTFEPGSTVKPFVVLTA-337	373-DEILMNSNRGVSR-386	503-MVEGYRVGKTGTARKIEN-521
PBP5, <i>E. hirae</i> R40	415-ATGYAPGSTFKIITAAIG-432	474-RNAMISDNLYMAQ-487	608-ATLGIPIAAKTGTAEIKEX-626
PBP5, <i>E. faecalis</i>	416-ATGYAPGSTFKIITGAIG-433	475-RTALVNSDNLYFAQ-488	609-YNPNFLAAKTGTAEIKDK-627
BLAR1, <i>S. aureus</i> NCTC9789	382-RKRYSPNSTYKLYLAMFG-399	457-QLKQLNYGNKLG-470	517-KNEKYELYKTKGTGIVNGK-535
BLAR1, <i>B. licheniformis</i> 749/C	395-TSRFAPASTYKVFALLA-412	470-YLKSINYGMEDFSV-483	530-ESNGRVLSGKTGTSVINGE-548

Low Mr PBPs

PBP7, <i>E. coli</i> K12/BHB2600	63-DLVRPIASISKMTAMVV-80	121-LLALMSENRAAAS-134	225-RDNWNIQLTKGTFTAAGH-245
PBP7, <i>H. influenzae</i> RD/KW20	38-DSIQPIASVTKIMTANVF-55	96-KAMLVHSDNYAABA-109	198-DEIFDAVNTKGTIQESGY-218
PBP5*, <i>B. subtilis</i> 168/Marburg	53-HQRRRIASITKIMTAVLA-70	109-YGLMLRSGNDAAVA-122	211-MLYPYSTGKTGTGKLAKR-231
<i>Streptomyces</i> sp. K15	57-DTRRSTGTTKIMTAKVV-74	119-YGLMLRSGCDAAYA-132	233-SSYSGAIGVKTGSGPEAKY-253
<i>Streptomyces</i> sp. R61	86-TDRFRVGSVTKSFSAVVL-103	184-PGAAYSNTNFVV-197	320-LSCGIVSYGHTGTGQYYT-338
<i>N. lactamdurans</i> LC411, PBP4	53-DSVPQSGSVAKVYATLV-70	146-PDVISYCSFGYAI-159	293-DWDGVPGYGHDSAGGQFS-311
PBP4, <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	75-NTLYQMASVSKLVTAWGV-92	180-PGEEFSYSGEGYTV-193	313-TTSGGAVICHDSGNPALN-331
PBP4, <i>E. coli</i> K12/MG1655	55-QQMALPASTQKVIITALAA-72	300-KIMLKNSDNMIADT-313	408-AGVDKGVSAKTGSLQGVYN-426
PBP4, <i>H. influenzae</i> RD/KW20	62-STPMLSASTQKVFATAVA-79	304-KMMKNSDNMIADS-317	411-PPLVKNVIAKTGSLKGVYN-429
PBP4, <i>Actinomadura</i> sp. R39	91-GEQLLPASNMLFTAAAA-108	341-VPFMKPSNMGHAEM-354	450-TAAEGVVEAKTGTMSGVSA-468

Abbildung 1.4 Konservierte Aminosäuren in PREs [25]
(Nummerierung nach entsprechendem Swiss-Prot Eintrag [37])

Durch Proteinfaltung kommen sich diese sequenziell weit voneinander entfernt liegenden Aminosäuren räumlich nahe und formen das aktive Zentrum, das bei Klasse A β -Lactamasen durch ein weiteres konserviertes Motiv - ein Pentapeptid (EXXXN) - definiert wird (s. Abbildung 1.7). Dieses Pentapeptid liegt auf dem nur in Klasse A β -Lactamasen vorkommenden, sogenannten Ω -Loop (s. Abbildung 1.5).

Klasse A β -Lactamase

	EXXXN
OHIO-1, <i>E. cloacae</i>	158-LDRWETELNEALPGDARDTTTA-179
SHV-1, <i>K. pneumoniae</i>	158-LDRWETELNEALPGDARDTTTP-179
LEN-1, <i>K. pneumoniae</i> LEN-1.....	158-LDRWETALNEALPGDARDTTTP-179
TEM-1, <i>E. coli</i>	160-LDRWEPENLNEAIPNDRDTTTP-181
<i>P. mirabilis</i> GN179.....	165-LDRWEPENLNEAVPGDKRDTTTP-186
PSE-4, <i>P. aeruginosa</i> Dagleish.....	157-LDRIEFDLNEGKLGDLRDTTTP-178
<i>R. capsulatus</i> SP108.....	166-LDRIEPKLNDFASGDERDTTSP-187
NMC, <i>E. cloacae</i> NOR-1.....	164-LDRWELDLNTEAIPGDERDTTSP-185
Sme-1, <i>S. marcescens</i> S6.....	166-LDRWELELNTEAIPGDKRDTTTP-187
OXY-2, <i>K. oxytoca</i> D488.....	164-LDRTEPTLNTEAIPGDERDTTSP-185
<i>K. oxytoca</i> E23004/SL781/SL7811.....	165-LDRTEPALNSAIPGDKRDTTTP-186
<i>S. typhimurium</i> CAS-5.....	165-LDRTEPTLNTEAIPGDRDTTTP-186
MEN-1, <i>E. coli</i> MEN.....	137-LDRTEPTLNTEAIPGDRDTTTP-158
<i>S. fonticola</i> CUV.....	141-LDRTEPTLNTEAIPGDKRDTTSP-162
<i>C. diversus</i> ULA27.....	168-LDRKEPELNTEAIPGDERDTTCP-189
<i>P. vulgaris</i> 5E78-1.....	167-LDRKEPELNTEAIPGDRDTTSP-188
<i>B. cepacia</i> 249.....	175-LDRWETELNTEALPGDLRDTTTP-196
<i>Actinomadura</i> sp. strain R39.....	176-ADRIETELNEVPPGETRDTTSP-197
<i>N. lactamdurans</i> LC411.....	175-ADRWEPELNSAVPGDVRDTTTP-196
<i>S. clavuligerus</i> NRRL 3585.....	186-MDQYEPELNHDPHPRDTTTP-207
III, <i>B. cereus</i> 569/H.....	185-SERFEPELNEVNPGETHTDTTTP-206
<i>B. licheniformis</i> 749/C.....	176-PERFEPELNEVNPGETQDTSTA-197
I, <i>B. mycoides</i> NI10R.....	179-SDRFETELNEAIPGDIRDTSTA-200
I, <i>B. cereus</i> 569/H/9.....	181-SNRFETELNEAIPGDIRDTSTA-202
I, <i>B. cereus</i> 5/B.....	179-SDRFETELNEAIPGDIRDTSTA-200
<i>B. subtilis</i> 168/6GM.....	179-AKRFETDLNSAIPGDIRDTSTA-200
ROB-1, <i>H. influenzae</i> F990/LNPB51/A1.....	176-TNRLEPDLNQAQPNDIRDTTTP-197
<i>S. fradiae</i> DSM40063.....	178-LDRWEPELNSAEPGRVDTTTP-199
<i>S. lavendulae</i> DSM2014.....	178-LDRWEPELNSAEPGRVDTTTP-199
<i>S. albus</i> G.....	187-LDRWEPELNSAEPGRVDTTTP-208
<i>S. lavendulae</i> KCCS0263.....	176-LDRWEPELNSAEPDRVDTTTP-197
<i>S. aureofaciens</i>	183-LDRWEPELNSAEPDRVDTTTP-204
<i>S. cellulosae</i> KCCS0127.....	180-LDRWEPELNSGEPDRRTDTTTP-201
<i>M. fortuitum</i>	167-LDRWEVELNSAIPGDRDTSTA-188
<i>S. aureus</i> PC1/SK456/ NCTC 9789.....	153-PVRYEIELNYSPKSKKDTTTP-174

Abbildung 1.5 Homologie des Ω -Loops in Klasse A β -Lactamasen [25]
(Nummerierung nach entsprechendem Swiss-Prot Eintrag)

1.3.2.2 Sekundär- und Tertiärstruktur

Die dreidimensionalen Strukturen von 28 verschiedenen β -Lactamasen und fünf PBPs, darunter zwei *High Mr* PBPs [38][39], sind derzeit aufgeklärt. Trotz geringer Sequenzhomologie fällt bei Vergleich der Strukturen von PBPs und β -Lactamasen auf, dass Serin- β -Lactamasen (Klassen A, C, D) und der

penicillin-bindende Teil der PBPs sehr große Ähnlichkeiten in ihrer Tertiärstruktur sowie in dem Aufbau des aktiven Zentrums besitzen [35][40].

Bei β -Lactamasen befindet sich das aktive Zentrum zwischen zwei Teilen des Enzyms, wobei eine Seite, die α/β -Domäne, aus einem, durch umliegende α -Helices stabilisierten, fünfsträngigen β -Faltblatt aufgebaut wird (auch „ α/β -site/domain“). Die andere Seite, die *all*- α -Domäne, besteht fast ausschließlich aus kürzeren α -Helices („*all* α -site/domain“; s. Abbildung 1.6). Es ist interessant, dass selbst Klasse B Metallo- β -Lactamasen das Bauprinzip des von Helices umgebenen fünfsträngigen β -Faltblatts beibehalten haben und so auch strukturell einen Hinweis auf ihre genetische Herkunft geben.

In Klasse A β -Lactamasen befindet sich das aktive Serin im S*XXK-Motiv (TEM1: STFK) am amino-terminalen Ende einer langen α -Helix (α_2), das S(Y)XN-Motiv (TEM1: SDN) auf einem *Loop* zwischen zwei Helices (α_4 , α_5) und das K(H/R)T(S)G (TEM1: KSG) auf dem innersten Strang des fünfsträngigen β -Faltblattes (β_3). Der aus 24 Aminosäuren bestehende Ω -*Loop* befindet sich zwischen Helix α_6 und α_8 ¹ und enthält ein strikt konserviertes Glutamat innerhalb des Pentapeptid-Motivs (TEM1: EPELN).

¹ Die nur aus drei Aminosäuren bestehende Helix α_7 ist Bestandteil des Ω -*Loops*.

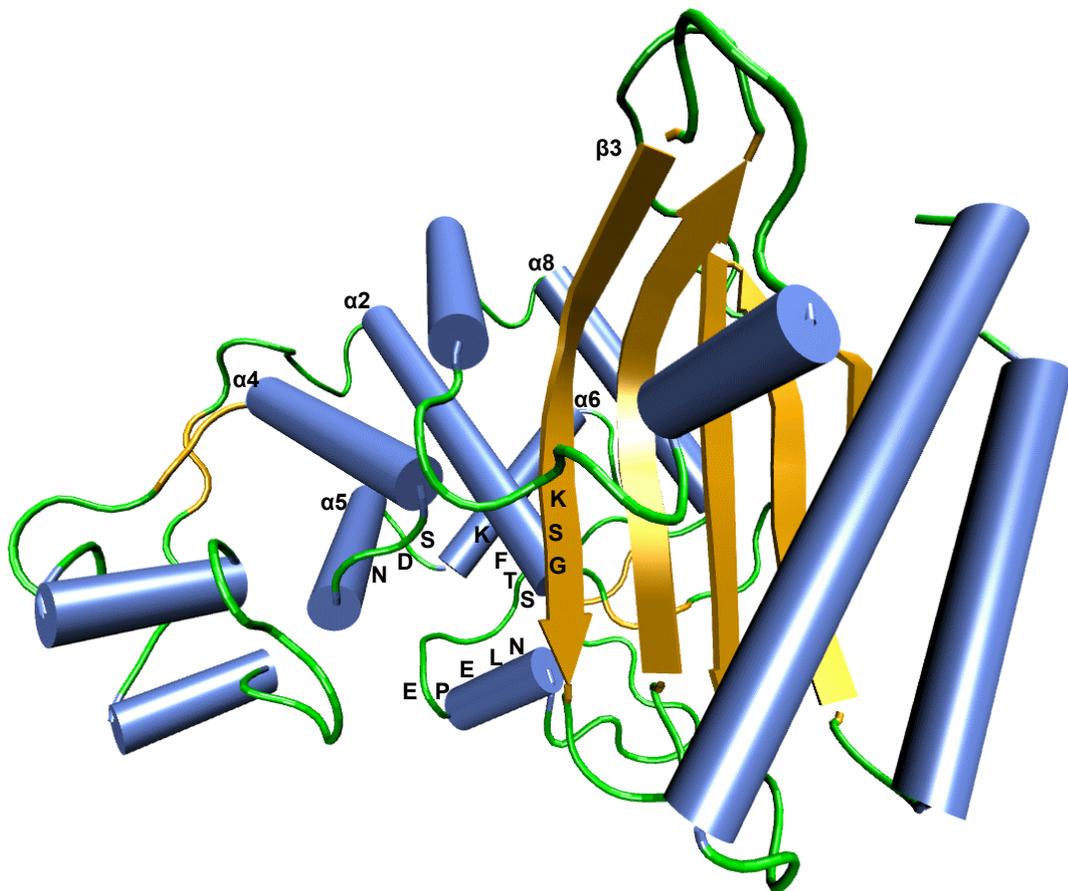


Abbildung 1.6 Klasse A β -Lactamase TEM1 von *E. Coli.*;
Sekundärelemente nach dem Programm STRIDE [41]

1.3.2.3 Aktives Zentrum von TEM1

Abbildung 1.7 zeigt das aktive Zentrum von TEM1, das sich PRE-typisch zwischen der *all*- α - und der α/β -Domäne des Enzyms befindet und im Mittelpunkt das aktive Serin70 enthält (Nummerierung folgt über die gesamte Arbeit dem Schema von *Ambler et al.*¹ [42]). Weitere konservierte Aminosäuren, denen eine aktive katalytische Funktion zugesprochen wird (siehe Kapitel 1.6), sind Lys73, Ser130, Glu166 sowie ein Wassermolekül, das sich in jeder

¹ Aufgrund der hohen Ähnlichkeit aller Klasse A β -Lactamasen wurde ein einheitliches System der Nummerierung eingeführt. Nach dem System von *Ambler* richtet sich die Nummerierung der einzelnen Aminosäure nicht nach ihrer absoluten Position in der Aminosäuresequenz, sondern nach der relativen Position zu den konservierten Aminosäuren, denen eine feste Nummer zugeordnet ist.

Kristallstruktur an der gleichen Stelle wiederfindet, da es durch Wasserstoffbrücken zu Ser70, Glu166 und Asn170 in seiner Position stabilisiert wird. Ebenfalls für die Bildung des Michaelis-Menten Komplexes und die Katalyse wichtige und konservierte Aminosäuren sind Asn132, Lys234, Ser235 sowie Arg244. Von Röntgenkristallstrukturen kann ein komplexes Wasserstoffbrückennetzwerk abgeleitet werden, das auch durch *Molecular-Modelling* Untersuchungen bestätigt wird (s. Kapitel 4.2.2).

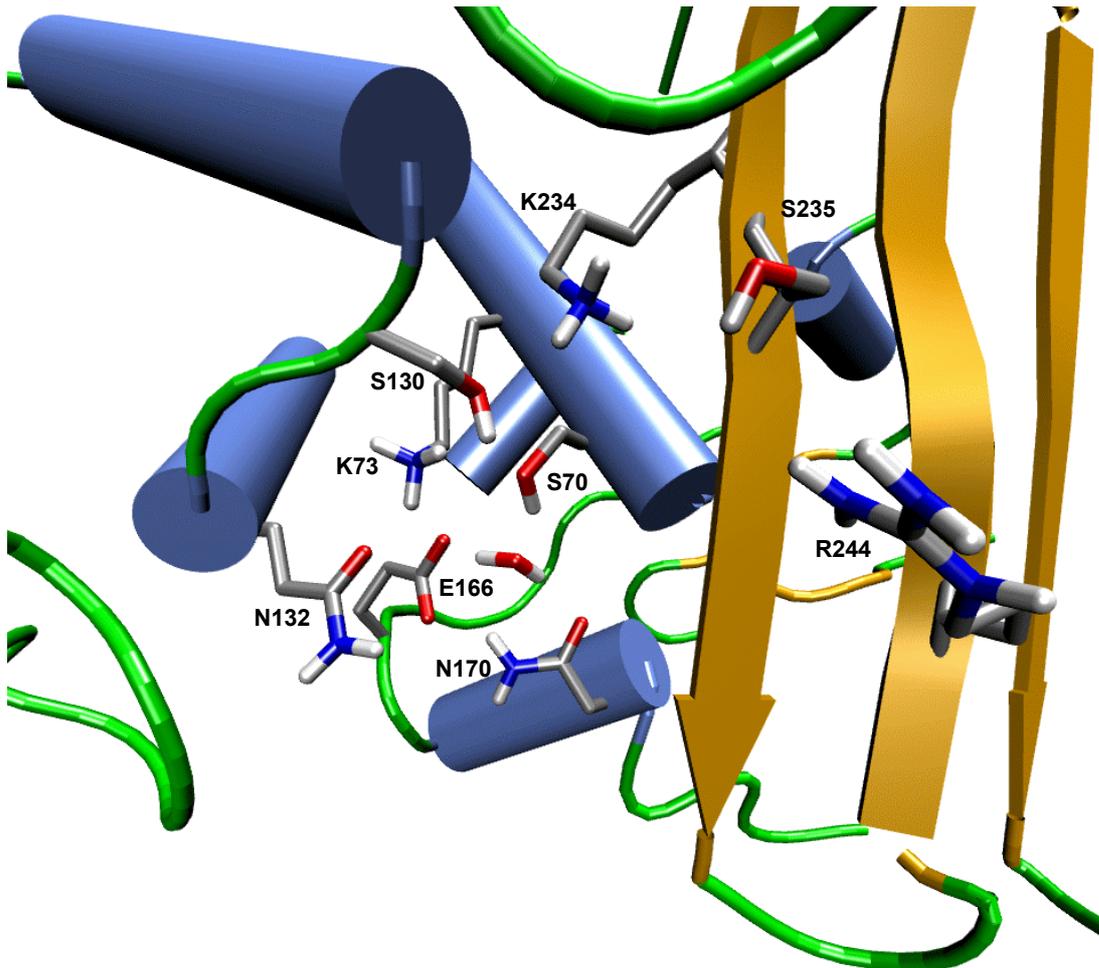


Abbildung 1.7 Aktives Zentrum von Klasse A β -Lactamasen (TEM 1)

Farbkodierung der Atome¹:

Grau: Kohlenstoff

Rot: Sauerstoff

Blau: Stickstoff

Gelb: Schwefel

¹ Die Farbkodierung wird über alle Abbildungen in der vorliegenden Arbeit beibehalten.

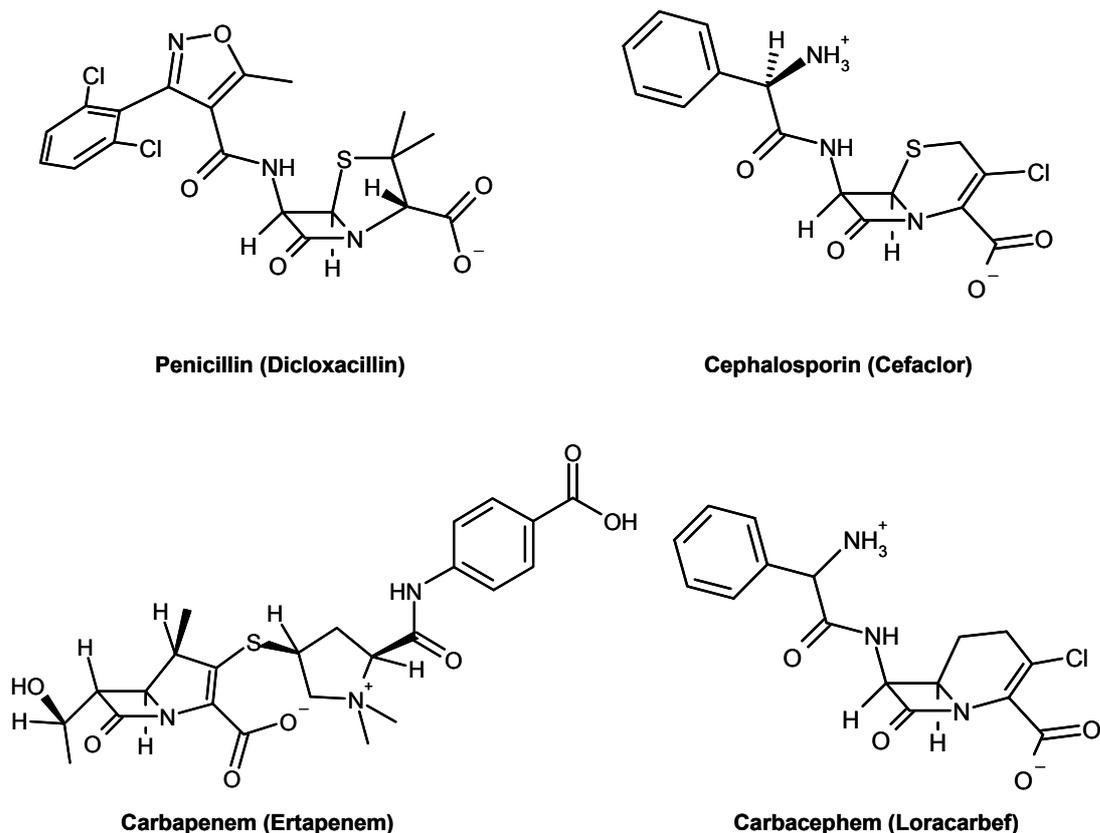
1.4 β -Lactam-Antibiotika

1.4.1 Strukturen und Einteilung

Benzylpenicillin (Pencillin G¹), das erstmals 1940 aus *Penicillium notatum* gewonnen wurde, war lange Zeit das Modell- β -Lactam für die Entwicklung anderer Penicillin-Derivate. Inzwischen gibt es eine Vielzahl von Penicillin-, Cephalosporin-, Carbapenem-, Carbacephem- sowie monozyklische Monobactamabwandlungen (s. Abbildung 1.8).

Eingeteilt werden sie innerhalb dieser Hauptgruppen nach den Eigenschaften ihrer Seitenkette, die sie zu oral oder parenteral verfügbaren Antibiotika machen. Das Wirkungsspektrum wird neben den strukturellen Eigenschaften der Ziel-PBPs und den spezifischen Resistenzmechanismen eines Bakterienstammes hauptsächlich durch die Lipophilie des Antibiotikums bestimmt. „Penicilline mit erweitertem Wirkungsspektrum“ sind hydrophiler und können so durch Porine auch die Zellwände gramnegativer Bakterien passieren, die für klassische β -Lactam-Antibiotika nicht permeabel sind.

¹ Das erste isolierte und eingesetzte „Penicillin“ war ein Gemisch aus fünf Penicillinen, die später mit Buchstaben benannt wurden. Therapeutische Bedeutung haben nur noch Penicillin G, das Benzylpenicillin und Penicillin V (Phenoxymethylpenicillin).

Abbildung 1.8 Verschiedene Vertreter der β -Lactam-Antibiotika

1.4.2 Reaktivität gegenüber PBPs

β -Lactam-Antibiotika reagieren mit dem aktiven Serin der PBPs und bilden ein stabiles, schlecht hydrolysierbares Acylenzym, dessen aktives Zentrum dadurch unfunktionell geworden und „blockiert“ ist. Die Selektivität der β -Lactame für PBPs beruht auf deren Strukturanalogie zu dem natürlichen Substrat von PBPs, dem D-Alanyl-D-alanin-dipeptid [43]. Die Überlagerung der beiden Strukturen (s. Abbildung 1.9), lässt die identische räumliche Anordnung der Heteroatome beider Moleküle erkennen, die durch ihre Wechselwirkungen mit Aminosäuren des aktiven Zentrums die Affinität begründen (s. Kapitel 4.6.1.).

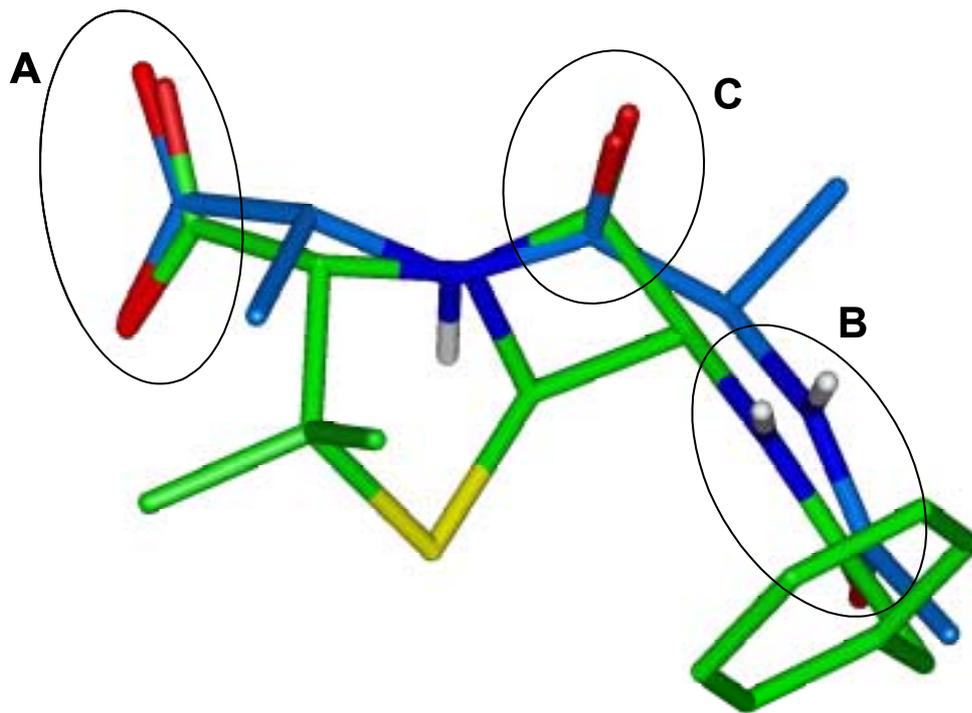


Abbildung 1.9 Überlagerung von Benzylpenicillin (grün) und einem D-Alanyl-D-alanin-dipeptid (blau)

Die Carboxylatgruppen (A), die Carbonylsauerstoffe und die Wasserstoffatome der Peptidbindungen (B) von Substrat und Inhibitor lassen sich sehr gut zur Deckung bringen. Die amidischen Carbonylkohlenstoffe der zu spaltenden Peptidbindung des D-Alanyl-D-alanins sowie des β -Lactamrings (C) liegen ebenfalls an der gleichen Position, um vom aktiven Serin nucleophil angegriffen zu werden.

Im Vergleich zur Peptidbindung des D-Alanyl-D-alanins ist die β -Lactam-Bindung des Suizidsubstrats allerdings wesentlich reaktiver. Handelt es sich beim Substrat, nicht nur seiner Strukturformel, sondern auch seiner chemischen Eigenschaften wegen um ein Amid, so ist dies bei Penicillinen nicht der Fall. Die Carbonylaktivität der β -Lactam-Bindung ist eher mit der eines Ketons zu vergleichen. Der Grund hierfür liegt in der schmetterlingsartigen Geometrie des Bicyclus, bestehend aus dem 4-gliedrigen β -Lactam- und einem Thiazolidin- (Penicilline) bzw. Pyrrolinring (Carbapeneme), die es dem freien π -Elektronenpaar des Amidstickstoffs nicht ermöglicht mit dem Carbonylsauerstoff in Resonanz zu treten [44]. Die für diese Mesomerie nötige sp^2 -Hybridisierung des Stickstoffs ist aufgrund der dafür nötigen Bindungswinkel energetisch unmöglich.

Obwohl bei den Cephalosporinen und Carbacephemem der an den β -Lactamring annellierte Ring durch ein Glied zum Dihydrothiazin- bzw. Piperidenring erweitert ist, kann auch hier der Stickstoff keine vollkommen planare Geometrie einnehmen. Zusätzlich wirkt sich die räumliche Anordnung der Carboxylatgruppe des Piperidenrings zu dem Stickstoff aktivierend auf die Carbonylgruppe der Lactambindung aus. Durch die Doppelbindung im Piperiden liegt der Stickstoff in einer Ebene mit der Carboxylatgruppe, die so einen elektronenziehenden Effekt ausüben kann.

Weiter erhöht wird die Reaktivität aufgrund der Baeyer-Ringspannung [45] des 4-gliedrigen Lactamringes, die allein schon die Reaktivität gegenüber einer offenkettigen Form erhöht [46].

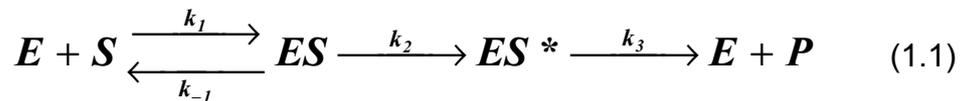
1.4.3 Resistenzen gegen β -Lactam-Antibiotika

Wenn auch die Spaltung durch β -Lactamasen den bedeutsamsten Resistenzmechanismus gegen β -Lactam-Antibiotika darstellt, haben Bakterien weitere Abwehrmechanismen entwickelt. Wurden aus PBPs durch Mutationen, die im Wesentlichen die Deacylationsfähigkeit veränderten, β -Lactamasen, so sind im Umkehrschluss auch Mutationen möglich, die bereits den vorherigen Schritt der Acylierung verhindern oder erschweren. Diese Art von intrinsischer Resistenz wurde zum ersten Mal bei *Pneumokokken* beobachtet [47][48]. Die aus den resistenten Keimen isolierten PBPs zeigen einen durch Punktmutationen verursachten Austausch von nur wenigen Aminosäuren, die aber die Affinität der PBPs gegenüber speziellen β -Lactam-Antibiotika weit genug erniedrigen, dass diese keine bakterizide Wirkung mehr erzielen. Für die gealterten PBPs codieren kleinste chromosomale Genabschnitte sogenannte Mosaikgene, die nicht nur an Tochterzellen weitergegeben, sondern durch Transformation auch zwischen verschiedenen Spezies ausgetauscht werden können [49].

Ein anderer Mechanismus der Resistenz ist bei MRSA-Stämmen festgestellt worden. Diese Keime sind in der Lage reversibel ihr PBP-Profil zu ändern. Unter β -Lactam-Einfluss werden sonst repressive PBP-Gene translatiert, die für niedrig β -lactam-affine PBPs codieren. Diese haben zwar eine schlechtere physiologische Funktion, die aber dennoch ausreicht, um ein Überleben unter β -Lactam-Stress zu gewährleisten [50]. Des Weiteren können natürlich auch andere nicht β -lactam-spezifische Resistenzen wie z.B. Veränderungen der Zellwandpermeabilität auftreten.

1.5 Kinetik

Die Kinetik der durch β -Lactamasen katalysierten Spaltung von β -Lactam-Antibiotika folgt dem in Gleichung 1.1 angegebenen Schema für Enzymkatalysen:



E Konzentration des Enzyms

S Konzentration des Substrats

ES Konzentration des Michaelis-Menten Komplexes

ES^* Konzentration des Acylenzyms

P Konzentration des Produkts

Angenommen wird dabei, dass die Bildung des Acylenzyms (ES^*) irreversibel ist ($k_{-2} = 0$). Unterhalb der Sättigungsgrenze des Enzyms entspricht die Umsatzrate der Acylierungsrate, die Konstante der Reaktion zweiter Ordnung k_2/K' ist demzufolge:

$$\frac{k_{cat}}{K_m} = \frac{k_2}{K'} = \frac{k_1 k_2}{k_{-1} + k_2} \quad (1.2)$$

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (\text{Michaelis Konstante})$$

$$\frac{k_{cat}}{K_m} \quad \text{Katalytische Effizienz/Acylierungsrate}$$

$$K' = \frac{k_{-1} + k_2}{k_2}$$

Der Parameter der katalytischen Effizienz k_{cat}/K_m ist deacylierungsunabhängig, und entspricht daher hier ebenfalls der Acylierungsrate.

Unter Sättigungsbedingungen ist die Umsatzrate unabhängig von der Substratkonzentration und entspricht dann Gleichung 1.3, wobei der Wert von k_{cat} die Wechselzahl des Enzyms ist.

$$k_{cat} = \frac{k_2 k_3}{k_2 + k_3} \quad (1.3)$$

Je nachdem ob der geschwindigkeitsbestimmende Schritt die Acylierung ($k_3 \gg k_2$) oder die Deacylierung ($k_2 \gg k_3$) ist, repräsentiert k_{cat} gleichzeitig die Acylierungs- bzw. die Deacylierungsrate .

Die Kinetik einer Reaktion eines β -Lactam-Antibiotikums mit einem PBP oder einer β -Lactamase unterscheidet sich entscheidend durch die Geschwindigkeitskonstante k_3 . Während diese bei β -Lactamasen sehr groß sein kann, ist sie bei PBPs sehr klein, so dass die Reaktion auf der Stufe des Acylenzyms stehen bleibt (k_{cat} wird sehr klein) [51][52].

1.6 Reaktionsmechanismus der Klasse A β -Lactamasen

Der Reaktionsmechanismus, der zur Spaltung von β -Lactam-Antibiotika durch Klasse A β -Lactamasen führt, lässt sich in zwei Hauptschritte unterteilen. Nach der Bildung des Michaelis-Menten Komplexes kommt es im „Acylierungsschritt“ zur Acylierung des aktiven Serins und bereits zur Spaltung des Lactamrings. Das gebildete Acylenzym wird anschließend im „Deacylierungsschritt“ hydrolysiert.

1.6.1 Acylierung

Der Acylierungsmechanismus von Klasse A β -Lactamasen ist Gegenstand kontroverser Diskussionen, da es trotz intensiver Forschungsarbeiten bisher nicht gelungen ist, ihn abschließend aufzuklären. Da der Mechanismus der Acylierung von PBPs ebenso wenig bekannt ist, hilft auch der Blick auf den Mechanismus eines verwandten Enzyms, um Parallelen zu dem zu untersuchenden Enzym zu ziehen, nicht weiter. Auch der Vergleich mit Serin-Proteasen ergibt keinen Aufschluss. Trotz der Ähnlichkeit der katalysierten Reaktion mit der von den Serin-Proteasen vermittelten Spaltung von Peptidbindungen, sind Rückschlüsse aus dieser umfangreich erforschten und überzeugend aufgeklärten Enzymkatalyse

[53]-[56] schwer auf die Acylierungsreaktion der β -Lactamasen zu übertragen.

Durch die Abstammung der Lactamasen von den PBPs ist anzunehmen, dass das aktive Zentrum der PBPs durch die Evolution nur umfunktioniert wurde, sich aber nicht von Grund auf mit der Spezialisierung auf die Spaltung von β -Lactamen eigenständig entwickelt hat. Ein Äquivalent zur katalytischen Triade der Serin-Proteasen ist im aktiven Zentrum der Klasse A β -Lactamasen nicht zu finden. Obwohl dieses Erfolgsprinzip der Natur, bestehend aus aktivem Serin, der *General Base*¹ Histidin, sowie einer zum Ladungsausgleich negativ geladenen Aminosäure (meistens Aspartat), die sich in den strukturell unterschiedlichsten Enzymen parallel entwickelt und durchgesetzt hat [57], in den β -Lactamasen nicht angewendet wird, haben sich auch diese zu Enzymen entwickelt, die nahezu diffusionskontrollierte Umsatzraten erreichen können [58][59].

Ein allgemeiner Mechanismus nach der Bildung des Michaelis-Menten Komplexes (A) lässt sich entsprechend Abbildung 1.10 formulieren.

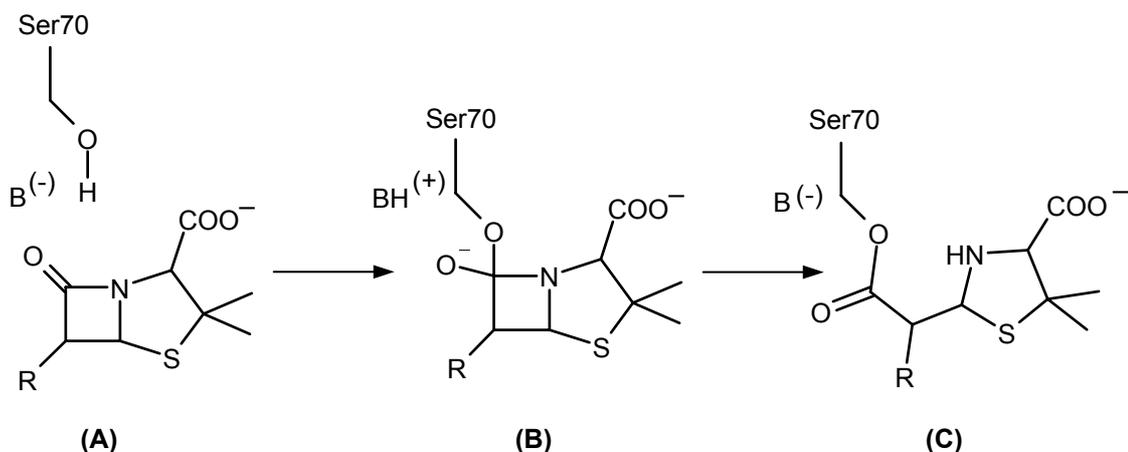


Abbildung 1.10 Allgemeiner Mechanismus der Acylierung von Klasse A β -Lactamasen

Zu Beginn der Reaktion muss das Serin durch eine *General Base* aktiviert werden. Dies geschieht durch Abstraktion eines Protons, so dass das Serin für den Angriff nucleophilisiert wird. Der Angriff selber erfolgt von der α -face (*exo*) des β -Lactams. Dies hat zur Folge, dass bei dieser Hydrolyse das freie Elektronenpaar *syn* zu dem angreifenden Nucleophil steht. Diese Besonderheit

¹ Mit „*General Base*“ wird die Aminosäure eines Enzyms bezeichnet, die als Base fungierend ein Proton einer andere Aminosäure (z.B. Serin) aufnimmt und sie so aktiviert.

steht im Kontrast zu dem allgemein gültigen Mechanismus der Hydrolyse von Amiden und Peptiden, bei denen das freie Elektronenpaar *anti*, also auf der entgegengesetzten Seite des angreifenden Nucleophils steht [60].

Der Grund dafür ist in der durch die Geometrie des Bicyclus bedingten, sterischen Hinderung der *endo* Seite zu sehen. Diese Eigenschaft der Penicilline hat sich auch bei der Evolution der β -Lactamasen durchgesetzt, deren aktives Zentrum für einen nucleophilen Angriff von der *exo* Seite her optimiert ist.

Nach erfolgtem nucleophilen Angriff bildet sich ein tetraedrales Zwischenprodukt (**B**), das sich durch Bildung eines Ester, dem Acylenzym (**C**), unter Protonierung des β -Lactam-Stickstoffs stabilisiert.

Leider konnten bisher weder die Identität der *General Base* noch die des direkten Protonenlieferanten für den freiwerdenden Stickstoff eindeutig bewiesen werden [61][62]. Jede denkbare Aktivierungsmaschinerie führt auch zu einem anderen System der Protonierung des Stickstoffs im zweiten Schritt der Acylierung. Die Identifizierung der den Mechanismus bestimmenden *General Base* wird darüber hinaus durch die herrschende Ungewissheit über den Protonierungsgrad von Lys73 erschwert, da die zwei meistdiskutierten Theorien entweder Lys73 oder Glu166 als *General Base* zu Grunde legen [52][63][64].

1.6.1.1 Lys73 als *General Base*

Lys73 befindet sich in einer Position, die vergleichbar der des Histidins in den Serin-Proteasen ist. Die Aminogruppe ist nur ca. 3 Å von der Hydroxylgruppe des Serins entfernt und könnte so als Akzeptor für das Proton fungieren, ähnlich wie das in einigen Serin-Proteasen zu beobachten ist, die anstelle des Histidins ein Lysin besitzen [65].

Der Mechanismus, nach dem Lys73 die Funktion der *General Base* ausübt, wurde erstmals von *Oefner et al.* [66] vorgestellt und begründet sich im Wesentlichen auf die zu beobachtende Anhäufung von Acylenzym-Zwischenprodukten bei Mutation von Glu166 [67]-[70]. Aufgrund dieser Tatsache kann geschlossen werden, dass die Acylierung auch ohne Glu166 stattfinden kann und daher Glu166 für den zugehörigen Mechanismus nicht zwingend notwendig sei.

Voraussetzung dafür ist allerdings eine neutral vorliegende ϵ -Aminogruppe des Lysins mit dementsprechend signifikant erniedrigten pK_S -Wert. Der pK_S -Wert einer Aminogruppe von Lysin beträgt in Lösung ungefähr 10,5. Die nötige Erniedrigung der Basizität um ca. 4-6 Zehnerpotenzen versucht man durch das elektrostatische Umfeld von Lys73 zu erklären (s. Abbildung 1.11) [67].

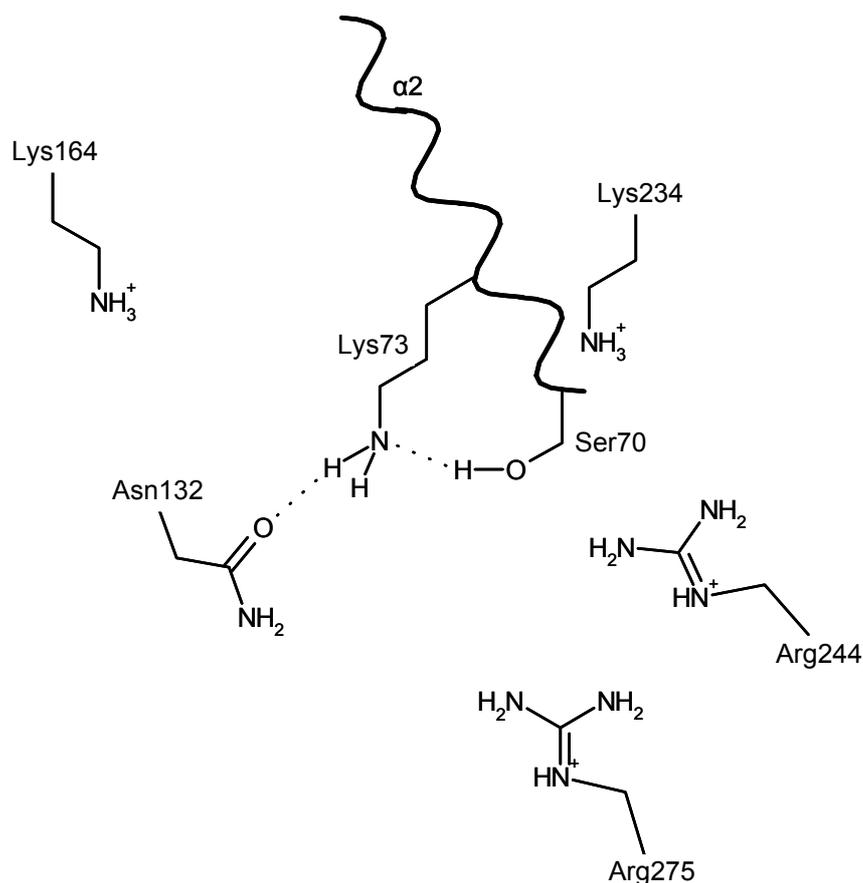


Abbildung 1.11 Positiv geladene Aminosäuren in der Nähe des aktiven Zentrums von TEM1 (Lysin 73 neutral)

Zum einen sind insgesamt vier positiv geladene Aminosäuren (Lys164, Lys234, Arg244, Arg275) mit einem Abstand von 6 Å bis 15 Å in der Nähe von Lys73 platziert, zum anderen befindet es sich in der Nähe des N-terminalen Endes einer langen Helix ($\alpha 2$), deren Dipol ein weiteres positives Potenzial auf Lys73 ausüben soll. Die mögliche Wasserstoffbrücke von Ser70 zu Lys73 wird außerdem für dessen Neutralität mitverantwortlich gemacht.

Einige Mutationsstudien stützen diese These insofern, da sie zeigen, dass bei Austausch von Lys73 eine Abnahme der Acylierungsrate zu beobachten ist, auch wenn diese stark substratabhängig ist [71][74].

Ein neutrales Lysin vorausgesetzt, würde der Mechanismus wie in Abbildung 1.12 dargestellt, funktionieren.

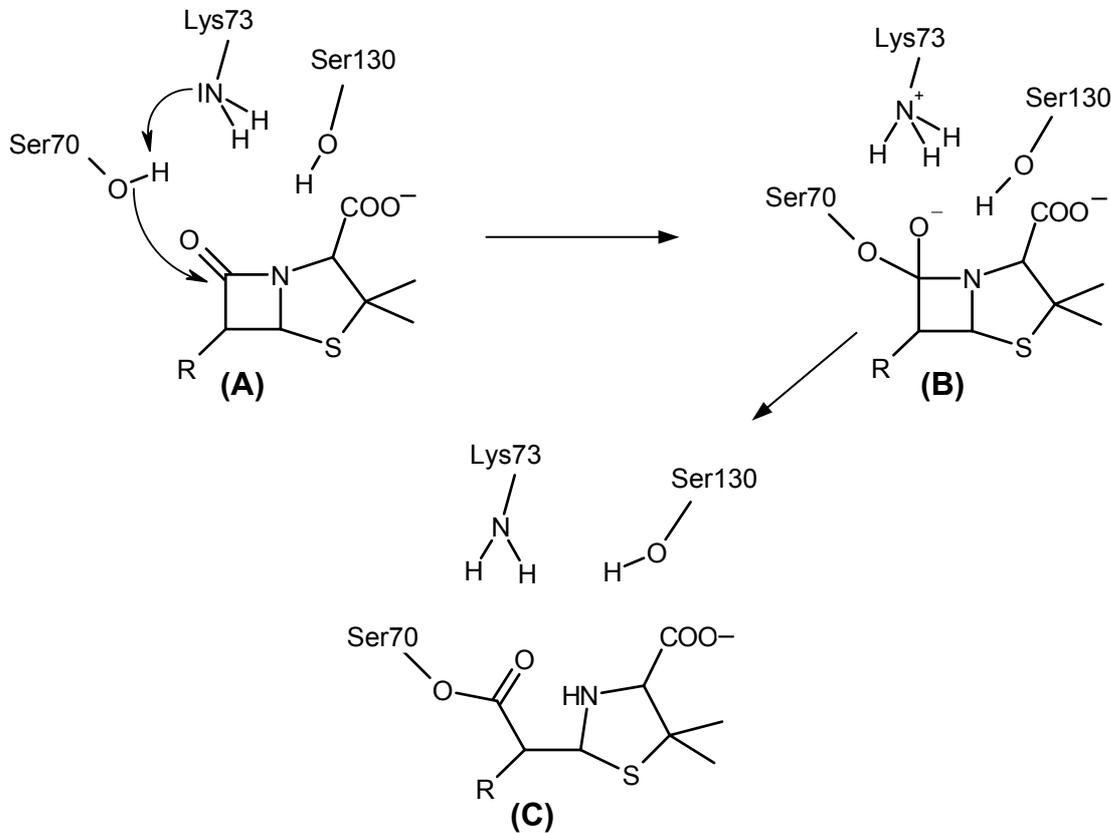


Abbildung 1.12 Acylierungsmechanismus mit neutralem Lys73 als *General Base*

1.6.1.2 Glu166 als *General Base*

Gibson et al. entwickelten 1990 die Theorie eines Mechanismus mit Glutamat 166 als *General Base* [74]. Das Problem bei diesem Mechanismus stellte der eigentlich zu große Abstand (ca. 3,5 - 4 Å) zwischen Ser70 und Glu166 dar, der eine Deprotonierung von Ser70 durch Glu166 unwahrscheinlich erscheinen ließ. Erst mit der Aufklärung weiterer Kristallstrukturen von Klasse A β -Lactamasen ist die Existenz eines konservierten Wassermoleküls im aktiven Zentrum bewiesen worden, das die für einen direkten Transfer zu große Distanz überbrücken kann.

Seit *Lamotte-Brasseur et al.* [72] diese Erkenntnis auf den Mechanismus übertragen haben, hat er weiter an Bedeutung gewonnen. In Moleküldynamik-Simulationen ist außerdem gezeigt worden, dass der das Glutamat 166

präsentierende Ω -Loop eine hohe Flexibilität aufweist und sogar ohne das Wasser als Zwischenstation zur Deprotonierung von Ser70 in der Lage sein könnte [73]. Mutationsstudien belegen, dass zwar bei Ersatz von Glu166 immer noch Acylierungsreaktionen möglich sind, allerdings nur, ähnlich wie bei Mutation von Lys73, mit einer drastisch erniedrigten Rate [74][75]-[77]. Alle Glu166-Mutanten zeigen durchweg nicht nur verminderte Acylierungs-, sondern noch stärker verminderte Deacylierungsraten. In Abbildung 1.13 ist der beschriebene Mechanismus dargestellt.

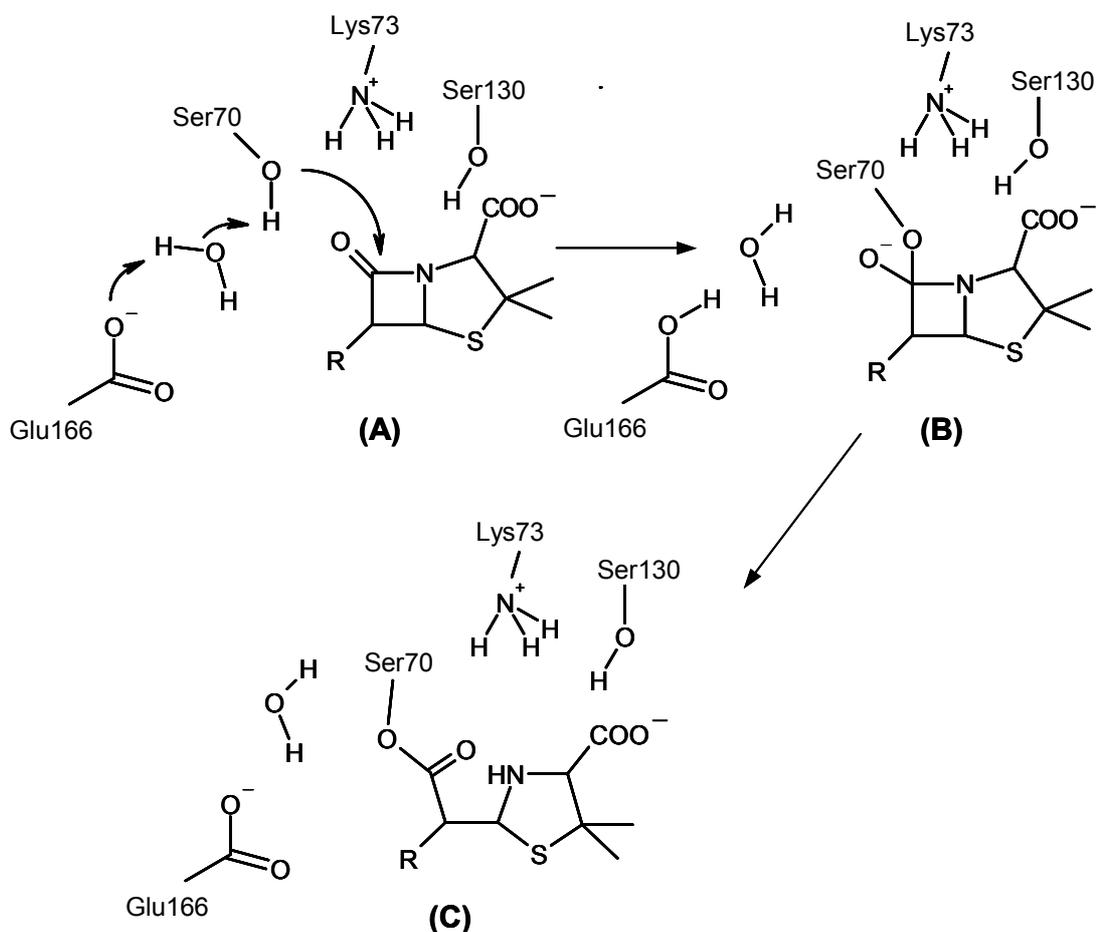


Abbildung 1.13 Acylierungsmechanismus mit Glu166 als *General Base*

1.6.1.3 Weitere Mechanismushypothesen

Swarén et al. führten 1995 die Idee einer substratinduzierten Aktivierung des katalytischen Systems der β -Lactamasen in die Diskussion ein [78]. Danach

solle der pK_S von einem neutralen Lys73 während der Bildung des Michaelis-Menten Komplexes so stark ansteigen, dass Lys73 dann basisch genug wäre, ein Proton von Ser70 zu abstrahieren. Der Grund dafür solle in der bei allen β -Lactamen essenziellen Carboxylatgruppe liegen, die bei Bindung die Ladung des benachbarten Lys234 ausgleichen und so Lys73 für dessen mögliche Protonierung aktivieren solle. *Chen et al.* wiederum sehen es genau umgekehrt und erwarten eine Senkung des pK_S bei Substratbindung [79]-[81]. Danach solle sich der pK_S von Lys73 erst während der Komplexbildung so weit erniedrigen, dass es ein Proton abspalten und mit einer dann unprotonierten Aminogruppe als *General Base* fungieren könne.

Ishiguro et al. [82] sprachen der Carboxylatgruppe nach einer molekular-mechanischen *Modelling*-Untersuchung eine andere Funktion zu. Der entscheidende Punkt solle hier eine Änderung des Wasserstoffbrückenmusters im aktiven Zentrum nach Bindung des Substrates sein. Die Carboxylatgruppe solle demnach mit Ser130 eine Wasserstoffbrücke bilden und darüber anschließend Lys73 und schließlich Ser70 deprotonieren. *Díaz et al.* griffen diese Idee auf und vereinfachten den vorgeschlagenen Mechanismus. Die Acylierung solle danach nur über eine Protonenverschiebung zwischen Ser70, Lys73 und dem Stickstoff des β -Lactams vonstatten gehen [83].

1.6.1.4 Protonierung des β -Lactamstickstoffs

Die Suche nach dem letzten Donor, der den β -Lactamstickstoff nach Ringspaltung protoniert, hat sich als weniger mühevoll herausgestellt. *Herzberg & Mout* zogen die Möglichkeit in Betracht, der Stickstoff könne direkt von Ser70 oder Lys73 – natürlich nur, wenn Lys73 auch als *General Base* fungiert – protoniert werden [84], was sich aber schon von der Geometrie her als unwahrscheinlich herausstellte.

Unabhängig von der Identität der *General Base* wird die hochkonservierte Aminosäure Serin 130 als letzter Donor akzeptiert, ist sie doch in einer idealen Position, diese Aufgabe zu übernehmen (s. Kapitel 4.6.1). Unübersichtlicher ist die Herkunft des Protons, dass von Ser130 weitertransferiert wird. Je nach *General Base* gibt es eine Vielzahl von Möglichkeiten, bei denen sogar ein zweites Wassermolekül (*Lamotte-Brasseur et al.* [72]) eine Rolle spielen könnte. Allein wenn Lys73 als *General Base* fungieren würde, ist es am wahrscheinlichsten, dass das Proton direkt zu Ser130 und von dort weiter zum Stickstoff des β -Lactams gereicht werden würde.

1.6.2 Deacylierung

Im Zwischenprodukt zwischen Acylierungs- und Deacylierungsschritt, dem Acylenzym, ist das β -Lactam durch eine Esterbindung kovalent an die β -Lactamase gebunden. Nach dem 1987 erstmals von *Herzberg und Moul* [84] vorgeschlagenen und mittlerweile in vielerlei Hinsicht bestätigten Reaktionsmechanismus (s. Abbildung 1.14) wird das Acylenzym (**A**) durch ein Wassermolekül hydrolysiert. Dieses Wassermolekül, das in allen Wild-Typ Röntgenkristallstrukturen an der gleichen Position zu finden ist, wird durch Glu166 für die Hydrolyse nucleophilisiert. Ein Proton wird von dem Wasser nach oder schon während des nucleophilen Angriffes auf Glu166 übertragen und es bildet sich ein, einen sp^3 -hybridisierten Kohlenstoff enthaltendes, Zwischenprodukt (**B**). Das Enzym wird durch anschließende Elimination des gespaltenen β -Lactams regeneriert und steht zur Spaltung des nächsten Antibiotikums bereit (**C**).

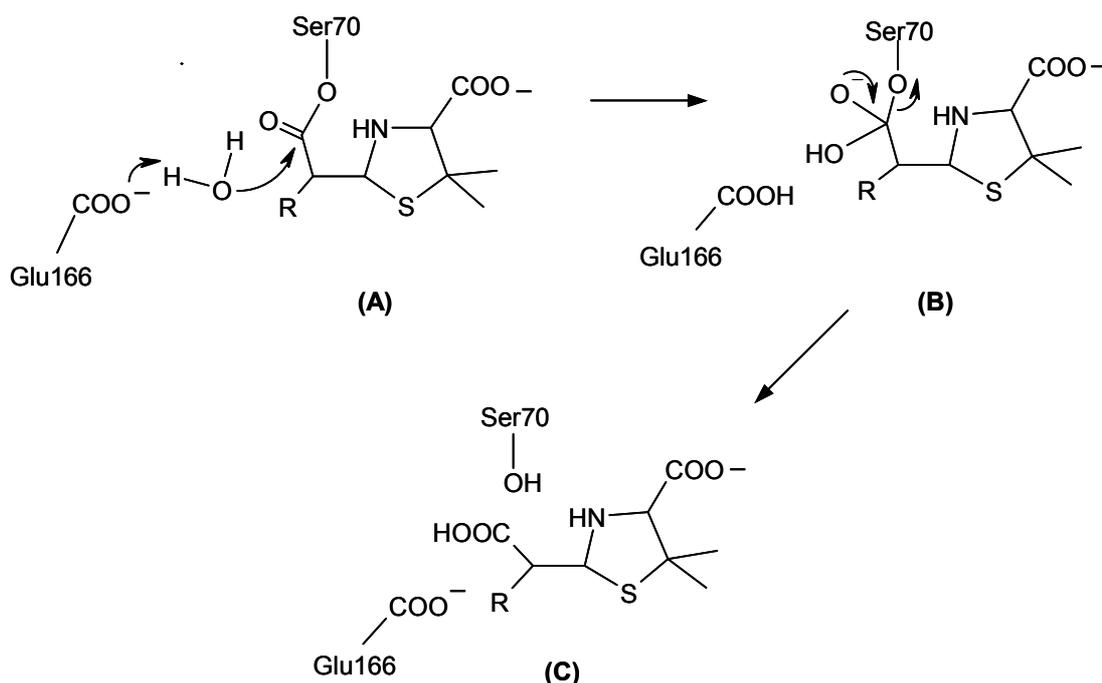


Abbildung 1.14 Deacylierungsmechanismus von Klasse A β -Lactamasen

Die essenzielle Bedeutung von Glu166 für die Deacylierungsreaktion, die als Beweis für den vorgeschlagenen Mechanismus dient, kann anhand zahlreicher Mutationsstudien bestätigt werden. Wird das Glutamat durch eine andere

Aminosäure ersetzt, kommt es zur Akkumulation des Acylenzym-Zwischenprodukts, das nicht weiter hydrolysiert werden kann [74][76][77].

Das unverzichtbare Vorhandensein des Wassers für die Deacylierung lässt sich auch anhand der Wirkungsweise von sogenannten „ β -lactamasestabilen“ β -Lactam-Antibiotika¹ wie z.B. Temocillin oder Cefoxitin (s. Abbildung 1.15) ableiten. Diese Verbindungen tragen eine 3- α -Seitenkette (Methoxyreste), die das katalytische Wasser verdrängt und seine Position besetzt. Eine Hydrolyse des gebildeten Esters kann von Glu166 so nicht mehr katalysiert werden oder verläuft deutlich langsamer [85].

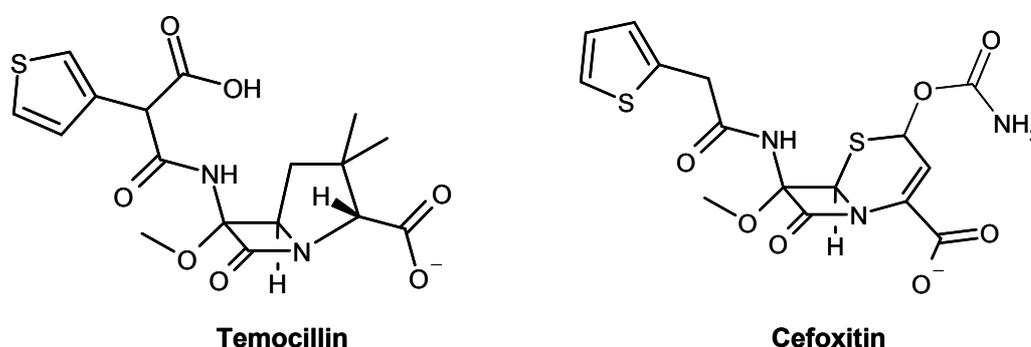


Abbildung 1.15 „ β -lactamasestabile“ β -Lactam-Antibiotika

Dieselben Ergebnisse konnten mit einer schlecht deacylierenden N170Q-Mutante beobachtet werden. Die Kristallstruktur zeigt, dass das aktive Zentrum außer der Deplatzierung des Wassers, hervorgerufen durch die um eine Methylengruppe kürzere Seitenkette des Asparagins, keinerlei Veränderungen im Vergleich zu dem des Wild-Typs aufweist [81]. Der Mechanismus der Deacylierung konnte nicht zuletzt auch durch eine theoretischen Studie bestätigt werden [86].

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der betrachtete Deacylierungsmechanismus durch alle verfügbaren Untersuchungsmethoden verifiziert wurde und allgemein akzeptiert ist.

¹ Es gibt auch schon Bakterienstämme, die gegen diese β -Lactame resistent sind, es ist daher richtiger sie als „ β -Lactam-Antibiotika mit erhöhter β -Lactamase-Stabilität“ zu bezeichnen.

2 PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG

Die hohe Mutationsrate von Mikroorganismen und die damit einhergehende Entwicklung von Resistenzmechanismen machen die ständige Entwicklung neuer innovativer Chemotherapeutika, aber auch die Optimierung bekannter Verbindungen zwingend erforderlich. β -Lactam-Antibiotika sind rund 75 Jahre nach ihrer Entdeckung die verbreitetsten Antibiotika bzw. Chemotherapeutika. Sie werden nahezu bei allen bakteriellen Infektionen eingesetzt.

Die vollständige Aufklärung des molekularen Wirkungs- bzw. Reaktionsmechanismus dieser Wirkstoffgruppe ist trotz intensiver Forschung bisher ohne Erfolg geblieben. Modifikationen von β -Lactam-Strukturen erfolgen daher im Wesentlichen nur aufgrund von empirischen statistischen Vorgehensweisen und sind nicht auf Grundlage mechanistischer Kenntnisse möglich. Es darf hierbei nicht nur versucht werden, die Zielenzyme effektiver zu inhibieren, sondern es müssen vor allem auch die Resistenzmechanismen, die β -Lactamasen, umgangen werden. Inzwischen hat die Suche nach Lactamen, die gegen diese Enzyme eine erhöhte Stabilität aufweisen, höhere Priorität als die Optimierung der Wirksamkeit gegen bestimmte Ziel-PBPs.

Die enge Verwandtschaft von PBPs und β -Lactamasen lässt auch auf eine Ähnlichkeit des Mechanismus schließen. Dies lässt darauf hoffen, bei voranschreitender Strukturaufklärung von penicillin-bindenden Proteinen, Rückschlüsse auf deren Reaktionsmechanismus von dem der β -Lactamasen ziehen zu können.

Aufgrund der erleichterten Kristallisierbarkeit der nicht membrangebundenen, kleineren β -Lactamasen sind diese im Vergleich zu PBPs umfassender untersucht worden. Der Reaktionsmechanismus konnte jedoch trotz intensiver Anstrengungen ebenfalls nicht abschließend aufgeklärt werden. Die ubiquitär vorkommende, wichtigste Unterfamilie der Klasse A β -Lactamasen verspricht bei der Aufklärung des Mechanismus die größten Erfolgsaussichten, da für diese Gruppe im Vergleich zu den Klassen C und D die meisten Informationen vorliegen.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Acylierungsreaktion von Klasse A β -Lactamasen, die den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Spaltung von β -Lactam-Antibiotika darstellt, im Hinblick auf quantitative und vor allem qualitative Aspekte untersucht werden. Hierbei sollten die verfügbaren Ergebnisse experimenteller Untersuchungen mit einem theoretischen Modell in

Einklang gebracht werden, um einen allgemeingültigen Reaktionsmechanismus für diese Enzymklasse abzuleiten.

Durch Anwendung von kombinierten quantenmechanisch/molekularmechanischen Methoden sollte die Acylierungsreaktion unter Einbeziehung des Einflusses der Proteinumgebung auf das Substrat modelliert werden.

Die Analyse des Reaktionsweges auf atomarer Ebene sollte die Art und Weise des Zusammenspiels der katalytischen Aminosäuren aufklären. Es sollte weiterhin die Struktur des Übergangszustandes ausführlich untersucht werden, um dessen Stabilisierung durch die Proteinumgebung zu verstehen, die letztlich die Katalysegeschwindigkeit des Enzyms bestimmt. Die verantwortlichen Aminosäuren sollten dabei identifiziert und ihre Effekte quantifiziert werden.

3 METHODEN

3.1 Das CHARMM-Kraftfeld

Die Berechnungen in vorliegender Arbeit wurden Grössenteils mit dem Software-Paket CHARMM in der Version c27b2 [87] in Verbindung mit dem CHARMM22-Kraftfeld [88] durchgeführt. Im Folgenden werden die Besonderheiten des Kraftfeldes und die verwendeten Optionen des Programms nur kurz erläutert. (Eine detaillierte Beschreibung der Kraftfeldtheorie s. [87][89]; vollständige Liste der Kraftfeldterme s. Anhang E).

3.1.1 Fixieren und *Restrainen* von Atomen

In manchen Simulationen ist es nötig, die Bewegungsfreiheit von Atomen einzuschränken oder ganz auszusetzen. Dies kann erreicht werden, indem Atome mit *Restraints* belegt werden, durch die Potenziale hervorgerufen werden, die die Koordinaten der *restrained* Atome möglichst wenig von einer Referenzstruktur abweichen lassen. Das Potenzial eines harmonischen *Restraints* wird berechnet, indem das Quadrat der Differenz der aktuellen Position eines bestimmten Atoms zu dessen Position in einer gesetzten Referenzstruktur mit einem Faktor multipliziert wird. Die erhaltene Energie wird zur Gesamtenergie hinzuaddiert.

$$E_{Harm} = \sum_i k_{r_i} (x_i - x_i^{ref})^2 \quad (3.4)$$

x_i, x_i^{ref} Koordinaten-Sets des *restrained* und des Referenzatoms

k_{r_i} Kraftkonstante für das *Restrainen* eines Atoms

Beim Fixieren von Atomen wird die aktuelle Position der ausgewählten Atome eingefroren. Um die Rechenzeit zu verkürzen, werden Wechselwirkungen von fixierten Atomen untereinander nicht mehr berechnet. Das hat zur Folge, dass mit einem unterschiedlichen Muster von fixierten Atomen berechnete Energieinhalte ähnlicher Strukturen nicht mehr vergleichbar sind, so dass sich dieses Muster während einer Simulation oder bei Vergleich der Energie verschiedener Strukturen nicht ändern darf.

3.1.2 *Cutoff* und Dielektrizitätskonstante

Eine effiziente Verkürzung der Rechenzeit wird durch die Anwendung eines *Cutoffs* erreicht. Der *Cutoff* gibt die Distanz an, von der an keine nichtkovalenten („*nonbonded*“) Wechselwirkungen mehr mit Atomen berechnet werden, die weiter entfernt sind als die gesetzte *Cutoff*-Distanz. Der *Cutoff* hat durch die Modifizierung der Coulomb-Energierterme einen großen Einfluss auf die absolute Energie eines Systems, so dass es wichtig ist, die *Cutoff*-Parameter innerhalb einer Untersuchung konstant zu halten.

Der *Cutoff* wurde unter Anwendung einer *Shifting*-Funktion definiert. Diese Funktion sorgt dafür, dass die Wechselwirkungen über einen zu definierenden Bereich (i.d.R. 4 Å) von 100 auf 0 % skaliert werden und so keine scharfe Interaktionsgrenze entsteht [90]. In der vorliegenden Arbeit wurden die Standard-*Cutoffs* von CHARMM für große Proteinsysteme genutzt, bei denen unter Anwendung einer Dielektrizitätskonstante von 1 eine Skalierung der nichtkovalenten Wechselwirkungen innerhalb der Distanz von 8 Å auf 12 Å erfolgte.

3.1.3 Energien von Wasserstoffbrücken

Im Gegensatz zu einigen anderen Kraftfeldern gibt es im CHARMM22-Kraftfeld keinen separaten Energieterm für die Berechnung von Wasserstoffbrückenenergien. Die Parametrisierung des Kraftfelds ist so durchgeführt worden, dass alleine durch die Berechnung der elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen beteiligten Donor- und Akzeptor-Atomen einer Wasserstoffbrücke die Energieveränderungen durch Bildung oder Bruch derselben beschrieben werden.

3.1.4 „Shake“-Algorithmus

Der in CHARMM implementierte „Shake“-Algorithmus wird verwendet, um Rechenzeit während der Durchführung von Moleküldynamik-Simulationen einzusparen. Bei Anwendung des Shake-Algorithmus können Bindungslängen und -winkel während einer Simulation konstant gehalten werden, was eine Verdopplung der Schrittgröße erlaubt und so die zugängliche Simulationsdauer effektiv verdoppelt [91]. In der vorliegenden Arbeit wurde dieser Algorithmus während Moleküldynamik-Simulationen für alle Bindungen, an denen Wasserstoffatome beteiligt sind, angewendet.

3.2 Geometrieoptimierungen und Moleküldynamik-Simulationen

Mit Hilfe von Algorithmen zur Energieminimierung ist es möglich, Strukturen entsprechend der Parameter des angewendeten Kraftfeldes in ihrer Geometrie zu optimieren. Die Minimierung wird gestoppt, wenn entweder eine bestimmte vorgegebene Maximalschrittzahl erreicht wird oder wenn die Energieänderung innerhalb eines Schrittes einem ebenfalls vorgegebenen Abbruchkriterium (Konvergenzkriterium) genügt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Methoden für die Energieminimierungen von Geometrien verwendet.

Bei Anwendung der „Steepest-Descent“ (SD) Methode werden die Atome nach einem vorgegebenen Inkrement in negative Richtung des Energiegradienten bewegt, um ein nahes lokales Minimum auf der Potenzialfläche zu finden. Diese Methode eignet sich aufgrund der sehr günstigen Rechenzeit für die initiale Minimierung von Konformationen mit hohem Energieinhalt. Präzise, globale Minima werden mit SD-Minimierungen nicht erreicht.

Für eine qualitativ anspruchsvollere Minimierung bietet sich die „Adopted Basis Set Newton-Raphson“ (ABNR) Methode an. Diese sehr rechenintensive Minimierungsmethode stellt eine von *States* weiterentwickelte und in CHARMM implementierte Methode der „Newton-Raphson“ Minimierung dar [87][92]. Hier wird die Ableitung des Energiegradienten berechnet und der Punkt gesucht, bei dem der Wert für diese Ableitung gleich Null wird. Des Weiteren wird durch Einbeziehung der zweiten Ableitung, das irrümliche optimieren einer Struktur an einem Sattelpunkt verhindert. Mit ABNR-Minimierungen ist es möglich, energetisch äußerst stabile Geometrien zu finden.

Bei Moleküldynamik-Simulationen (MD-Simulationen) [93][94] werden die Konformationsänderungen eines Moleküls in Abhängigkeit von der Zeit modelliert. Durch Anwendung von MD-Simulationen können Einblicke in die Stabilität und den energetisch konformativen Freiraum des betrachteten Moleküls gewonnen werden. In der vorliegenden Arbeit wurden bei MD-Simulationen „*Langevin-Dynamics*“ [95] in Verbindung mit der in Kapitel 3.4.2.2 beschriebenen SBC-Methode für stochastische Randbedingungen angewendet.

3.3 Root-Mean-Square-Wert

Der *Root-Mean-Square-Wert* (RMSD-Wert) ist ein Maß für die Übereinstimmung bzw. für die Abweichung der Konformationen beim Vergleich verschiedener Geometrien. Er ist definiert als die Wurzel der Summe der Abstandsquadrate der Koordinaten der zu vergleichenden Geometrie (x, y, z) zu denen der Referenzstruktur (x^0, y^0, z^0), geteilt durch die Anzahl der betrachteten Atome N . Wird der RMSD-Wert für den Vergleich mehrerer Strukturen verwendet, muss beachtet werden, dass er nur einen Mittelwert über die betrachteten Atome darstellt, so dass ihre Auswahl immer einheitlich erfolgen muss.

$$RMSD = \sqrt{\sum_{i=1}^N \frac{(x - x^0)^2 + (y - y^0)^2 + (z - z^0)^2}{N}} \quad (3.5)$$

$RMSD$	Root Mean Square-Wert
x, y, z	Koordinaten der zu vergleichenden Geometrie
x^0, y^0, z^0	Koordinaten der Referenzgeometrie
N	Anzahl der Atome

3.4 QM/MM – Kombinierte quantenmechanische/molekularmechanische Methoden

Zur Untersuchung des Reaktionsmechanismus von β -Lactamasen wurde in der vorliegenden Arbeit die QM/MM-Methode, eine Hybridmethode von quantenmechanischen und molekularmechanischen Ansätzen, angewendet. Diese in der Praxis noch junge Methode soll deshalb hier ausführlicher erläutert werden.

3.4.1 Möglichkeiten der QM/MM-Anwendungen

Die Entwicklung der QM/MM–Methoden hatte zum Ziel, quantenmechanische Ansätze auch auf große Systeme anzuwenden, die aufgrund der zu hohen Rechenzeiten für diese Methoden nicht zugänglich waren. Konnte man mit Hilfe empirischer Kraftfeldtheorien auch große Biosysteme erfolgreich simulieren, so

waren die quantenmechanischen Verfahren ausschließlich für die Chemie und Physik kleiner Moleküle praktikabel. Trotz des grossen Fortschritts in der Computertechnologie, wird es auch bei optimistischster Denkweise in absehbarer Zeit nicht möglich sein, Makromoleküle wie Lipidmembranen, Proteine oder DNS, die aus mehreren tausend Atomen bestehen, quantenmechanisch zu behandeln.

Die Modellierung von chemischen Reaktionen ist ausschließlich durch die Anwendung quantenmechanischer Verfahren möglich. Dies soll anhand eines Bindungsbruchs verdeutlicht werden. Für alle von kovalenten Bindungen abhängigen Energieterme eines Kraftfelds soll hier stellvertretend nur die Bindungslängenenergie betrachtet werden (Gleichung 3.6). Die Bindungslängenenergie wird dabei über die Abweichung der Bindungslänge von der Gleichgewichtsbindungslänge berechnet.

$$E_{bond} = \frac{1}{2} \sum_i k_{b_j} (b_j - b_j^0)^2 \quad (3.6)$$

k_{b_j} Bindungsart(b_j)-abhängige Kraftkonstante

b_j aktuelle Bindungslänge

b_j^0 Gleichgewichts-Bindungslänge

Ein reales System besitzt sowohl an der Gleichgewichtsgeometrie des Edukts als auch an der des Produkts ein Energieminimum. Zwischen diesen Minima befindet sich der Übergangszustand mit höherem Energieinhalt (s. Abbildung 3.1). Dieses Verhalten kann mit QM-Methoden reproduziert werden. Mit MM-Methoden steigt durch die Definition der Bindungslängenenergie die Energie exponentiell mit der Auslenkung der Bindungslänge der brechenden Bindung an. Weder der Übergangszustand noch die Minimumgeometrie des Produkts ist darstellbar.

Aus diesem Grund kann der Reaktionsmechanismus von Enzymen, deren Aufgabe es ist biochemische Reaktionen zu katalysieren, nicht *in silico* durch Kraftfeld-Methoden untersucht werden. Molekularmechanische Affinitätsberechnungen zwischen Enzym und Substrat können hilfreiche Daten zur der Bildung des Michaelis-Menten Komplexes liefern, detaillierte Einblicke in die ablaufende Reaktion können sie jedoch nicht geben. Die Entwicklung der

QM/MM-Theorie 1976 durch *Warshel* und *Levitt* gab nun erstmals die Möglichkeit, Reaktionen in dem aktiven Zentrum eines Enzyms theoretisch zu beschreiben [96]. Praktikabel wurden QM/MM-Anwendungen allerdings erst in jüngster Vergangenheit durch die grossen Fortschritte in der Computertechnologie in Verbindung mit rechenzeitparenden Optimierungen der Methoden [97].

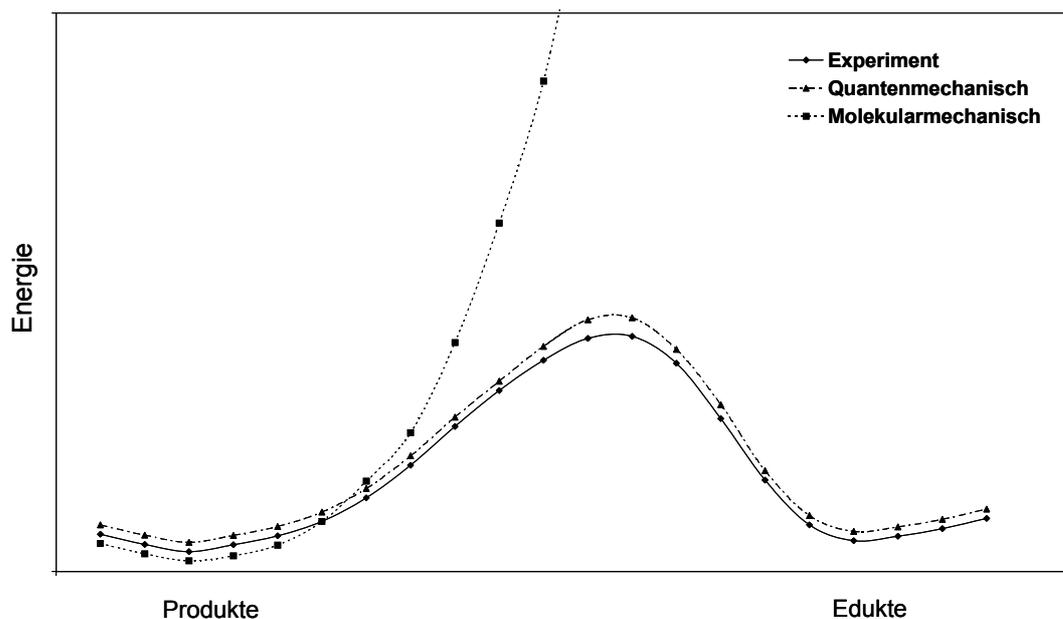


Abbildung 3.1 Energieverlauf einer Reaktion mit Daten unterschiedlichen Ursprungs

3.4.2 Methodik

3.4.2.1 Partitionierung des Systems

Zu Beginn einer QM/MM-Berechnung muss das Gesamtsystem in eine QM- und eine MM-Region unterteilt werden (s. Abbildung 3.2). Zusammen mit der Randregion (*Boundary-Region*) wird das System so durch drei Regionen, die in die Berechnungen eingehen, beschrieben.

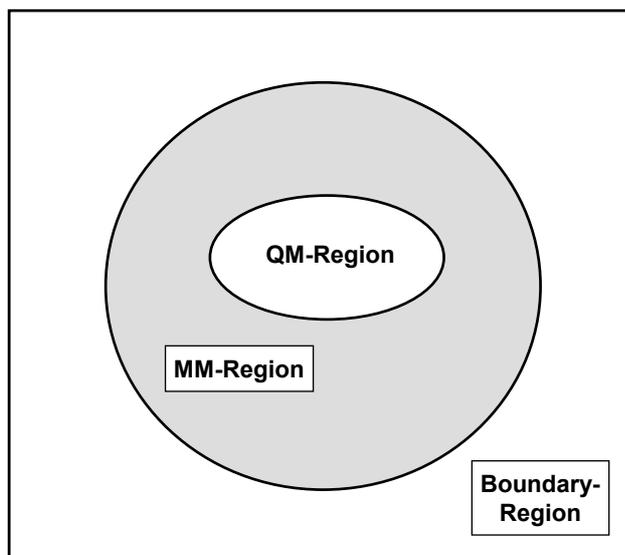


Abbildung 3.2 Partitionierung eines QM/MM-Systems

Die „QM-Region“ enthält außer dem Substrat alle Aminosäuren(-teile), die aufgrund ihrer katalytischen Funktion unentbehrlich sind oder aus anderen Gründen quantenmechanisch behandelt werden müssen¹. Die „MM-Region“ besteht aus den restlichen Atomen des Proteins sowie allen Lösungsmittelmolekülen. Die „Boundary-Region“ steht für die Umgebungsbedingungen, die durch QM- und MM-Atome allein nicht erfasst werden.

Atome in der QM-Region werden als Kerne und Elektronen repräsentiert. Die Potenzialhyperfläche dieser Atome wird mit Hilfe der Born-Oppenheimer-Näherung bestimmt, so dass die Energie als Funktion der Kernkoordinaten erhalten wird [98]. MM-Atome werden als Massepunkte und nicht als Kerne und Elektronen dargestellt, ihre Potenziale werden von empirischen Energiefunktionen bestimmt [87]. Zwischen der MM- und der in ihr eingebetteten QM-Region werden Wechselwirkungen berechnet, so dass die Proteinumgebung für die im QM-Teil ablaufende Reaktion realistisch wiedergegeben wird.

¹ Bestimmte Atome oder Atomgruppen können auch eingeschlossen werden, wenn z.B. angeregte Zustände eine Rolle spielen.

3.4.2.2 Der System-Hamiltonian

Um die Energie der Atome des gesamten Systems zu berechnen, wird ein effektiver Hamiltonian zusammengesetzt, so dass die zeitunabhängige Schrödinger-Gleichung für die Wellenfunktion der Elektronen formuliert werden kann (3.7).

$$\hat{H}_{Eff} \Psi(\mathbf{r}, \mathbf{R}_\alpha, \mathbf{R}_M) = E(\mathbf{R}_\alpha, \mathbf{R}_M) \Psi(\mathbf{r}, \mathbf{R}_\alpha, \mathbf{R}_M) \quad (3.7)$$

\hat{H}_{Eff}	Effektiver Hamiltonian
Ψ	Wellenfunktion
E	Energie des Systems
\mathbf{r}	Koordinaten der Elektronen der QM-Atome
\mathbf{R}_α	Koordinaten der QM-Atomkerne
\mathbf{R}_M	Koordinaten der MM-Atome

Die Wellenfunktion ist eine Funktion der Elektronenkoordinaten und hängt sowohl von den Kernkoordinaten der QM- als auch der MM-Atome ab. Die Energie wird für jede durch die QM-Kernkoordinaten definierte Geometrie berechnet, und bestimmt so die Born-Oppenheimer Potenzialfläche des Systems. Diese wird gegeben durch den Erwartungswert der Wellenfunktion für den Hamiltonian (3.8).

$$E = \frac{\langle \Psi | \hat{H}_{Eff} | \Psi \rangle}{\langle \Psi | \Psi \rangle} \quad (3.8)$$

Der verwendete effektive Hamiltonian setzt sich aus einzelnen Hamiltonians zusammen (3.9).

$$\hat{H}_{Eff} = \hat{H}_{QM} + \hat{H}_{MM} + \hat{H}_{QM/MM} + \hat{H}_{Boundary} \quad (3.9)$$

Die Gesamtenergie des Systems ist demnach die Summe der Erwartungswerte jedes dieser Hamiltonians (3.10).

$$E_{Tot} = E_{QM} + E_{MM} + E_{QM/MM} + E_{Boundary} \quad (3.10)$$

Der **QM-Hamiltonian** (\hat{H}_{QM}) beschreibt die quantenmechanischen Partikel (Kerne und Elektronen) sowie deren Wechselwirkungen untereinander und wird in Atomeinheiten wie in Gleichung (3.11) ausgedrückt (für Details s. quantenmechanische Fachliteratur z.B. [99][100]).

$$\hat{H}_{QM} = -\frac{1}{2} \sum_i \nabla_i^2 + \sum_{ij} \frac{1}{r_{ij}} - \sum_{i\alpha} \frac{Z_\alpha}{r_{i\alpha}} + \sum_{\alpha\beta} \frac{Z_\alpha Z_\beta}{R_{\alpha\beta}} \quad (3.11)$$

i, j Elektronenkoordinaten

α, β Kernkoordinaten

r Elektron/Elektron oder Elektron/Kern - Distanz

R Kern/Kern - Distanz

Z Kernladung

In der vorliegenden Arbeit wurde die semiempirische Methode AM1 (*Austin Model 1*, [101][102]) zur Beschreibung der QM-Atome verwendet. Bei semiempirischen Methoden werden im Vergleich zu *ab initio* Verfahren mehrere zusätzliche Vereinfachungen und Näherungen eingeführt, um die Rechenzeit zu verkürzen. Zudem werden mehrere Integrale, die sich bei der Lösung der Schrödinger-Gleichung ergeben, nicht explizit gelöst, sondern als Parameter vorgegeben. Diese Parameter entstammen experimentellen und theoretischen Untersuchungen [103]. Semiempirische Methoden haben sich aufgrund dieses empirischen Anteils in vielen Fällen *ab initio* Methoden mit kleinen Basissätzen als überlegen erwiesen. AM1 ist u.a. für alle in dieser Arbeit auftretenden Elemente (das sind Wasserstoff, Kohlenstoff, Sauerstoff, Stickstoff, Schwefel) parametrisiert worden.

Der **MM-Hamiltonian** (\hat{H}_{MM}) ist eine Funktion der Atomkoordinaten der MM-Atome, deren Energie demzufolge über molekularmechanische Methoden bestimmt wird [87].

Der **QM/MM-Hamiltonian** ($\hat{H}_{QM/MM}$) beschreibt die Interaktion zwischen QM- und MM-Atomen (3.12).

$$\hat{H}_{QM/MM} = -\sum_{iM} \frac{q_M}{r_{iM}} + \sum_{\alpha M} \frac{Z_\alpha q_M}{R_{\alpha M}} + \sum_{\alpha M} \left\{ \frac{A_{\alpha M}}{R_{\alpha M}^{12}} - \frac{B_{\alpha M}}{R_{\alpha M}^6} \right\} \quad (3.12)$$

- i, α QM-Elektronen bzw. Kerne
- M MM-Atom
- q Elektronenladung
- Z Kernladung
- A Konstante für repulsiven Term
- B Konstante für attraktiven Term

Die Wechselwirkungen zwischen den MM-Atomen und den QM-Atomen haben einen elektrostatischen Teil, der berechnet wird, indem die MM-Atome in den Hamiltonian als koordinatenabhängige Punktladungen eingehen. Van der Waals Wechselwirkungen werden durch Einführung eines Lennard-Jones Terms in den Hamiltonian berücksichtigt. Nur der erste Term in Gleichung (3.12) ist von den Koordinaten der Elektronen abhängig und muss daher auch quantenmechanisch betrachtet werden. Die letzten beiden Terme sind dagegen von den Elektronenkoordinaten unabhängig und können nach Berechnung direkt zur Gesamtenergie addiert werden (für weiterführende Erläuterungen s. [104]).

Der **Boundary-Hamiltonian** ($\hat{H}_{Boundary}$) bezieht sich auf die oben bereits angeführten Randbedingungen. Es können wie bei reinen Kraftfeldmethoden periodische- (PBC – „*periodic-boundary-conditions*“) [105] oder stochastische Randbedingungen (SBC – „*stochastic-boundary-conditions*“) [106] angewendet werden. Bei periodischen Randbedingungen wird das zu untersuchende System an allen begrenzenden Flächen gespiegelt, um zu verhindern, dass

sich Moleküle und Atome am Rand der Box aufgrund des angrenzenden Vakuums und der damit verbundenen erhöhten Freiheit artifiziell verhalten¹. In QM/MM-Systemen muss allerdings bei Verwendung periodischer Randbedingungen berücksichtigt werden, dass sich die Ladungsverteilung innerhalb der QM-Atome während der Berechnungen ändert. Diese Ladungsänderung muss auch in den gespiegelten Boxen berücksichtigt werden. Um realistische Ergebnisse zu erhalten muss nun entweder vor jedem erneuten Berechnen der Wellenfunktion eine Ladungsberechnung der QM-Atome durchgeführt werden oder das *Cutoff/Boxengrößenverhältnis* muss so gewählt werden, dass die gespiegelten QM-Atome keinen Einfluss mehr auf die zentrale Box haben.

In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich die SBC-Methode verwendet, bei der auf alle Atome ein nach innen gerichtetes Potenzial wirkt, das die Verhältnisse in einem Gitter oder einer Lösung wiedergeben soll. Die SBC-Methode ist besonders bei sphärischen Systemen von Vorteil und hat keinerlei Auswirkungen auf die oben beschriebene Berechnung des QM/MM-Potenzials.

3.4.2.3 *Link-Atome*

Das größte Problem bei der Anwendung der QM/MM-Methodik ist die Behandlung von Bindungen zwischen einem MM-Atom und einem QM-Atom, bei denen die Grenze zwischen QM- und MM-Region genau über diese Bindung verläuft.

In vielen QM/MM-Enzym-Systemen ist es nötig, die QM-Region so zu definieren, dass Teile von den umgebenden Aminosäuren eingeschlossen werden. Dies kann z.B. der Fall sein, wenn bestimmte Wechselwirkungen von Substrat und Aminosäuren genauer evaluiert werden sollen. Bei der Beschreibung von Enzymreaktionen, bei denen kovalente Bindungen zwischen Enzym und Substrat gebildet werden, ist es dagegen unerlässlich, die beteiligten Seitenketten im QM-Teil einzubinden. Die ohne zusätzliche Behandlung der Grenzbindung entstehenden freien Valenzen der QM-Atome müssen abgesättigt werden.

Es gibt viele Ansätze zur Behandlung derartiger Grenzprobleme [87][107]-[109]. Für die vorliegende Arbeit wurde das Prinzip der „*Link Atoms*“ verwendet, das

¹ Lösungsmittelmoleküle (und Seitenketten) tendieren dazu bei ungenügender Randbehandlung aus der Box „auszuwandern“.

breite Anwendung gefunden und in unterschiedlichsten Systemen sehr gute Ergebnisse erzielt hat [110]-[112].

In den meisten Fällen besteht ein Interesse daran, die funktionellen Gruppen bestimmter Seitenketten in die QM-Region zu integrieren. Bei den in vorliegender Arbeit durchgeführten QM/MM-Berechnungen wurden ausschließlich Seitenketten dem QM-Teil zugeordnet, so dass das angewendete Verfahren exemplarisch für ein Lysin verdeutlicht werden soll.

Die Grenze der QM-Region wird durch die Bindung des die funktionelle Gruppe tragenden Kohlenstoffs zum jeweils benachbarten Kohlenstoffatom in der Seitenkette gelegt. Im Falle von Lysin sind die ϵ -Methylengruppe sowie die Aminogruppe noch im QM-Teil enthalten, wohingegen alle anderen Atome, angefangen beim $C\delta$ -Kohlenstoffatom, dem durch Kraftfeld-Methoden beschriebenen Teil weiterhin zugehörig bleiben (s. Abbildung 3.3).

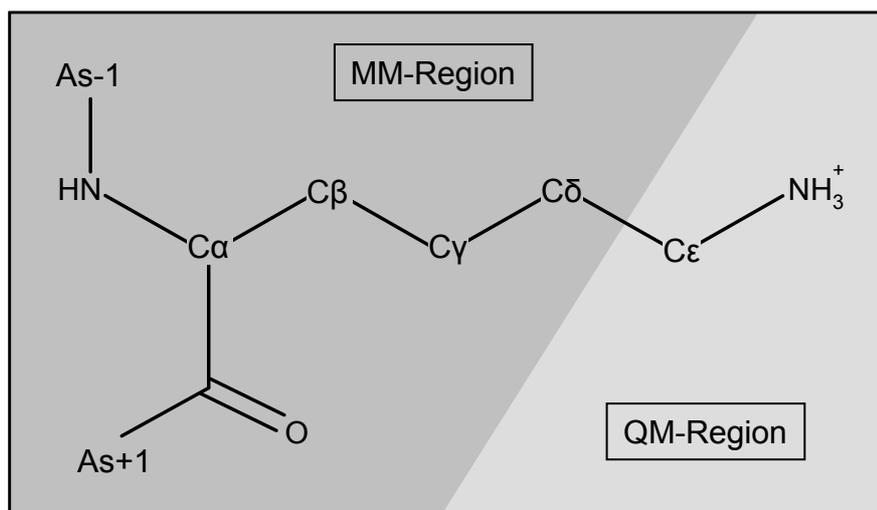


Abbildung 3.3 QM/MM-Grenze für die funktionelle Gruppe eines Lysin

Die durch den Ausschluss des $C\delta$ -Bindungselektrons entstandenen freien Valenzen werden nun abgesättigt, indem ein dem QM-Teil zugehöriges Wasserstoffatom, das *Link*-Atom, an das $C\epsilon$ -Atom entlang der Bindungsachse zu $C\delta$ addiert wird. Die QM-Region ist so effektiv nicht um eine Lysin-Seitenkette, sondern um eine Methylammoniumgruppe erweitert worden (s. Abbildung 3.4).

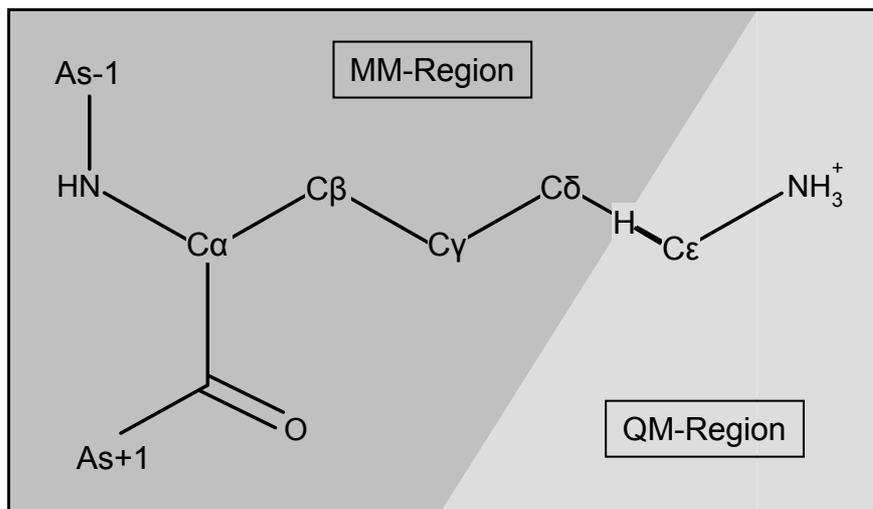


Abbildung 3.4 *Link*-Atom bei Einbindung einer Lysin-Seitenkette in die QM-Region

Aufgrund der Ausrichtung des *Link*-Atoms entlang der $C\epsilon$ - $C\delta$ Bindungsachse müssen seine van der Waals Parameter so gesetzt werden, dass es keine van der Waals Wechselwirkungen mit dem MM-Teil eingeht. Andernfalls würde der geringe Abstand von *Link*-Atom zu $C\delta$ -Atom zu hohen Energien und/oder dadurch verursachten falschen Geometrien führen.

Die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen *Link*-Atom und MM-Atomen werden hingegen berechnet. Die ursprünglich üblichen und in CHARMM-c27b2 enthaltenen *Link*-Atoms („QQ-Typ“), die völlig unsichtbar für die MM-Region sind, wurden nicht eingesetzt. Der Entwurf und die Definition eines oben beschriebenen *Link*-Atoms wurde durchgeführt, da gezeigt worden ist, dass QM/MM-Systeme, in denen nicht nur die restlichen QM-Atome, sondern auch die *Link*-Atome durch die Ladungen der MM-Atome beeinflusst werden („HQ-Typ“), bessere Ergebnisse liefern [113].

Es ist zu beachten, dass alle kovalenten Energieterme des Kraftfelds berechnet werden, an denen wenigstens ein MM-Atom beteiligt ist. Die kovalenten Energien werden nur ausgeschlossen, wenn sie ausschließlich QM-Atome betreffen. Für das Beispiel oben bedeutet dies, dass beispielsweise die Bindungswinkelenergie des Winkels $\theta = [C\gamma:C\delta:C\epsilon]$ berechnet wird. Die Bindungslängenenergie der Bindung $b = [C\epsilon:N]$ geht dagegen nicht mehr in die Energie ein.

Sämtliche QM/MM-Berechnungen wurden mit dem Programm CHARMM [87] durchgeführt, das dazu mit Teilen des semiempirischen Rechenprogramms MOPAC [114] kombiniert worden ist [104].

3.5 Energie-Korrekturen von AM1

Die QM-Region der durch QM/MM-berechneten Reaktionen wurde durch die semiempirische Methode AM1 beschrieben. Um AM1-bedingte Ungenauigkeiten und Schwächen aufzuklären, wurden die mit AM1 erhaltenen Energien korrigiert.

Bei quantenmechanischen Energieberechnungen hat sich gezeigt, dass sich die mit verschiedenen Methoden und Basissätzen berechneten Geometrien nur geringfügig unterscheiden, die zugehörigen Energien dagegen stark differieren können. Ist der Energieinhalt verschiedener Strukturen von Interesse, bietet sich an, die Geometrien mit einer schnellen Methode mit kleinem Basissatz zunächst zu optimieren. Anschließend wird mit einem aufwendigeren Verfahren mit größerem Basissatz der Energieinhalt der erhaltenen Geometrien durch Einzelpunktrechnungen neu bestimmt.

Für die vielfältigen Kombinationsmöglichkeiten von semiempirischen, *ab initio* Hartree-Fock- und Dichtefunktionaltheorie-Methoden (DFT, [115]-[118]) stehen viele Erfahrungswerte zur Verfügung, an denen die Verringerung der Abweichung zu experimentellen Daten von Gasphasen-Reaktionen abgelesen werden kann [119]. Für die Neuberechnung von Energien AM1-optimierter Geometrien haben sich die Methoden der Dichtefunktionaltheorie den Hartree-Fock *ab initio*-Methoden als überlegen erwiesen [120][121]. B3LYP/6-31+G(d) hat sich dabei als sinnvollstes Verfahren das Verhältnis von zu erreichender Genauigkeit und benötigter Rechenzeit betreffend herausgestellt.

Auch die durch QM/MM-Ansätze erhaltenen Energien lassen sich auf diese Weise korrigieren. Während die durch AM1 berechneten QM/MM-Wechselwirkungsenergien i.d.R. sehr gut sind, kann sich in der AM1-Energie der QM-Atome eine Fehlerquelle ergeben.

Zur einzelnen Neuberechnung der QM-Energie wurden die QM-Atome von den MM-Atomen isoliert, da die in Gleichung 3.10 separat aufgeführten QM- und QM/MM-Energierterme immer zusammen berechnet werden. Die Energien der isolierten Geometrien der QM-Atome wurden anschließend im Vakuum je

einmal mit AM1 und mit B3LYP/6-31+G(d) berechnet. Die korrigierten Energien wurden erhalten, indem in der aus Gleichung 3.10 berechneten Gesamtenergie die AM1-Energie mit der B3LYP-Energie ausgetauscht wird (Gleichung 3.13). Der quantenmechanische Anteil der Gesamtenergie setzt sich nach erfolgter Neuberechnung dann aus der AM1-QM/MM-Wechselwirkungsenergie und der B3LYP/6-31+G(d)-Vakuum Energie der QM-Atome zusammen.

$$E_{Korr} = E_{Tot} - E_{QM_{AM1_Vakuum}} + E_{QM_{B3LYP_Vakuum}} \quad (3.13)$$

3.6 Modellierung von Reaktionen

Eine Reaktion in der organischen Chemie zeichnet sich durch Bindungsbrüche und Bindungsbildungen aus. Zwischen Edukten und Produkten liegen immer ein oder mehrere Übergangszustände, die die energetisch günstigsten Geometrien für deren Übergang ineinander repräsentieren. Das Energieniveau eines Übergangszustandes liegt jedoch immer höher als das der zugehörigen Edukte, Zwischenprodukte oder Produkte. Der Energieunterschied zwischen diesen Niveaus wird als Aktivierungsenergie bzw. Barriere („*Barrier*“) bezeichnet. Dieser Energieunterschied ist auch dafür verantwortlich, dass Minimierungs- oder Moleküldynamikalgorithmen von einer bestimmten Struktur ausgehend normalerweise nicht die Geometrie eines Übergangszustandes oder Produktes darstellen können, da das System ohne weitere Eingriffe von außen diese Barriere nicht überwinden kann.

Bei der Modellierung von Reaktionen wird eine Reaktionskoordinate bestimmt, die ein System entlang eines durch die Koordinate vorgegebenen Reaktionswegs führen soll. Die Reaktionskoordinate wird durch Variablen definiert, die sich mit Fortschreiten der Reaktion ändern und so ein Potenzial erzeugen, dass das System über den Energieberg zwingt. Die eingesetzten Variablen können den Wert einer beliebigen geometriebeschreibenden Kenngröße wiedergeben. Sowohl bei Bindungsbruch als auch bei deren Bildung bietet sich die Definition der Reaktionskoordinate über Bindungslängen bzw. über Atomabstände an. Am Beispiel der Reaktion von Essigsäure mit Wasser soll das angewandte Verfahren verdeutlicht werden.

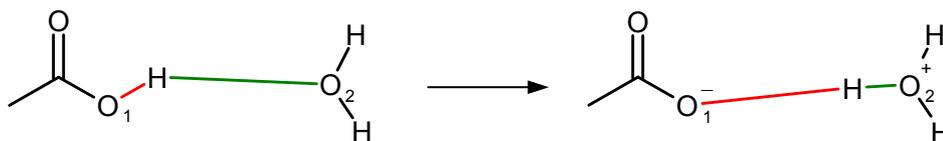


Abbildung 3.5 Definition einer Reaktionskoordinate:
 Rot - zu brechende Bindung
 Grün - zu bildende Bindung

Das Fortschreiten der Reaktion wird definiert über das Maß des Anwachsens des Abstandes der beiden Atome deren Bindung gebrochen werden soll ($O_1:H$, rot), und über das Maß der Verminderung des Abstandes der beiden Atome deren Bindung gebildet werden soll ($O_2:H$, grün). Da nicht bekannt ist, wie sich die Atomabstände im Verlauf der Reaktion relativ zueinander verändern, muss dem System die Freiheit gegeben werden Geometrien des jeweils energetisch günstigsten Verhältnisses zu berechnen.

Diese Unabhängigkeit wird erreicht, indem nicht für jede Bindungslänge ein *Restraint* gesetzt wird, sondern beide Distanzen in einer Variablen vereint werden, die das Potenzial der Reaktionskoordinaten bestimmt. Mit Hilfe des CHARMM-Befehls „RESDistance“ [122], der es erlaubt einen distanzabhängigen harmonischen *Restraint* zu setzen, kann für obige Reaktion die Reaktionskoordinate R wie in (3.14),

$$R = d(O_1 : H) - d(O_2 : H) \quad (3.14)$$

oder allgemein wie in (3.15) formuliert werden.

$$R = I_{ab} d(ab) + I_{bc} d(bc) \quad (3.15)$$

d Distanz zwischen zwei Atomen(a, b oder c)

I optionaler Wichtungsfaktor für einzelne Atompaare

Das entsprechende Potenzial wird in Analogie zu der Berechnung von Bindungsenergien bestimmt:

$$E_R = \sum_i k_{R_i} (R_i - R_i^0)^2 \quad (3.16)$$

Die Größe der Kraftkonstante k_R wird so gewählt, dass das System dem durch die Reaktionskoordinate definierten Abstandsverhältnis genügen muss. In der vorliegenden Arbeit wurde für alle Reaktionskoordinaten eine Kraftkonstante von $5000 \text{ kcal mol}^{-1}$ angewendet, die so groß ist, dass das System die durch die Reaktionskoordinate vorgegebenen Bedingungen einhält.

Die Energien der Potenzialhyperfläche einer Reaktion werden erhalten, indem ausgehend von einer energieminierten Ausgangsstruktur des Edukts, die Variable der Reaktionskoordinate schrittweise verändert wird und anschließend jedes Mal die Geometrie erneut energieminiert wird. Die Schrittgröße der Veränderung von R^0 bestimmt so die Anzahl der Strukturen, die zwischen der Edukt- und der Produktgeometrie berechnet werden und ist daher ein Maß für die Genauigkeit, mit der ein potenzieller Übergangszustand zwischen diesen Ausgangs- und Endzuständen der Reaktion bestimmt wird.

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Reaktionswegberechnungen wurde jede Struktur bis zu einem Abbruchkriterium von $0,01 \text{ kcal mol}^{-1}$ energieminiert. Sämtliche durch *Restraints* hervorgerufene Potenziale sind nicht zum Energieinhalt der Struktur gehörig und dürfen nicht in die Potenzialfläche eingehen. Nach jeder Minimierung wurde daher eine Einzelpunktrechnung ohne *Restraints* durchgeführt. Die dadurch erhaltenen Energien der optimierten Strukturen können dann zur Bestimmung des Energieprofils bzw. der Potenzialfläche der Reaktion herangezogen werden.

4 ERGEBNISSE

4.1 Vorgehensweise

In der vorliegenden Arbeit wurde der Acylierungsmechanismus für Klasse A β -Lactamasen untersucht. Wie in Kapitel 1.6.1 beschrieben, musste dazu entschieden werden, wie die entscheidenden Protonenübergänge ablaufen sollten und vor allem, wie die Aktivierung von Ser70 durch das aktive Zentrum gewährleistet wird.

Nach Auswahl des Modellenzym wurde in Moleküldynamik-Simulationen versucht, Hinweise auf den Protonierungsgrad von Lys73 zu erhalten, um dann unter Einbeziehung der verfügbaren Literatur einen Mechanismus zu modellieren, der übereinstimmend mit experimentellen Daten und theoretischen Untersuchungen die als *General Base* eingesetzte Aminosäure bestätigt.

4.1.1 Auswahl der Klasse A β -Lactamase

Zu Beginn der Untersuchungen wurde eine der derzeit 48 Klasse A β -Lactamasen, deren Röntgenstruktur aufgeklärt und in der *Proteindatenbank* (PDB; [123]) abgelegt sind, als Vorlage ausgewählt. Bei der Auswahl des Modellenzym waren zwei Aspekte von entscheidender Bedeutung:

- Einerseits muss das Enzym eines der Klasse A β -Lactamasen sein, das durch möglichst viele unabhängige Studien quantitativ untersucht worden ist, um die Ergebnisse des modellierten Reaktionsmechanismus überprüfen zu können. Qualitative Ergebnisse dagegen können, auch wenn sie von verschiedenen Klasse A β -Lactamasen stammen, aufgrund der hohen Homologie innerhalb dieser Familie (s. Kapitel 1.3.1.2) auf alle Vertreter übertragen werden.
- Zum anderen ist die Verfügbarkeit einer (oder mehrerer) sehr gut aufgelöster Kristallstrukturen sehr wichtig, da die Ergebnisse der Modellierung von enzymkatalysierten Reaktionen in hohem Maße von einer stabilen Enzymstruktur abhängen. Die Güte der eingesetzten Kristallstruktur ist entscheidend, da selbst geringe Modulationen peripherer Proteinabschnitte während einer Simulation große Auswirkungen auf die Energie haben können. Die Änderung der Energie soll aber ausschließlich in Abhängigkeit von dem Fortschreiten der Reaktionen verfolgt werden, die durch die angewendeten Reaktionskoordinaten hervorgerufen werden.

Für die Untersuchungen des Acylierungsmechanismus in der vorliegenden Arbeit wurde die β -Lactamase TEM1 von *Escherichia Coli* ausgewählt (Swiss-Prot: P00810). Für dieses 1978 sowohl DNA- [124] als auch aminosäuresequenzierte [125] Enzym sind neben einer Reihe von Kristallstrukturen weitere experimentelle Daten zugänglich, da es sich um eine häufig verwendete Referenz- β -Lactamase handelt. Zudem sind außer Wild-Typ- und Mutations-Strukturen auch solche, die mit verschiedenen Modellsubstanzen im aktiven Zentrum zusammen aufgeklärt worden sind, in der *Proteindatenbank* verfügbar.

4.2 Moleküldynamik-Simulationen des aktiven Zentrums

Die Unkenntnis des Protonierungsgrades von Lys73 stellt für die Entscheidung über die Identität der *General Base* und damit für den Mechanismus die größte Unsicherheit dar. Um einen Einblick in die Verhältnisse in dem aktiven Zentrum zu erhalten, wurden Moleküldynamik-Simulationen zur Untersuchung des Protonierungsgrades von Lys73 durchgeführt. Hierbei wurden zwei identische MD-Simulationen aufgesetzt mit dem Unterschied, dass bei einer Lys73 protoniert und bei der anderen Lys73 neutral vorlag.

Über die Simulationsdauer wurde der RMSD-Wert der *Heavy-Atoms*¹ der von Seitenketten wichtiger Aminosäuren des aktiven Zentrums (s. Abbildung 1.7) im Vergleich zur Kristallstruktur verfolgt. Die Ergebnisse sollten dabei helfen, eine Abschätzung zu machen, wie sich das fragliche Vorhandensein einer Ladung auf die experimentell bestimmten Positionen der *Heavy-Atoms* auswirken.

Des Weiteren wurden die Bildung bzw. der Bruch der entscheidenden Wasserstoffbrücken aufgezeichnet, anhand derer ebenfalls Rückschlüsse auf die Wahrscheinlichkeit des einen oder anderen Protonierungszustandes gezogen werden können.

Als Startgeometrie wurde eine von *Swarén et al.* mit 2,3 Å Auflösung aufgeklärte, inhibitorfreie Kristallstruktur (PDB: 1CK3; [126]) eingesetzt. Die einzige Mutation in der verwendeten Struktur, eine vom aktiven Zentrum 21 Å entfernte N276D-Mutation wurde *in silico* wieder zurück umgewandelt.

¹ Der Begriff „*Heavy-Atoms*“ hat sich auch im Deutschen durchgesetzt, um alle „nicht“-Wasserstoffatome zu bezeichnen (in der vorliegenden Arbeit also C, N, O, S).

Da zur Beobachtung von RMSD-Werten und Wasserstoffbrücken keine quantenmechanischen Rechnungen zwingend notwendig sind, wurde eine rein molekularmechanische Simulation durchgeführt. Ansonsten wurde die Struktur analog dem - in Kapitel 4.5 ausführlich beschriebenen Protokoll - mit Wasserstoffen versehen und solvatisiert. Als Referenzkonformation für die Berechnung der RMSD-Werte diente die mit *Restraints* auf die *Heavy-Atoms* des *Backbones*¹ und der Seitenketten in 500 Schritten SD-Minimierung relaxierte Kristallstruktur.

4.2.1 RMSD-Wert Analyse

Nach einer initialen Equilibrierungsphase von 70 ps wurden über die folgenden 330 ps die RMSD-Werte der beobachteten Seitenketten alle 500 fs aufgezeichnet. Abbildung 4.1 zeigt die erhaltenen Diagramme.

In den MD-Simulationen erwies sich das aktive Zentrum sowohl mit protonierter als auch mit neutraler Lys73 Aminogruppe als äußerst stabil. Die Abweichungen der Seitenketten von den Konformationen der Kristallstruktur sind als sehr gering einzustufen, gemessen daran, dass es sich um RMSD-Werte, gewonnen aus einer freien MD-Simulation handelt. Einige Unterschiede lassen sich trotzdem ablesen.

Das katalytische Wasser – in dieser Kristallstruktur Wat307 – hat deutlich mehr Freiheiten in der Simulation mit einem neutralen Lysin, als in der mit einem protonierten. Es verlässt seine übliche Position zwischen Ser70, Glu166 und Asn170 und orientiert sich in Richtung des sich öffnenden aktiven Zentrums, wo es durch Wechselwirkungen von Asn132 und Glu166 festgehalten wird. Eine direkte Folge davon ist die zu beobachtende größere Flexibilität von Ser70.

Die RMSD-Werte von Arg244 und Glu166 zeigen in beiden Simulationen ein sehr einheitliches Bild. Lys73 selber unterscheidet sich nicht auffällig in seinen relativen Positionen von der Kristallstruktur, ob mit oder ohne protonierter ϵ -Aminogruppe, auch wenn in der MD-Simulation mit protoniertem Lys73 etwas geringere RMSD-Werte aufgezeichnet wurden.

¹ Mit *Backbone* werden die Atome der Peptidbindung sowie die C α -Atome (mit Wasserstoffen) der Aminosäuren bezeichnet, sie bilden das „Rückgrat“ eines Proteins.

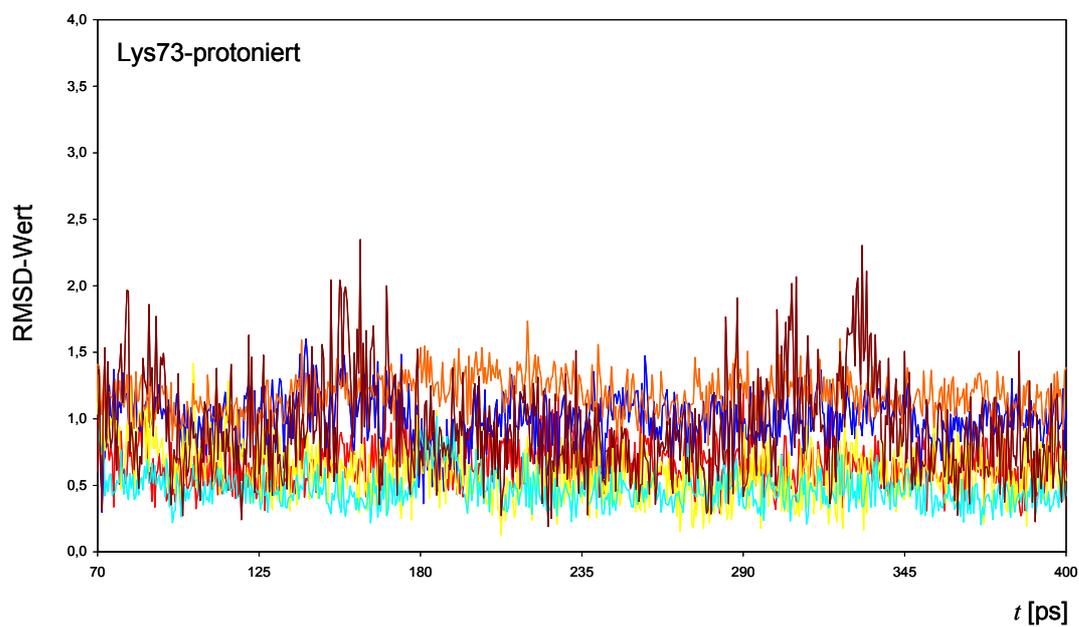
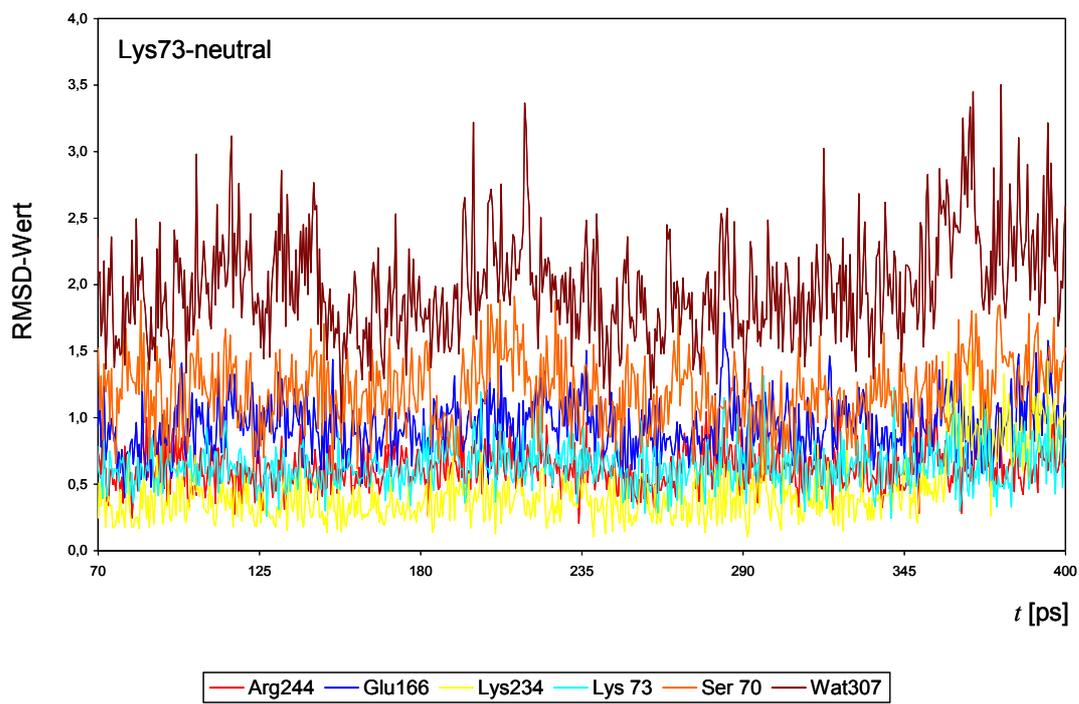


Abbildung 4.1 RMSD-Wert Schwankungen der *Heavy-Atoms* von Aminosäuren des aktiven Zentrums während einer 400ps MD-Simulation

Das benachbarte Lys234 scheint bis zum letzten Viertel der beobachteten Simulation stabiler in der Variante mit neutralem Lysin zu bleiben. Der RMSD-Wert steigt jedoch ab ca. 350 ps an und pendelt sich auf einem Niveau, vergleichbar dem der Moleküldynamik-Simulation mit protoniertem Lys73, ein.

4.2.2 Wasserstoffbrücken des aktiven Zentrums

Die über die Moleküldynamik-Simulationsdauer alle 500 fs aufgezeichneten Geometrien wurden nach Existenz und Stabilität mechanistisch entscheidender Wasserstoffbrücken des aktiven Zentrums untersucht.

Besonders wichtig sind hierbei die Wasserstoffbrücken, die das katalytische Wasser in seiner Position zwischen Ser70 und Glu166 fixieren (s. auch Kapitel 4.6.2). Die Funktion des katalytischen Wassers ist im Deacylierungsschritt sowohl nach einem Acylierungsmechanismus mit neutralem als auch mit protoniertem Lys73 identisch. Demnach darf der Protonierungsgrad von Lys73 keine Auswirkungen auf die Wasserstoffbrücken haben, die eine korrekte Position des Wassers gewährleisten. Für einen Mechanismus mit Glu166 als *General Base* (Lys73 protoniert) ist die Position des Wassers zusätzlich für den Acylierungsschritt wichtig.

Die Wasserstoffbrücke von Ser70 zum neutralen Lys73 ist essenziell für die Deprotonierung von Ser70, falls ein neutrales Lys73 als *General Base* wirken sollte.

4.2.2.1 Ser70-Lys73 (neutral) Wasserstoffbrücke

In Abbildung 4.2 ist die Dauer der Wasserstoffbrücke von Ser70 zu Lys73 in dem aktiven Zentrum des neutralen Lys73 in Abhängigkeit von der Simulationsdauer dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die in dem minimierten aktiven Zentrum noch vorhandene Brücke bei Beginn der Simulation verschwindet und sich nur noch vorübergehend für jeweils wenige Femtosekunden erneut bildet.

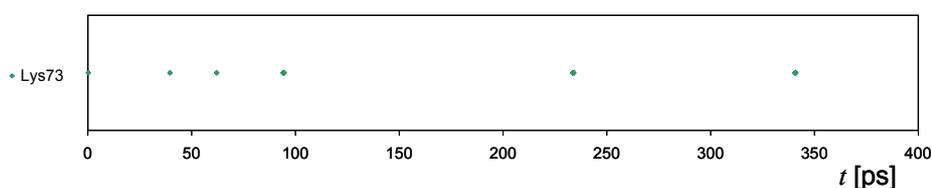


Abbildung 4.2 Lebensdauer der Ser70-Lys73 Wasserstoffbrücke; MD-Simulation - Lys73 neutral

4.2.2.2 Wasserstoffbrücken des katalytischen Wassers (Wat307)

Für die Betrachtung des Wasserstoffbrückenmusters des katalytischen Wassermoleküls ist die Einbeziehung mehrerer Aminosäuren nötig, da das Wasser im Vergleich zu einer Aminosäure eine erhöhte Flexibilität besitzt und so auch mit verschiedenen Aminosäuren des aktiven Zentrums interagieren kann.

Die Dauer der jeweiligen Wasserstoffbrücke des Wassers mit den unterschiedlichen Aminosäuren ist jeweils in getrennten Zeitskalen für die beiden Protonierungszustände von Lys73 in Abbildung 4.3 wiedergegeben.

Sowohl das aktive Zentrum des neutralen als auch das des protonierten Lysins scheint eine ausreichende Stabilisierung der Position des katalytischen Wassers zu leisten. In beiden reißt der Kontakt zu Glu166 über die gesamte Simulationsdauer nicht ab, auch wenn das jeweils beteiligte Sauerstoffatom des Glutamats dabei variabel ist. Ebenfalls regelmäßig vorhanden ist die Wasserstoffbrücke zu Ser70.

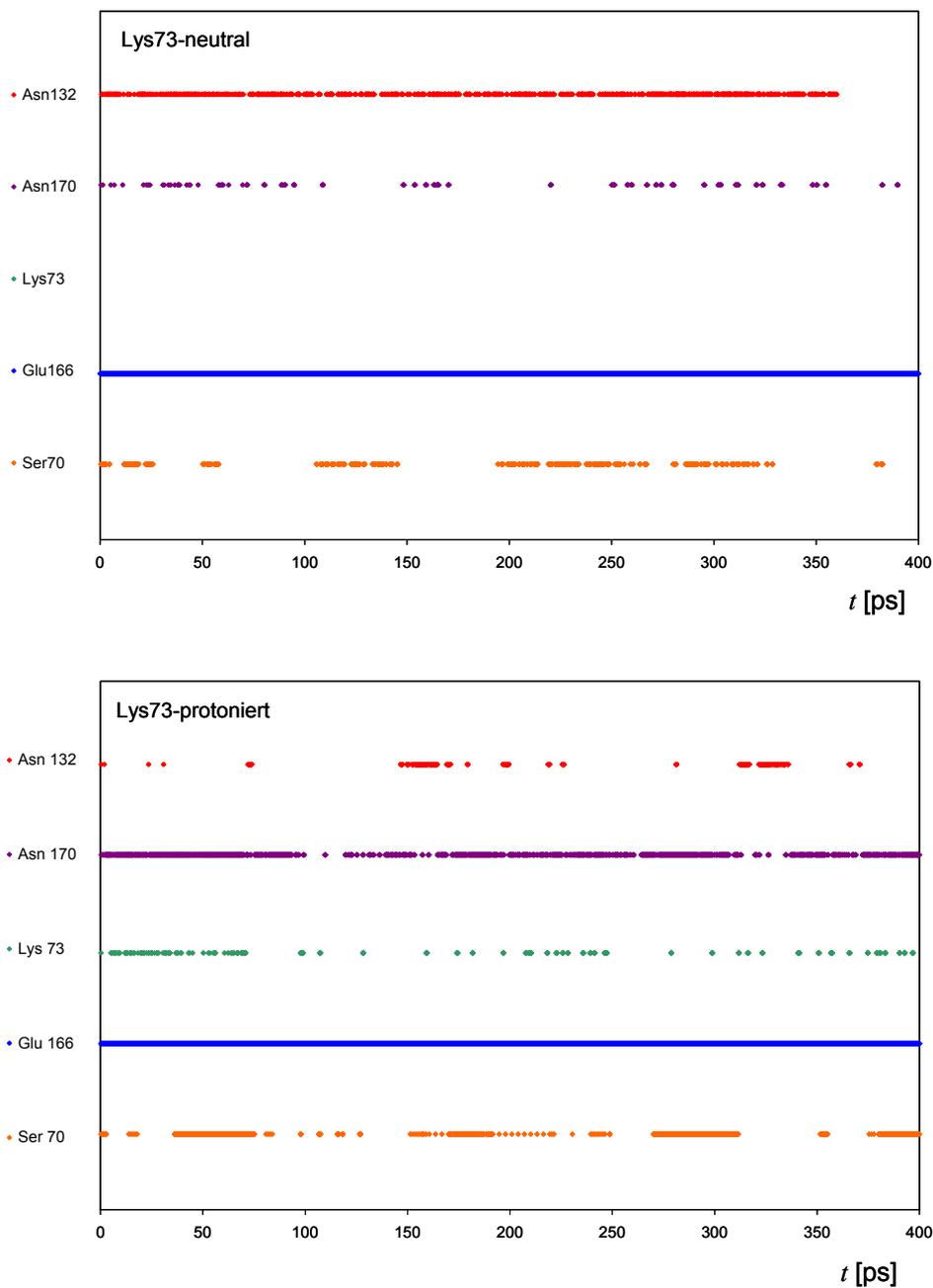


Abbildung 4.3 Lebensdauer der Wasserstoffbrücken von Wat307 mit verschiedenen Aminosäuren des aktiven Zentrums mit neutralem oder protoniertem Lys73

Die Hauptunterschiede werden bei der dritten beteiligten Aminosäure deutlich. Während in der Simulation mit protoniertem Lys73 das konservierte Asn170 als weiterer Hauptwechselwirkungspartner auftritt, ist das in der Simulation mit neutralem Lysin die Aminosäure Asn132. Asn132 ist im Vergleich zu Asn170 weniger zentral, sondern mehr in Richtung des sich öffnenden aktiven Zentrums

platziert. Die Folge davon ist, dass das Wasser seine angestammte Position verlassen muss, um mit Asn132 interagieren zu können.

Das ist auch an dem vorübergehenden Auftreten einer Wasserstoffbrücke zu dem ebenfalls zentralen Lys73 erkennbar. In der Simulation mit der neutralen Form des Lysins ist diese Wasserstoffbrücke überhaupt nicht zu beobachten während sie sich in der Simulation mit protoniertem Lys73 regelmäßig bildet. Der Positionswechsel des Wassers ist auch schon nach der Analyse der Schwankungen der RMSD-Werte deutlich geworden.

Sowohl das aktive Zentrum mit neutralem als auch das mit protoniertem Lys73 können das für die Deacylierung unabdingbare Wassermolekül (Wat307) fixieren. Auffallend ist dabei, dass die Fixierung im Falle der Simulation mit protoniertem Lys73 in einer katalytisch günstigeren und mit der Kristallstruktur besser übereinstimmenden Position gelingt. Hier konnten zudem die drei Hauptwechselwirkungen, die in allen Klasse A Kristallstrukturen [64][127]-[132] beschrieben worden sind, nämlich die Wasserstoffbrücken zu Ser70, Glu166 und Asn170 über die gesamte Simulationsdauer nahezu durchgängig aufgezeichnet werden.

4.3 Elektrostatisches Umfeld von Lys73

Wenn Lys73 als *General Base* wirken soll, kommt seinem elektrostatischen Umfeld eine wichtige Funktion zu. Wie in Kapitel 1.6.1.1 dargestellt, wird das elektrostatische Umfeld von Lys73 für eine signifikante Erniedrigung des pK_S -Wertes der Aminogruppe verantwortlich gemacht. Entscheidend hierbei sollte der Einfluss von vielen positiv geladenen Aminosäuren in unmittelbarer Nähe zu Lys73 sein. Diese These wurde anhand der Abstände geladener Aminosäuren zu Lys73 überprüft.

In Abbildung 4.4 sind alle geladenen Aminosäuren in der Nähe von Lys73 abgebildet, deren Ladungen nicht eindeutig infolge der Lokalisation an der Proteinoberfläche durch Solvatisierung abgeschirmt sind. Die zugrundeliegende Struktur ist dieselbe Kristallstruktur von TEM1, die im vorhergehenden Kapitel für die MD-Simulationen genutzt wurde.

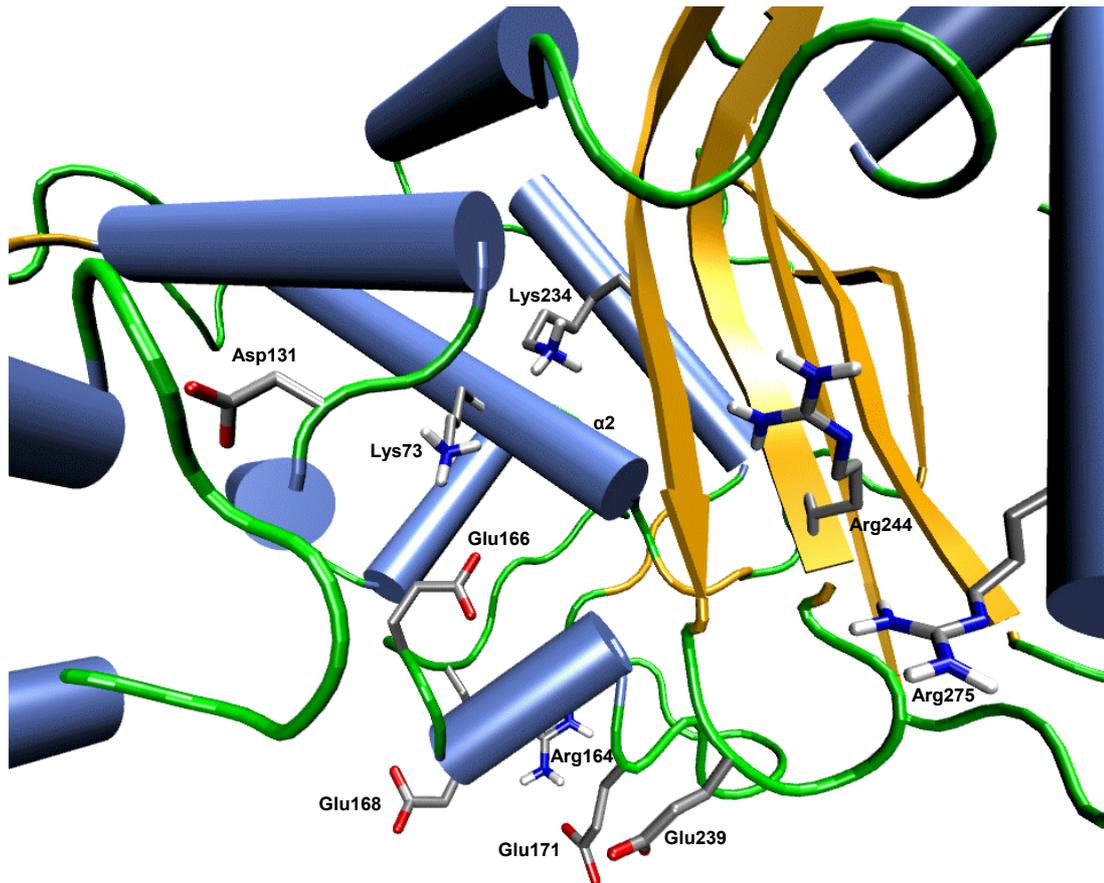


Abbildung 4.4 Geladene Aminosäuren in der Nähe von Lys73

In unmittelbarer Nachbarschaft zu Lys73 liegt mit einem Abstand von 6 Å die, in allen Klasse A β -Lactamasen strukturkonserviert enthaltene, Aminosäure Lys234. In nur 3 Å Abstand befindet sich Glu166 auf dem für Klasse A β -Lactamasen charakteristischen Ω -Loop. Auf einer Seite von Lys73 finden sich, mit einer Distanz von 12 und 16 Å bereits etwas weiter entfernt, die positiv geladenen Aminosäuren Arg244 und Arg275, denen gegenüber Asp131 mit einem Abstand von 7 Å zu Lys73 platziert ist.

Am Ausgang des aktiven Zentrums befinden sich ein Arginin (Arg164) und drei Glutamate (Glu168, Glu171, Glu239), die allesamt mit einem Abstand zwischen 13 und 15 Å noch elektrostatische Wechselwirkungen mit Lys73 haben können. Sie liegen allerdings auch schon relativ weit an der Proteinoberfläche, so dass sie Kontakt zu Lösungsmittelmolekülen haben und sich ihre Effekte dadurch abschwächen. Arg164 und Glu171 neutralisieren sich darüber hinaus, da sie eine feste Salzbrücke ausbilden.

Die Verteilung der geladenen Aminosäuren um Lys73 kann keinen Hinweis auf eine so ausgeprägte positive Polarisierung des gesamten aktiven Zentrums erbringen, die nötig wäre, um die Basizität von Lys73 um die erforderlichen vier Zehnerpotenzen abzusenken. In direkter Nachbarschaft zu Lys73 finden sich nur eine negativ und eine positiv geladene Aminosäure. Zwei von den drei nächsten nicht Lösungsmittel exponierten Aminosäuren (Lys234, Arg244) sind zwar positiv geladen, aber mit über 12 Å bereits zu weit entfernt, um entscheidend auf Lys73 einzuwirken.

Die postulierte Wirkung des Dipols der α -Helices auf Lys73 (besonders von $\alpha 2$) lässt sich auch nur schwer nachvollziehen. Lys73 ist selbst Teil dieser Helix, so dass die Seitenkette folgerichtig zentriert zur Seite heraussteht. Die Dipolwirkung auf die Lys73-Seitenkette ist daher im Vergleich zu einer endständigen Position sehr viel geringer einzuschätzen und es ist sehr unwahrscheinlich, dass durch die Dipolwirkung der langen Helix eine pK_S -Erniedrigung eintritt.

Sowohl die aus den MD-Simulationen gewonnenen Erkenntnisse als auch die Analyse der elektrostatischen Gegebenheiten des aktiven Zentrums stützen zusammen mit den in Kapitel 1.6.1 dargestellten Argumenten die Theorie eines protonierten Lys73 und Glu166 als *General Base*. Es wurde daher ein Mechanismus modelliert, der die Aminosäure Glu166 nutzt, um Ser70 zu aktivieren (detailliertere Ausführungen s. Kapitel 5.1).

4.4 Validierung der AM1-Methode für Benzylpenicillin

In der Protein-QM/MM Modellierung hat sich die semiempirische Methode AM1 für die meisten Fragestellungen als bestgeeignete Methode für die Berechnung des QM-Teils erwiesen. Sie ist daher in vielen Simulationen von Enzymreaktionen erfolgreich eingesetzt worden. Es ist gezeigt worden, dass AM1 generell sehr gute Geometrien – auch von Übergangszuständen – berechnet [133][134].

Trotzdem sollte sichergestellt werden, dass AM1 auch für Benzylpenicillin zufriedenstellende Geometrien liefert. Hierzu wurden Vergleichsrechnungen durchgeführt.

4.4.1 Ringgeometrie

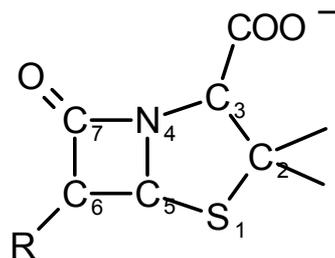
Zur Überprüfung der von AM1 bevorzugten Ringgeometrien wurden Vakuumgeometrieoptimierungen von Benzylpenicillin mit AM1 sowie *ab initio* Hartree-Fock- und B3LYP-DFT-Methoden mit großen Basissätzen durchgeführt. Die berechneten Strukturen wurden anhand der Parameter der Ringgeometrien miteinander und mit der Kristallstruktur [136] von Benzylpenicillin verglichen. Die Kristallstruktur diente auch als Ausgangsgeometrie für die Optimierungen, nachdem sie mit dem Programm SYBYL 6.5 [137] mit Wasserstoffen versehen und mit der Minimierungsmethode Steepest-Descent in 100 Schritten im Tripos Kraftfeld [138] energieminiert worden waren. Die repräsentativen Parameter für die erhaltenen Ringgeometrien sind in Abbildung 4.5 aufgelistet.

Die Bindungslängen werden von AM1 in gutem Einklang mit den *ab initio*- und DFT-Bindungslängen berechnet. Lediglich die Lactambindung wird um ca. 0.05 Å zu lang wiedergegeben. Die Schwefel-Kohlenstoffbindungslängen fallen dagegen geringfügig kürzer aus als in den Kristall- und *ab initio*- bzw. DFT-Thiazolidinringen.

Auch die durch AM1 bestimmten Bindungswinkel weichen nur unwesentlich von den Vergleichswerten ab. Einzig der Bindungswinkel [C7:N4:C3] hat zu den Werten der *ab initio* Geometrien eine noch tolerierbare Differenz von ca. 8°. Im Vergleich dazu liegt der durch AM1 berechnete Winkel mit nur 1,5° Abweichung sehr viel näher an den Werten der Kristallstruktur als die *ab initio*- und DFT-Geometrien.

Die Torsionswinkel zeigen leichte Variationen in ihren Werten. Die von AM1 erhaltenen Daten liegen bei den Winkeln, die die Torsion des Lactamringes bestimmen, genau zwischen den Kristalldaten und den Werten der *ab initio*- und DFT-Berechnungen. Bei den Torsionswinkeln, die über die Brückenkopfatome hinweg durch die Verknüpfung beider Ringe definiert werden, sind kleinere Abweichungen von den *ab initio* und DFT-Strukturen zu verzeichnen. Die Übereinstimmung mit der Kristallstruktur bleibt jedoch erhalten.

Insgesamt sind die geringfügigen Differenzen zu den Vergleichswerten im selben, tolerierbaren Rahmen wie die Ergebnisse von Vergleichsrechnungen einer sehr großen Studie zur Untersuchung der durch unterschiedliche theoretische Methoden berechneten Geometrien verschiedenster Moleküle [139] und bestätigen die Eignung von AM1 zur Berechnung der Ringgeometrien des Grundgerüsts von Benzylpenicillin, dem Penicillansäurebicyclus.



	Kristall- struktur	AM1	HF/ 6-311+G(d,p)	B3LYP/ 6-311+G(d,p)
<u>Bindungslängen [Å]</u>				
C7 N4	1,38	1,43	1,36	1,38
C7 C6	1,51	1,58	1,54	1,56
C6 C5	1,56	1,58	1,55	1,56
C5 N4	1,45	1,48	1,44	1,46
C5 S1	1,82	1,75	1,83	1,85
S1 C2	1,84	1,80	1,88	1,91
C2 C3	1,56	1,56	1,57	1,58
C3 N4	1,46	1,45	1,45	1,46
<u>Bindungswinkel [°]</u>				
C5 N4 C7	94,08	93,44	94,95	95,09
N4 C7 C6	92,45	91,67	91,11	91,20
C7 C6 C5	84,71	84,26	83,90	83,97
C6 C5 N4	89,69	89,69	87,96	88,28
C6 C5 S1	119,42	116,81	118,65	117,25
C7 N4 C3	125,16	123,76	131,47	132,72
C5 S1 C2	95,27	95,68	93,87	93,20
N4 C5 S1	105,16	109,45	105,13	104,99
<u>Torsionswinkel [°]</u>				
N4 C5 C6 C7	5,31	6,91	10,10	8,45
C6 C5 N4 C7	-5,80	-7,60	-11,42	-9,58
C7 N4 C3 C2	-86,89	-90,83	-84,46	-84,58
S1 C5 N4 C3	-20,20	-18,54	-34,30	-35,62

Abbildung 4.5 Geometrie-Parameter des Benzylpenicillinbicyclus

4.4.2 sp^2 - Stickstoffgeometrie

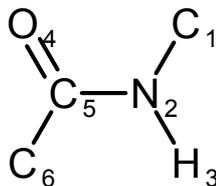
Die Seitenkette von Benzylpenicillin enthält wie nahezu alle β -Lactam-Antibiotika eine Seitenkette mit einer, einen sp^2 -hybridisierten Stickstoff enthaltenden, Peptidbindung. Es ist bekannt, dass AM1 keine guten planaren Geometrien für sp^2 -hybridisierte Stickstoffe liefert, so dass Modifikationen nötig sind und die Geometrie der peptidischen Seitenkette gesondert untersucht wurde.

Zur Gewährleistung eines planaren Stickstoffs in der Seitenkette wurden *Restraints* eingeführt. Die *Restraints* wurden durch Eichrechnungen sowohl in Auswahl der *restrained* Atome als auch durch Variation der angewendeten Kraftkonstanten so angepasst, dass mit AM1 im Vakuum sp^2 -Stickstoffgeometrien, vergleichbar der einer *High-Level* DFT-Geometrie (B3LYP/6-311+G(d,p)), berechnet werden konnten (s. Abbildung 4.6).

Um dies zu erreichen, wurde ein Dieder- und ein Improper-Dieder¹-*Restraint* eingeführt (s. Anhang F) und durch alle in dieser Arbeit präsentierten AM1 Berechnungen hindurch beibehalten. Eine Variation dieser *Restraints* war nicht angezeigt, da die Peptidbindung der Seitenkette nicht die Möglichkeit zur Flexibilität während der Katalyse besitzen muss.

Die Seitenkette ist essenziell für die Bildung des Michaelis-Menten Komplexes und die Koordination des Substrats im aktiven Zentrum. Die Atome der Seitenkette haben jedoch keinen direkten Einfluss auf die katalytische Funktion des Enzyms und behalten ihr Wasserstoffbrückenbindungsmuster vom Michaelis-Menten Komplex bis zum Acylenzym unverändert bei. Die *Restraints* müssen darüber hinaus unverändert bleiben, um berechnete Geometrien und deren Energien vergleichbar zu halten.

¹ Improper-Diederwinkel ist die CHARMM-Bezeichnung des „out-of-plane“-Winkels.



Torsionswinkel [°]				B3LYP/ 6-311+G(d,p)	AM1/ Restrains
C1	N2	C5	O4	0 (1,6)	-1,1 (0,5)
C1	N2	C5	C6	0 (-178,8)	-0,4 (-179,2)
C6	C5	N2	H3	0 (-1,6)	0,0 (-1,6)
H3	N2	C5	O4	0 (178,7)	0,9 (179,7)

Abbildung 4.6 Torsionswinkel in [°] als Planaritäts-Parameter für den peptidischen Stickstoff in der Benzylpenicillin-Seitenkette (Werte von AM1 relativ zu denen der DFT-Struktur angegeben; in Klammern Absolutwerte)

4.4.3 Korrekturrechnungen der AM1-Energien

Das in Kapitel 3.5 beschriebene Verfahren zur Neuberechnung der Energien, der durch AM1 erhaltenen Geometrien, wurde für die Penicillinstruktur anhand der Bestimmung von Enthalpien überprüft. Dabei wurden aus einer Reaktionssimulation mit einem QM/MM-System Strukturen extrahiert und zunächst einzeln im Vakuum geometrieoptimiert. Anschließend wurden durch Einzelpunktrechnungen die zugehörigen Energien bestimmt. Aus Rechenzeitgründen wurden nur Acetat, Methanol und das Anion der Penicillansäure betrachtet. Zum Vergleich wurden die den Enthalpien zugrundeliegenden Energieberechnungen sowohl mit AM1-optimierten Strukturen als auch mit *High-Level* DFT-optimierten Geometrien durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.7 aufgeführt.

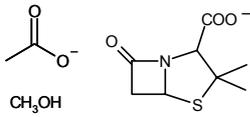
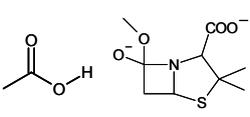
Energie	Geometrie	$\sum E_{\text{Edukte}}$	$\sum E_{\text{Produkte}}$	ΔH
				
B3LYP/ 6311+G(d,p)	// B3LYP/ 6311+G(d,p)	-837169,36	-837087,68	81,68
B3LYP/ 6311+G(d,p)	// B3LYP/ 6-31+G(d)	-837169,36	-837087,67	81,69
B3LYP/ 6-31+G(d)	// B3LYP/ 6-31+G(d)	-836996,11	-836915,47	80,64
B3LYP/ 6311+G(d,p)	// AM1	-837153,33	-837068,45	84,88
B3LYP/ 6-31+G(d)	// AM1	-836983,27	-836901,09	82,18

Abbildung 4.7 Enthalpiewerte, berechnet mit unterschiedlichen Ansätzen (Energien in [kcal mol⁻¹])

Die mit B3LYP berechneten Enthalpiewerte weichen, unabhängig von dem Ursprung der zugrundeliegenden Geometrie, nur geringfügig voneinander ab und zeigen so, dass der Level der quantenmechanischen Optimierungsmethode nur einen kleinen Einfluss auf die Geometrie hat. Die Berechnungen der Enthalpien mit den AM1 optimierten Strukturen zeigen mit dem kleineren Basissatz die geringeren Abweichungen zu den jeweils reinen DFT-Werten.

Als theoretischer *Level* des Korrekturverfahrens von AM1 wurde daher B3LYP/6-31+G(d) gewählt, dass sich in vielen unabhängigen Untersuchungen als die allgemeine DFT-Methode der Wahl gezeigt hat und ein sehr günstiges Verhältnis von der Rechenzeit zu der Genauigkeit der Ergebnisse besitzt [119][140].

4.5 Aufbau des QM/MM-Systems

Für die Modellierung der enzymatischen Reaktionen wurde ein QM/MM-System basierend auf den Daten einer Kristallstruktur entwickelt. Da die Qualität des Systems entscheidenden Einfluss auf die Ergebnisse der späteren Reaktionswegberechnungen hat und die Entwicklung einen nicht unerheblichen

Anteil an den Rechenzeitkosten verursacht, wird das Verfahren hier kurz dargestellt.

4.5.1 Kristallstruktur

Aus den in Kapitel 4.1.1 genannten Gründen, wurde eine von *Strynadka et al.* mit 1.7 Å ausreichend hoch aufgelöste Struktur als Grundlage für das Enzymmodell ausgewählt (PDB: 1FQG, [67]). Die Kristallstruktur wurde von einer E166N-Mutante gewonnen. Diese Mutation hat zur Folge, dass die Lactamase keine Deacylierung mehr katalysieren kann (s. Kapitel 1.6.2). Da das Enzym vor der Kristallisation mit Benzylpenicillin umgesetzt wurde, ist es folglich an Ser70 mit dem gespaltenen β -Lactam verestert. Die Struktur stellt somit – abgesehen von der Mutation – das Acylenzym, das Zwischenprodukt der gesamten β -Lactamase katalysierten Reaktion, und das Endprodukt des Acylierungsschrittes dar.

Untersuchungen der Autoren sowie eigene Vergleiche mit Wild-Typ Strukturen ergaben, dass die Mutation keinen Einfluss auf das Wasserstoffbrückenbindungsmuster des aktiven Zentrums hat und auch zu keiner Veränderung peripherer Enzymabschnitte führt.

Das Standard- β -Lactam-Antibiotikum Benzylpenicillin ist bereits in einer physiologisch korrekten Konformation im aktiven Zentrum enthalten, so dass eine häufige Fehlerquelle, nämlich das nicht einwandfreie *Docken*¹ einer Substanz in das aktive Zentrum, allein durch die Wahl der Startstruktur vermieden wurde. Die ausgewählte Kristallstruktur eignet sich aus diesen Gründen ausgezeichnet als Startgeometrie für die theoretische Untersuchung der Acylierung, da es vom rechentechnischen Verfahren her unerheblich ist, in welche Richtung eine Reaktion berechnet wird.

4.5.2 Rückmutation der E166N-Mutante

Um das funktionsfähige aktive Zentrum des Wild-Typs zu generieren, musste das durch Mutation in Position 166 eingeführte Asparagin zurück in ein Glutamat umgewandelt werden. Aufgrund der Ähnlichkeit des vorliegenden mutierten aktiven Zentrums mit dem des Wild-Typs, wurde die Geometrie von Glu166 in einer natürlichen TEM1- β -Lactamase als Vorlage genutzt.

¹ Das „*Docken*“ ist der Vorgang des Positionierens eines Substrats im aktiven Zentrum eines Enzyms oder eines Ligands an einer Rezeptorbindungsstelle.

Hierzu wurden „*Internal Coordinates*“ (ICs) von Glu166 einer Wild-Typ-Kristallstruktur (PDB: 1BTL, [141]) generiert. Interne Koordinaten beschreiben die Lage von Atomen einer Geometrie relativ zueinander und werden in Abständen und Winkeln definiert, nicht zu verwechseln mit kartesischen Koordinaten, die die absolute Position angeben und durch X, Y und Z-Werte festgelegt werden.

Die Atome der Seitenkette von Asn166 in der Mutante wurden gelöscht und durch neue Atome, von einer durch die ICs erzeugten Glutamat-Seitenkette, ersetzt. Als Bezugsatome dienten dabei die aus der mutierten Kristallstruktur beibehaltenen *Backbone*-Atome von Asn166. Auf diese Weise wurde effektiv die Seitenkette des Wild-Typ Glutamats 166 in das aktive Zentrum der vormals E166N-Mutante transferiert.

4.5.3 Wasserstoffatome

Die in der Kristallstruktur nicht vorhandenen Wasserstoffatome des Proteins wurden aufgrund der Standard ICs für Aminosäuren des CHARMM22–Kraftfelds [89] erschaffen. Die Wasserstoffatome der Kristallwassermoleküle wurden mit der in CHARMM implementierten HBUILD-Routine hinzugefügt [142].

Aufgrund der Biosynthese von Benzylpenicillin aus den Aminosäuren R-Valin und S-Cystein wurden auch für die Wasserstoffe des Benzylpenicillins die ICs von Aminosäuren angewendet. Bei den Wasserstoffatomen, bei denen das nicht eindeutig möglich war, wurde der wahrscheinlichste Wert gewählt. Hierbei ist anzumerken, dass die Platzierung bzw. Parametrisierung der Wasserstoffe des Substrats nur von untergeordneter Bedeutung ist, da das gesamte Molekül, wie im folgenden Kapitel beschrieben wird, dem QM-Teil zugehörig und somit von Kraftfeldparametern unabhängig ist.

4.5.4 Optimierung des katalytischen Wassers(Wat290) und der Wasserstoffatome

Eine beachtenswerte Folge der Mutation von Glu166 zu Asn166 ist eine leicht veränderte Position des konservierten Wassermoleküls (1FQG: Wat290¹) im

¹ Die Nummerierung der Kristallwassermoleküle wurden von der Kristallstruktur übernommen. Bei der hier verwendeten Kristallstruktur (1FQG) trägt das katalytische Wasser die Nummer 290, während es in der für die MD-Simulationen (s. Kapitel 4.2) verwendeten Kristallstruktur (1BTL) mit 307 nummeriert ist.

Vergleich zum Wild-Typ. Diese Veränderung ist auf die Abhängigkeit der Position des Wassermoleküls von seinen Wasserstoffbrückenbindungspartnern, u.a. also auch auf die Aminosäure in Position 166, zurückzuführen. Das Wassermolekül ist zwar durch die typischen Wasserstoffbrücken zu Ser70, Asn166 und Asn170 noch immer fixiert, allerdings, aufgrund der um eine Methylengruppe kürzeren Kette von Asn166 im Vergleich zu Glu166, an einer leicht veränderten Position.

Nach erfolgter Rückmutation wurde die Wasserposition wieder angeglichen. Daher wurde eine SD-Energieminimierung von 278 Schritten durchgeführt, bei der alle Atome außer Wat290 fixiert wurden. Durch diese Minimierung wurde erreicht, dass das Wassermolekül wieder eine vergleichbare Position wie in den Wild-Typ Strukturen eingenommen hatte.

In einer anschließenden Minimierung wurden alle Wasserstoffatome optimiert, während alle *Heavy-Atoms* und der gesamte QM-Teil festgehalten wurden. Hier waren 964 Schritte der SD-Methode nötig, um das Abbruchkriterium von 0,01 kcal mol⁻¹ zu erreichen.

4.5.5 QM-Region

In die QM-Region wurden außer dem Substrat, Benzylpenicillin, auch vier Aminosäure-Seitenketten des aktiven Zentrums integriert. Es wurden die Aminosäuren ausgewählt, die aufgrund von Mutationsstudien sowie ihrer strukturellen Konservierung eine aktive Funktion während der Enzymkatalyse vermuten lassen und mit denen daher ein Mechanismus modelliert werden sollte. Darüber hinaus wurde das in allen Klasse A β -Lactamasen enthaltene konservierte Wassermolekül (Wat290) aufgenommen.

Die Aminosäuren Ser70, Lys73, Ser130 und Glu166 wurden auf die in Kapitel 3.4.2.3 beschriebene Weise in die QM-Region überführt. Als Übergangsbinding zwischen QM- und MM-Region wurde jeweils die Bindung zwischen dem die funktionelle Gruppe tragenden Kohlenstoffatom und dem jeweils benachbarten Kohlenstoffatom festgelegt. Vier der in Kapitel 3.4.2.3 beschriebenen *Link-Atome* wurden entlang dieser Bindungen eingegliedert.

Die isoliert betrachtete QM-Region des Acylenzym setzt sich so aus dem Benzylpenicillin, zwei Methanolmolekülen, einem Methylammonium-Kation sowie einem Acetat-Anion zusammen. Insgesamt besteht die quantenmechanisch beschriebene Region aus 70 Atomen (s. Abbildung 4.8).

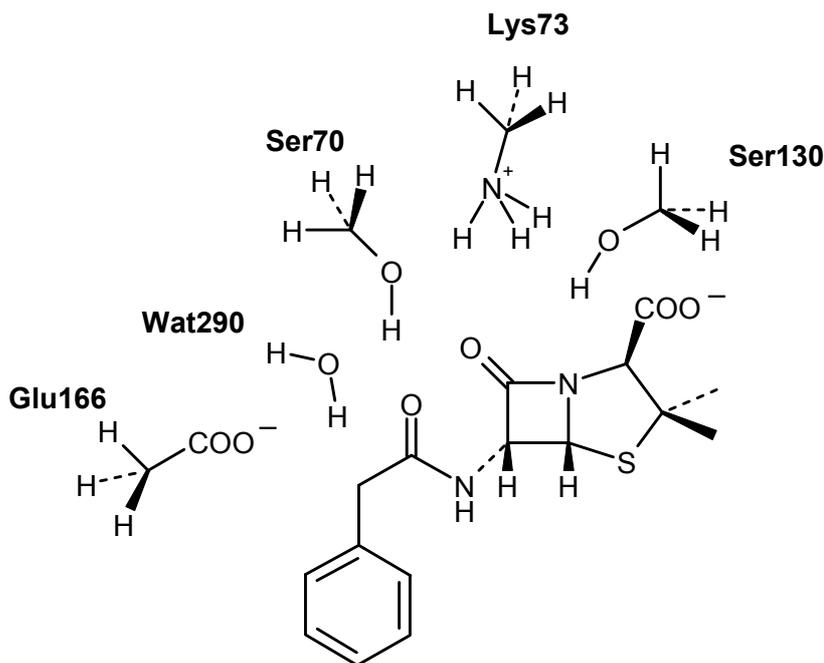


Abbildung 4.8 QM-Region, bestehend aus dem Substrat Benzylpenicillin sowie den funktionellen Gruppen der Aminosäuren Ser70, Lys73, Ser130, Glu166 und dem Wassermolekül Wat290

4.5.6 Solvatisierung und Formung des Systems

Zur Hydratisierung des Systems wurde eine präequilibrierte, sphärische Wasserbox von 26 Å Radius auf das Enzym superpositioniert, wobei der Sauerstoff von Ser70 als Reaktionszentrum und Mittelpunkt gesetzt wurde.

Anschließend wurde das System zu einer Sphäre geschnitten, indem alle Wassermoleküle und Aminosäuren, die nicht wenigstens ein Atom innerhalb eines Radius von 18 Å um das Zentrum besaßen, gelöscht wurden. Die Reduktion der Atomanzahl durch diesen Schritt ist notwendig, da eine Untersuchung eines Reaktionsweges durch QM/MM-Berechnungen mit allen Atomen eines Enzyms zu rechenintensiv ist, um in einer angemessenen Zeit durchgeführt werden zu können.

Das Entfernen der äußeren Proteinschichten ist für die Modellierung der Reaktion insofern unerheblich, weil auch bei Vorhandensein dieser entlegenen Atome durch den *Cutoff* keinerlei Interaktionsenergien mit den Atomen des aktiven Zentrums oder des Substrates direkt berechnet werden würden.

Eine physiologische Aufgabe der äußeren Aminosäuren besteht darin, die Wasserlöslichkeit des Enzyms zu gewährleisten. Dies zeigt sich auch durch die

Häufung von lösungsvermittelnden, geladenen Aminosäuren in den Grenzregionen. So wurden in diesem Schritt 99 der insgesamt 263 Aminosäuren entfernt, wobei mit 32 mehr als die Hälfte der insgesamt 61 geladenen Aminosäuren darunter enthalten waren¹.

Die andere wichtige Funktion von peripheren Aminosäuren ergibt sich aus deren Beitrag zur Bildung der Tertiärstruktur des Proteins. Diese soll das Enzym an den entscheidenden Stellen rigidisieren, um u.a. den Eingang zum aktiven Zentrum und die Kavität selber ausreichend zu stabilisieren. Durch die Reduktion des Systems kann das Protein diese stabilisierende Funktion nicht mehr leisten, so dass besondere Maßnahmen erforderlich werden.

Zur Stabilisierung des Proteins und des aktiven Zentrums wurde ein eigens zu diesem Zweck von *Brooks et al.* [95] entwickeltes *Restraint*-System für die äußeren 4 Å des reduzierten Systems eingesetzt. Zur Anwendung dieser *Restraints* wurde eine Randpufferzone definiert, die alle Proteinatome, die weiter als 14 Å vom Reaktionszentrum entfernt liegen, einschließt. Diese Pufferzone wurde in vier weitere Unterpufferzonen unterteilt, wobei die verschiedenen angewandten Kraftkonstanten für *Backbone*-Atome, β - und γ - Seitenkettenatome sowie für die übrigen *Heavy-Atoms* von innen nach außen ansteigen (s. Anhang F).

Das Verkleinern des Enzyms um die mechanistisch unwichtigen Aminosäuren wurde in vielen Reaktionsmodellierungen erfolgreich angewandt und kann inzwischen als ein Standardschritt in der Modellierung von Enzymreaktionen angesehen werden [95][112][143]-[146].

Es ist allerdings zu beachten, dass das Entfernen der äußeren Aminosäuren eines Enzyms nur bei sehr gut aufgelösten Kristallstrukturen anwendbar ist, die in dem verwendeten Kraftfeld stabil erscheinen, andernfalls würde das System, nicht zwangsläufig bei Minimierungen, auf jeden Fall jedoch bei MD-Simulationen trotz *Restraints* auseinanderfallen. Die Stabilität des verkleinerten Enzyms wurde in reinen molekularmechanischen MD-Simulationen überprüft, außerdem zeigten Vergleichsrechnungen einfacher Reaktionsschritte keine strukturellen oder energetisch signifikanten Unterschiede zum vollständigen Enzym.

¹ Entfernt wurden 7 Glu, 6 Asp, 7 Arg, 6 His und 6 Lys.

Im nächsten Schritt wurden alle überlappenden Wassermoleküle entfernt. Als überlappend wurde ein Wassermolekül eingestuft, wenn der Sauerstoff des Wassermoleküls mit einem anderen *Heavy-Atom* der Kristallstruktur näher als 2,6 Å zu liegen kam. Des Weiteren wurden die Wassermoleküle gelöscht, deren Sauerstoff einen größeren Abstand als 6,5 Å zu einem anderen *Heavy-Atom* besaß, die also aufgrund ihrer Entfernung keinen hydratisierenden Effekt mehr ausüben konnten.

Danach wurden in 4000 Schritten SD-Minimierung die übriggebliebenen 192 addierten Wassermoleküle optimiert, während alle anderen Atome festgehalten wurden. Darauf schlossen sich noch einmal eine 882-Schritte SD- und 191-Schritte ABNR-Energieminimierung aller Wasserstoffe bei Fixierung aller *Heavy-Atoms* an.

Durch diese äußerst genaue Minimierungsprozedur der Wassermoleküle und Wasserstoffe wurde verhindert, dass in der folgenden Equilibrierung durch ungenau positionierte Wassermoleküle artifizielle Bewegungen erzeugt werden. Die Equilibrierung der addierten Wassermoleküle und des Kristallwassers wurde mit einer 11 ps langen MD-Simulation mit anschließender Minimierung durchgeführt. Danach wurden erneut alle Wassermoleküle, die nicht mehr oben angeführten Kriterien genügten, gelöscht. Dies waren vor allem Wassermoleküle, die trotz Anwendung von „*stochastic-boundary-conditions*“ über die 18 Å Grenze hinaus evaporiert sind, was als ein Indiz für deren ursprünglich ungünstige Position angesehen werden kann.

Um eine vollständige Hydratisierung sicherzustellen, wurde dieselbe Prozedur (Wasseraddition, Minimierungen, MD-Simulation) anschließend wiederholt.

Das für die QM/MM-Berechnungen eingesetzte System bestand so aus 70 QM-Atomen und 3216 MM-Atomen, in denen 226 Wassermoleküle (TIP3P-Wassermodell [147]) enthalten waren.

4.5.7 Relaxation und Vollminimierung

Die empirische Parametrisierung von Kraftfeldern und die Packungsdichte von Kristallen lässt auch Kristallstrukturen in *Molecular-Modelling*-Programmen zunächst als verzerrte Geometrien mit hohem Energieinhalt erscheinen. In einem Relaxationsschritt wurde daher eine Minimierung durchgeführt, um besonders ungünstige Bereiche zu eliminieren und die übrigen Bindungsparameter dem Kraftfeld anzupassen. Hier wurden nicht die oben

erläuterten Pufferrestraints, sondern stattdessen *Restraints* auf alle *Backbone*- und Seitenketten-*Heavy-Atoms* mit hohen Kraftkonstanten angewendet.

Für die Seitenketten wurde eine Kraftkonstante von 25 kcal mol^{-1} und für die *Backbone*-Atome eine Kraftkonstante von 50 kcal mol^{-1} eingesetzt. Nach einer SD-Minimierung von 500 Schritten zeigte das *Backbone* einen RMSD-Wert im Vergleich zur Kristallstruktur von $0,04 \text{ \AA}$, die Seitenketten von $0,15 \text{ \AA}$ und die *unrestrained QM-Heavy-Atoms* von $0,4 \text{ \AA}$. Die äußerst geringe Abweichung des *Backbones* und der Seitenketten von der Kristallstruktur deuten an, dass das Ziel dieser Minimierung, eine Relaxierung besonders unvorteilhafter Geometrien, ohne große Strukturänderungen erfolgreich durchgeführt werden konnte, wobei sich der absolute Energieinhalt von -1902 auf $-3816 \text{ kcal mol}^{-1}$ verminderte.

Der erhaltenen Struktur kommt den in dieser Arbeit präsentierten Berechnungen eine sehr wichtige Rolle zu. Sie stellt die Referenzstruktur dar, auf die die Pufferregion-*Restraints*, die in jeder QM/MM-Rechnung angewendet werden, bezogen werden. Das Setzen der Pufferregion-*Restraints*, basierend auf dieser Struktur, verspricht ein möglichst durch alle Rechnungen hindurch straffes Halten des Systems an den Koordinaten der relaxierten Röntgenkristallstruktur.

Nach der Relaxation wurde die Struktur in 1000 Schritten SD- und anschließenden 1839 Schritten ABNR-Minimierung bis zu dem Abbruchkriterium von $0,01 \text{ kcal mol}^{-1}$ optimiert. Diese „vollminimierte“ Struktur repräsentiert die Startstruktur für die anschließenden Reaktionswegberechnungen.

Sämtliche Berechnungen von Energiebilanzen müssen, um vergleichbar zu sein, auch mit einer Standardmethode evaluiert werden. Die angewandte Methode wurde dementsprechend auch zur Berechnung der Startstruktur benutzt. Das Abbruchkriterium ist dabei von besonderer Bedeutung und muss in allen Energieberechnungen des Reaktionswegs eingehalten werden. Es wird dadurch erreicht, dass die Energien von Geometrien berechnet werden, die mit derselben Präzision energieminiert wurden und nur deswegen vergleichbar sind.

In allen Reaktionswegberechnungen wurden die gleichen Minimierungsbedingungen angewendet und sollen aufgrund ihrer Bedeutung hier im Überblick einmal zusammengefasst werden, um Wiederholungen in einzelnen Kapiteln zu vermeiden:

„Standard-Minimierungsmethode“

Algorithmus	Adopted Basis Newton-Raphson (ABNR)	(s. Kapitel 3.2)
Abbruchkriterium	0,01 kcal mol ⁻¹	(s. Kapitel 4.5.7)
Protein-<i>Restraints</i>	Pufferregion- <i>Restraints</i>	(s. Kapitel 4.5.6) (s. Anhang F)
QM-<i>Restraints</i>	Peptidischer Stickstoff Evtl. Reaktionskoordinate	(s. Kapitel 4.4.2) (s. Kapitel 3.6)

Abbildung 4.9 zeigt zur Veranschaulichung die Behandlung der Kristallstruktur bis hin zur Startstruktur in einem Fließdiagramm auf.

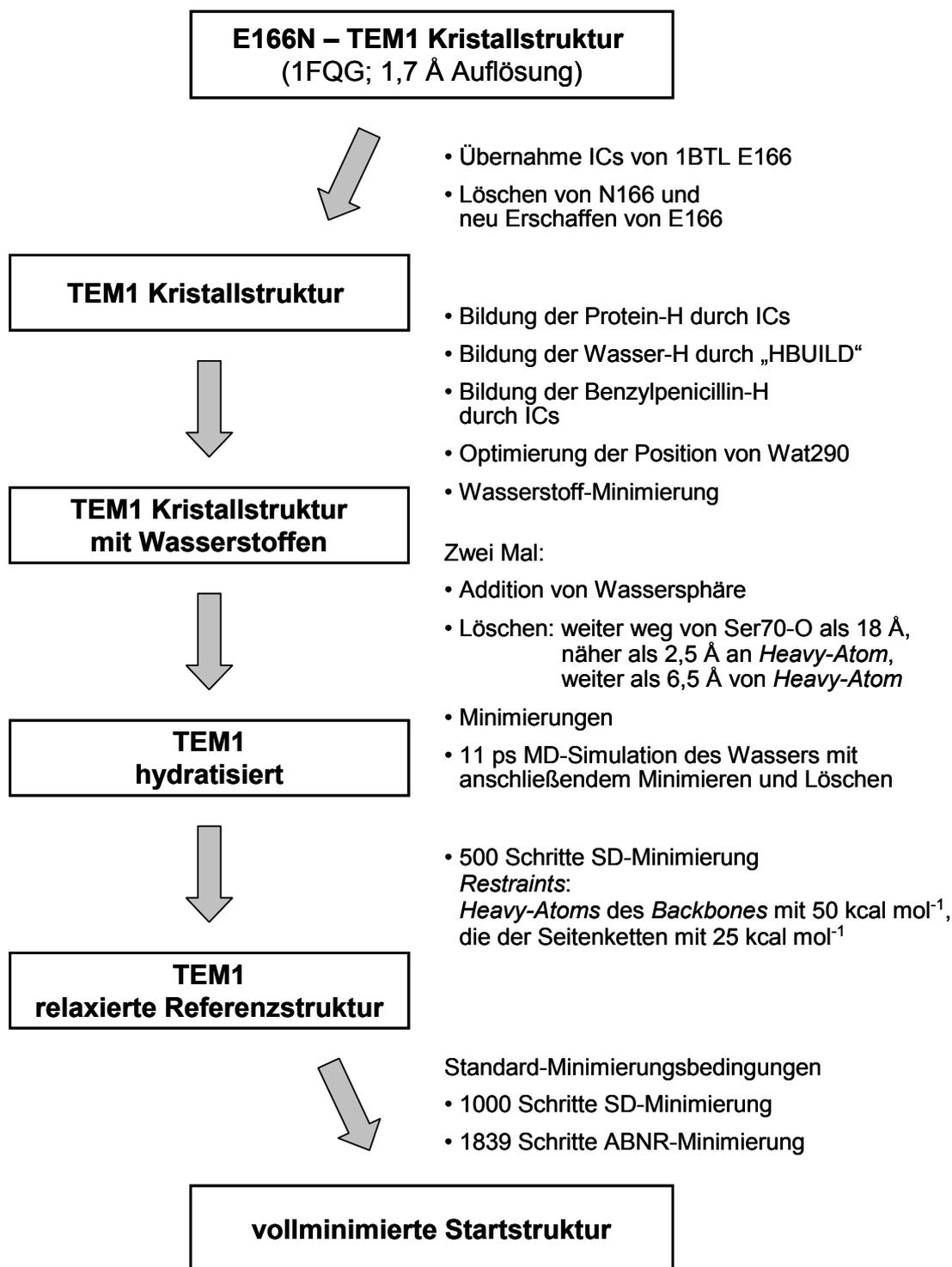


Abbildung 4.9 Arbeitsschritte zur Generierung einer Startstruktur für QM/MM-Berechnungen basierend auf der Kristallstruktur 1FQG

4.6 Michaelis-Menten Komplex

Der Michaelis-Menten Komplex besteht aus dem Enzym und dem im aktiven Zentrum durch ausschließlich nichtkovalente Wechselwirkungen gebundenem Substrat. Die Lage des Substrats oder eines Inhibitors im aktiven Zentrum und die sich daraus ergebenden möglichen Wechselwirkungen bestimmen in der Regel auch den Mechanismus der ersten Reaktionsschritte. Eine genaue Untersuchung des Komplexes ist daher für die Mechanismusaufklärung zwingend erforderlich. Dabei kann schon die hierbei angewandte Methode einen großen Einfluss auf das Ergebnis haben.

Bei der Betrachtung eines Komplexes, der durch Geometrieoptimierungen einer Kraftfeldmethode generiert wurde, lassen sich bei guter Parametrisierung häufig Rückschlüsse auf einen möglichen Reaktionsmechanismus anhand des vorliegenden Wasserstoffbrückenbindungsmusters ziehen. Bei Anwendung eines semiempirischen QM/MM-Systems ist dies schwieriger, da semiempirische Methoden Wasserstoffbrücken generell nicht zuverlässig voraussagen bzw. diese aus semiempirisch bedingten, energetischen Gründen nicht immer finden [148]-[150].

Obwohl die angewendete Methode AM1 noch immer die beste der semiempirischen Methoden für die Untersuchung von Wasserstoffbrücken ist, muss trotzdem davon ausgegangen werden, dass durch die in Kapitel 4.5.5 beschriebene Einbindung der katalytisch aktiven Seitenketten in die QM-Region, das Auffinden von Wasserstoffbrücken zwischen dem quantenmechanisch beschriebenen Substrat und diesen vier Seitenketten nur eingeschränkt möglich ist.

Für die Modellierung des Mechanismus hat das insofern keine Konsequenzen, da die essenziellen Wasserstoffbrücken von zu transferierenden Protonen durch die jeweils angewendeten Reaktionskoordinaten (s. Kapitel 3.6) sichergestellt werden. Wasserstoffbrücken zwischen QM- und MM-Region werden wesentlich besser mit AM1 gefunden, wenn auch nicht so zuverlässig wie mit reinen molekularmechanischen Methoden. Es lassen sich trotz dieser Schwierigkeiten einige Wasserstoffbrücken innerhalb der QM-Region und vor allem auch zwischen Atomen der QM- und der MM-Region identifizieren, die gerade deswegen für das System als besonders wertvoll eingestuft werden müssen.

4.6.1 Wechselwirkungen: Benzylpenicillin – aktives Zentrum

Das aktive Zentrum befindet sich am Ende der Spalte zwischen der *all*- α - und der α/β -Domäne. Das Benzylpenicillin bindet bei der Bildung des Michaelis-Menten Komplexes mit der Carboxylatgruppe voraus in das aktive Zentrum der β -Lactamase. Die Seitenkette mit dem Benzylrest ist dagegen in Richtung des Ausgangs vom aktiven Zentrum angeordnet (s. Abbildung 4.10).

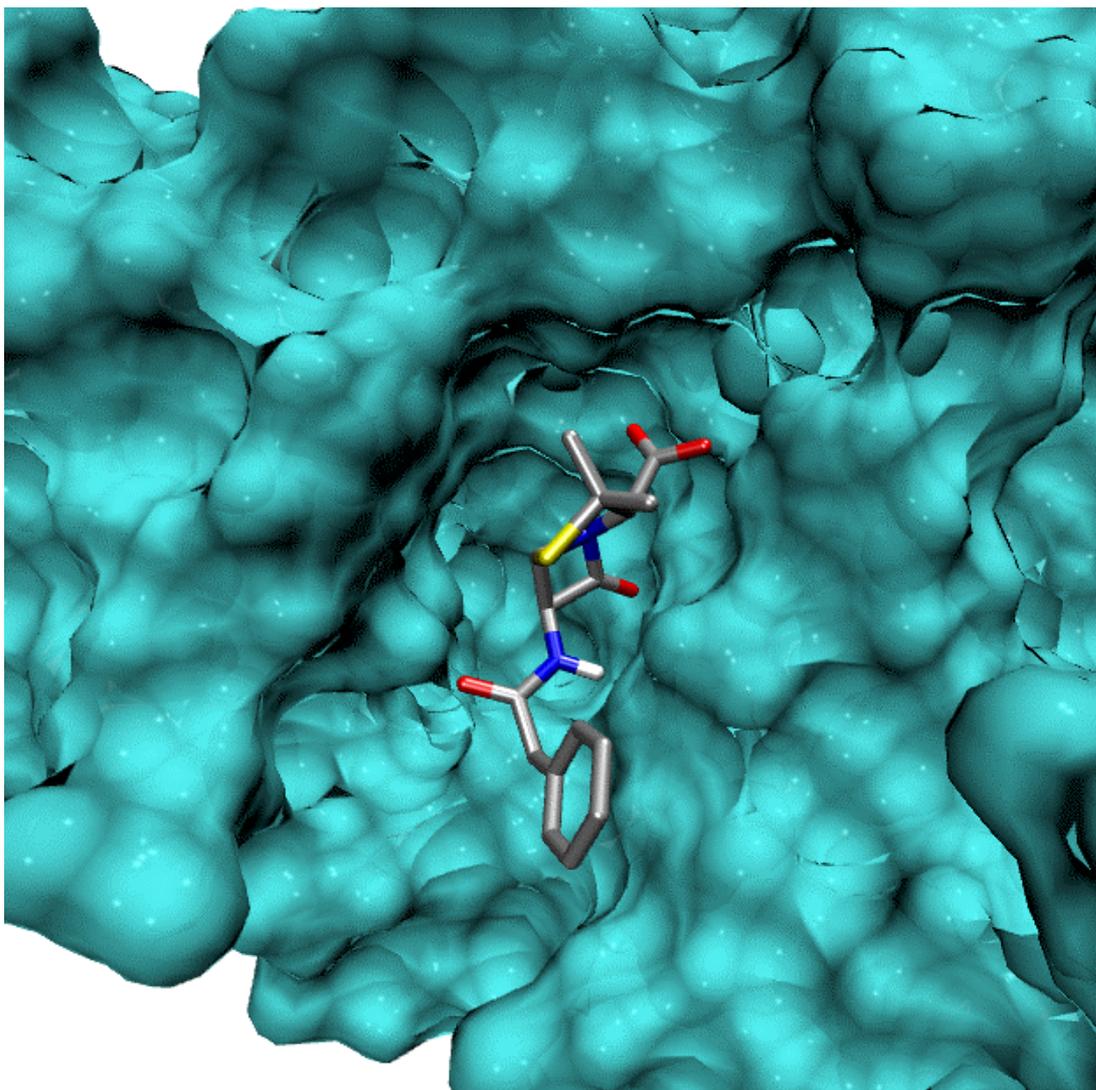


Abbildung 4.10 Oberflächendarstellung des Michaelis-Menten Komplexes von Benzylpenicillin im aktiven Zentrum von TEM1

Die wichtigste Gruppe für die Koordination des Penicillins ist die Carboxylatgruppe am Thiazolidinring. Sie wird in einer, von drei konservierten Aminosäuren gebildeten, elektrostatisch positivierten Tasche gebunden

(s. Abbildung 4.11). Die obere und untere Seite wird dabei von den positiv geladenen Aminosäuren Lys234 und Arg244 begrenzt. In die Mitte der Tasche zeigt die Hydroxylgruppe von Ser235, die eine feste Wasserstoffbrücke mit einem der Carboxylatsauerstoffe des Penicillins bildet. Wegen des ionischen Anteils dieser Interaktionen kommt der Carboxylatgruppe so eine Ankerfunktion für das Benzylpenicillin im aktiven Zentrum zu.

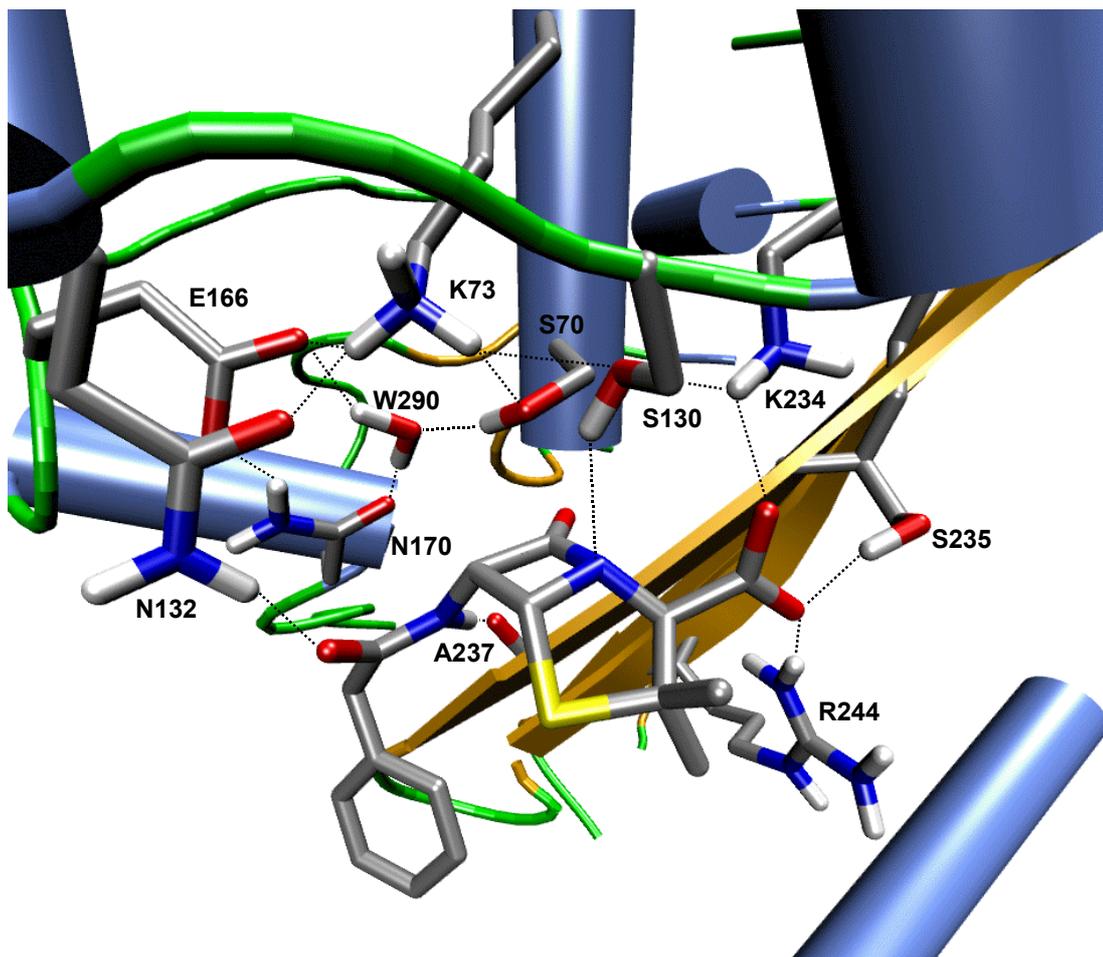


Abbildung 4.11 Michaelis-Menten Komplex von TEM1 mit Benzylpenicillin

Das andere Ende des Penicillins wird über die „Peptidbindung“ der Seitenkette fixiert. Der Carbonylsauerstoff der Peptidbindung fungiert dabei als Akzeptor eines Wasserstoffatoms von der Amidfunktion des ebenfalls konservierten Asn132. Der peptidische Stickstoff doniert seinerseits einen Wasserstoff und bildet so eine Brücke mit der Carbonylgruppe des *Backbones* von Ala237 aus dem β 3-Faltblatt.

Eine weitere Ausrichtung des Substrats erfolgt durch die Bildung von zwei Wasserstoffbrücken zwischen dem Carbonylsauerstoff des β -Lactamrings und den Wasserstoffen der Peptidbindungen des *Backbones* von Ser70 und Ala237. Diese elektrophile Tasche erhält in der Katalyse eine ganz entscheidende Bedeutung (nicht abgebildet; s. Kapitel 4.8.1).

Ser130 formt eine Wasserstoffbrücke mit dem Stickstoff des β -Lactamrings. Allerdings ist sie geometrisch nicht einwandfrei auszumachen, da alle beteiligten Atome der durch AM1 beschriebenen QM-Region angehören. Der geringe Abstand von 3,3 Å zwischen Stickstoff und Sauerstoff lässt diese Wasserstoffbrückenbindung jedoch als sehr wahrscheinlich erscheinen.

Es existieren weiterhin auch Dispersionswechselwirkungen zwischen dem Substrat und dem Enzym, die allerdings für die Bindung aufgrund des geringen Betrages im Vergleich zu den elektrostatischen Wechselwirkungen nur eine untergeordnete Rolle spielen. Vor allem die Methylgruppen des Thiazolidinrings interagieren dabei mit den Seitenkette von Val216, Ala237 und Met270, das außerdem Kontakt mit dem Phenylring des Benzylpenicillins hat.

4.6.2 Wechselwirkungen: Aktives Zentrum

Außer den oben angeführten Substrat-Enzym Wechselwirkungen existieren weitere für Katalyse und Stabilität wichtige Wechselwirkungen der Aminosäuren des aktiven Zentrums untereinander. Eine Funktion dieser Wechselwirkungen ist die Fixierung des Wassermoleküls 290. Das katalytische Wassermolekül wird durch ein Netzwerk von Wasserstoffbrücken positioniert, das drei Aminosäuren einschließt. Die Aminosäuren Ser70, Glu166 und Asn170 sind triangelförmig um das Wassermolekül platziert und bilden derart Wasserstoffbrücken aus, dass Glu166 und Asn170 als Akzeptoren dienen, wohingegen Ser70 als Donator beteiligt ist. Das Wassermolekül nimmt aufgrund seiner bifunktionellen Eigenschaft, sowohl als Donor als auch als Akzeptor fungieren zu können, die zentrale Position in diesem Netzwerk ein. Ser70, Glu166 und das Wassermolekül sind Bestandteile der QM-Region, was zur Folge hat, dass die beschriebenen Wasserstoffbrücken im Modell nicht ideal gerichtet sind. Der geringe Abstand der beteiligten *Heavy-Atoms*, der bei allen kleiner ist als 3 Å, sowie die Ergebnisse der freien MD-Simulationen (s. Kapitel 4.2.2.2) lassen an ihrer Existenz jedoch keine Zweifel.

Lys73 hat sowohl bei der Konstruktion des aktiven Zentrums als auch beim Michaelis-Menten Komplex eine sehr wichtige ordnende Funktion. Die

Aminogruppe ist in unmittelbarer Nähe von Ser70 positioniert und bildet als Donator außer mit Ser70 Wasserstoffbrücken mit Ser130, Glu166 und Asn132 aus. Durch diese Verbrückung des aktiven Zentrums wird dieses zum einen offen gehalten, zum anderen wird zusätzlich durch die Absättigung des Sauerstoffs von Ser130 verhindert, dass Ser130 seinerseits mit dem benachbarten Ser70 interagieren kann.

Diese Absättigung ist wichtig, da erst durch sie die Bildung der oben beschriebenen Wasserstoffbrücke von Ser70 mit Wat290 gewährleistet wird, ohne die Ser70 nicht für einen nucleophilen Angriff an das Substrat aktiviert werden kann. Ser130 wird in seiner Position weiter fixiert, indem es eine Wasserstoffbrücke zu Lys234 ausbildet. Glu166 interagiert durch eine weitere Wasserstoffbrücke mit Asn170.

4.7 Berechnung der Acylierungsreaktion

Wie bereits in Kapitel 4.5.1 beschrieben, handelt es sich bei der ausgewählten Kristallstruktur um das Endprodukt der zu modellierenden Acylierungsreaktion. Die einzelnen Reaktionsschritte und deren Berechnungen werden dennoch in der richtigen chronologischen Reihenfolge vorgestellt, um eine bessere Übersicht zu erreichen. Die Berechnungen der einzelnen Reaktionsschritte wurden zudem mit gegenläufigen Reaktionskoordinaten in jeweils beide Reaktionsrichtungen durchgeführt, um so ein vollständigeres Bild der Reaktion zu erhalten und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sicherzustellen.

4.7.1 Acylierung 1. Schritt:

Bildung des tetrahedralen Zwischenprodukts

Die Bildung des tetrahedralen Zwischenprodukts vom Michaelis-Menten Komplex stellt für Benzylpenicillin - wie für die meisten Substrate - den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der gesamten β -Lactamspaltung durch β -Lactamasen dar. Insgesamt sind drei Reaktionen zur Bildung des tetrahedralen Zwischenprodukts nötig (s. Abbildung 4.12). Für den nucleophilen Angriff an den Carbonylkohlenstoff des β -Lactamrings (**Z**) wird Ser70 durch Deprotonierung (**Y**) aktiviert, die Glu166 als *General Base* unter Nutzung eines Wassermoleküls gewährleistet (**X**).

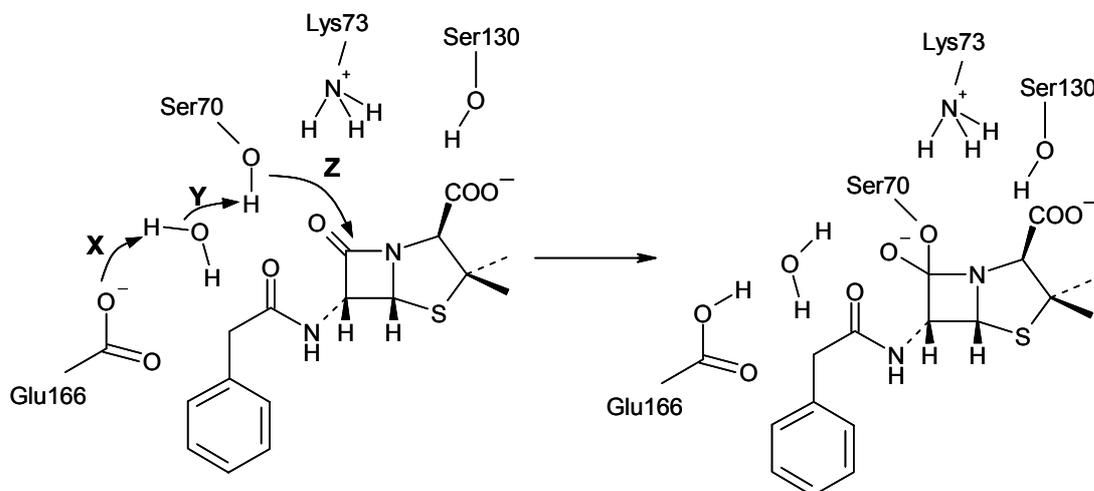


Abbildung 4.12 Reaktionen zur Bildung des tetrahedralen Übergangszustandes

4.7.1.1 Aktivierung von Ser70

Die Aktivierung von Ser70 setzt die Abstraktion des Protons der Hydroxylgruppe durch Glu166 über Wat290 voraus. Es wurden in einem Reaktionsschritt beide dazu nötigen Protonentransfers (**X**, **Y**) modelliert, um das Auftreten eines Hydroxoniumions in Nähe zum deprotonierten Serin bei alleinigem Modellieren von (**X**) zu verhindern.

Hierzu wurden zwei Reaktionskoordinaten definiert (s. Abbildung 4.13). Die eigentliche Deprotonierung wurde durch die Reaktionskoordinate R_Y ($R_Y = d[\text{O}_1:\text{H}_1] - d[\text{O}_2:\text{H}_1]$) *restraint*. Der Transport eines Protons vom Wassermolekül zur *General Base*, Glu166, wurde durch eine weitere Reaktionskoordinate R_X ($R_X = d[\text{O}_2:\text{H}_2] - d[\text{O}_3:\text{H}_2]$) bestimmt.

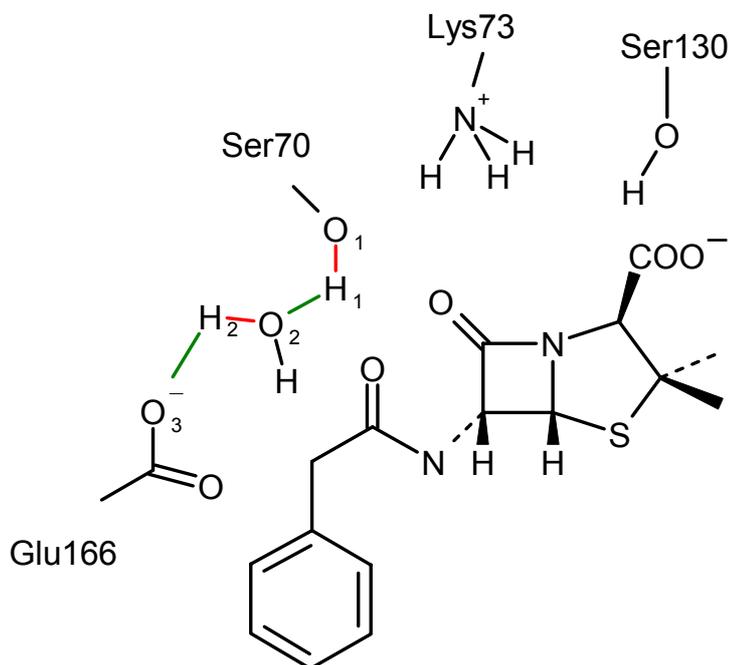


Abbildung 4.13 Definition der R_x/R_y – Reaktionskoordinaten für die Aktivierung von Ser70
 Rot - zu brechende Bindung
 Grün - zu bildende Bindung

Beide Reaktionskoordinaten wurden in $0,2 \text{ \AA}$ – Schritten verändert¹ und - wie in Kapitel 3.6 beschrieben - harmonisch *restraint*, so dass zu jeder Kombination der Werte der Reaktionskoordinaten eine entsprechende Geometrie und deren Energie berechnet wurde. Durch die Anwendung von zwei Reaktionskoordinaten ergibt sich eine zweidimensionale „*Potential Energy Surface*“ (PES), eine Potenzialhyperfläche, die durch die berechneten Energien definiert wird (s. Abbildung 4.14).

Die wahrscheinlichen Zwischenprodukte, d.h. Energieminima auf der Potenzialfläche, wurden zusätzlich ohne das durch die Reaktionskoordinaten hervorgerufene Potenzial energieminiert. Die erhaltene Potenzialhyperfläche ist in Abbildung 4.14 abgebildet.

¹ Die Richtung, in die eine Reaktionskoordinate verändert wird, hängt von der Definition ab, je nachdem welche Distanz als Minuend in die Differenzbildung eingeht, wird die Variable erhöht oder erniedrigt; im vorliegenden Fall wurden die Reaktionskoordinaten also vergrößert.

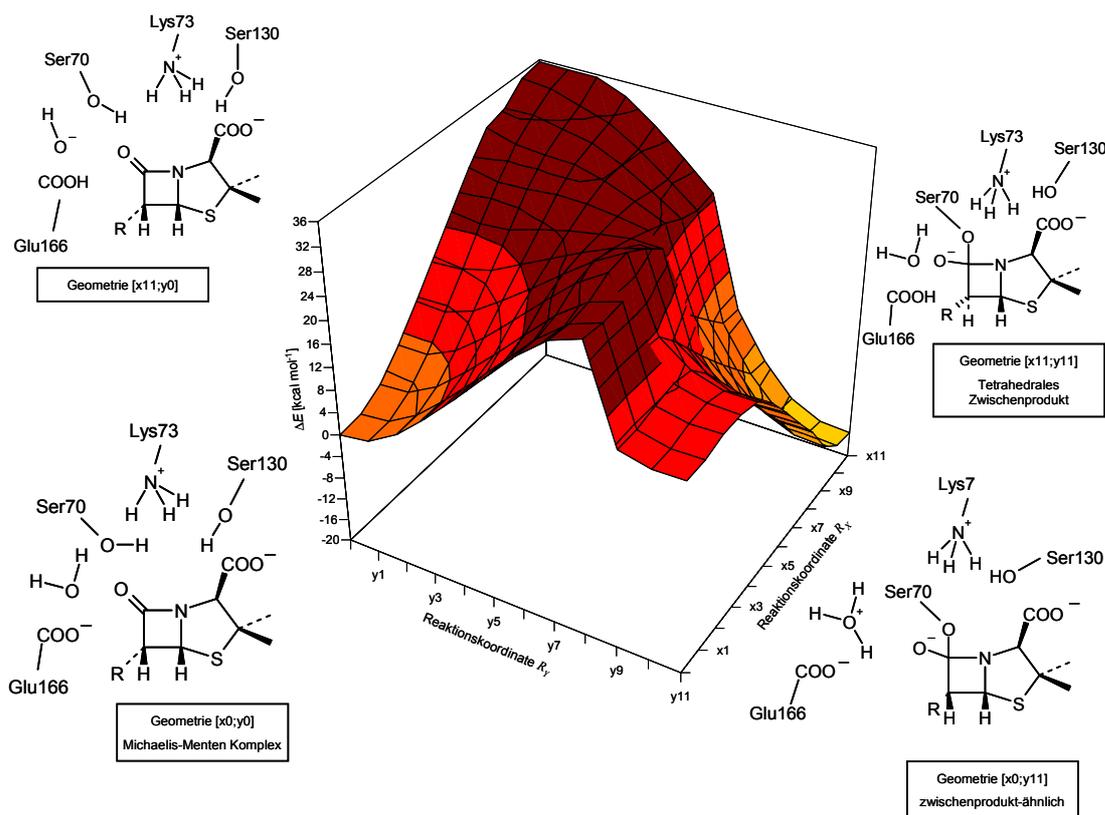


Abbildung 4.14 Potenzialhyperfläche der Reaktionskoordinaten R_X und R_Y

Die Struktur bei $[x_0;y_0]$ entspricht der des Michaelis-Menten Komplexes. Die Energie des Michaelis-Menten Komplexes wurde auf Null gesetzt und die Energien der anderen berechneten Strukturen relativ dazu angegeben¹. Bei niedrigen y -Werten, d.h. bei Transferbeginn des Ser70-Protons, kann entlang der Reaktionskoordinate R_X , der Deprotonierung des Wassermoleküls, ein Energieanstieg im Zusammenhang mit der Bildung des Hydroxidions beobachtet werden. Bei hohen y -Werten, nachdem das Proton von Ser70 an das Wassermolekül übergegangen ist, fällt die Energie bei Fortschreiten der Reaktionskoordinaten R_X ab. Entlang dieser Koordinate kann das entstandene Hydroxoniumion das Glutamat 166 protonieren und so seine aufgenommene Ladung weitergeben.

In dem mittleren Bereich der Reaktionskoordinaten ist für jeden R_X -Wert eine Kante entstanden, an der die Energie stark abfällt. Dieser Energiesprung steht im Zusammenhang mit dem spontanen nucleophilen Angriff des deprotonierten

¹ Alle Energieinhalte der im Rahmen dieser Arbeit berechneten Geometrien werden relativ zu der Energie des Michaelis-Menten Komplex angegeben.

Ser70 an den Carbonylkohlenstoff des β -Lactams (Reaktion **Z**, s. Abbildung 4.12). Die Kante zeigt, dass ein deprotoniertes Ser70 im aktiven Zentrum nicht stabil ist. Die Abstraktion eines Protons von Ser70 führt immer zu einem, vom Fortschreiten der durch R_X beschriebenen Reaktion unabhängigen, nucleophilen Angriff.

Der nucleophile Angriff ist in keiner der hier angewandten Reaktionskoordinaten *restraint*. Das führt dazu, dass eine große Barriere entsteht, bevor die *unrestrained* Reaktion erfolgt und der damit verbundene Energiegewinn auftritt. Eine quantitative Auswertung der Potenzialfläche ist daher aufgrund des Energiesprungs nicht möglich.

Der Einsatz von Reaktionskoordinaten, die zu einer oder mehreren nicht darin definierten Reaktionen führen, können keine gleichmäßig verlaufenden Potenzialflächen liefern. Die *unrestrained* auftretende Reaktion, hier der nucleophile Angriff, läuft von einem Schritt der Reaktionskoordinate auf den nächsten vollständig ab. Die jeweiligen Strukturen werden durch die angewendete Minimierung direkt absolut minimiert, da sie durch keinen *Restraint* bei ungünstigeren, dem Übergangszustand der *unrestrained* Reaktion näheren, Geometrien gehalten werden, so dass es zu einem abrupten Energiegewinn kommt.

Die Reaktionsbarrieren werden zu hoch berechnet, weil sie eindeutig durch die *unrestrained* Reaktion bestimmt werden, so auch im vorliegenden Reaktionsschritt durch den nucleophilen Angriff. Vor dem Schritt der Reaktionskoordinate R_Y , der letztlich zum nucleophilen Angriff führt, werden in den vorhergehenden Schritten sehr ungünstige Strukturen minimiert und die Barriere wird unnatürlich hoch, gefolgt von einem dann sehr großen Energiegewinn. Es muss also außer der AM1-bekanntem generellen Übertreibung von Reaktionsbarrieren [133][134] von einer weiteren, nicht abschätzbaren Erhöhung ausgegangen werden.

Die Geometrie [x0;y11] ist als eine tetrahedrale, zwischenprodukt-ähnliche Struktur anzusehen. Die Struktur enthält im aktiven Zentrum zwar ein Hydroxoniumion, wird aber von AM1 als stabiles Minimum berechnet. Der anschließende Protonentransfer zur Wiederherstellung des Wassermoleküls und Protonierung von Glu166 ([x0;y11] bis [x11;y11]) hat jedoch nur eine sehr kleine Barriere von $0,8 \text{ kcal mol}^{-1}$.

Die Struktur am Ende beider Reaktionskoordinaten entspricht dem tatsächlichen tetrahedralen Zwischenprodukt. Diese, bei den eingesetzten

Reaktionskoordinaten eigentlich unerwartete Struktur, enthält bereits einen tetrahedralen Carbonylkohlenstoff und die protonierte *General Base*, Glu166.

Aufgrund des Energiesprungs - hervorgerufen durch den *unrestrained* Ser70-Angriff - lässt sich von der Potenzialfläche zwar keine quantitative, jedoch eine qualitative Aussage treffen. Im aktiven Zentrum ist ein deprotoniertes, negativ geladenes Ser70 nicht stabil. Bei Deprotonierung kommt es zu einem spontanen nucleophilen Angriff, der in keiner Abhängigkeit zu dem Protonentransfer vom Wassermolekül zur *General Base* steht. Die Potenzialhyperfläche weist daher auf einen konzertierten Reaktionsmechanismus von Deprotonierung und nucleophilen Angriff hin.

4.7.1.2 Nucleophiler Angriff und Ser70-Deprotonierung

Die beiden in vorhergehender PES zeitgleich stattfindenden Reaktionen, von denen eine nicht *restraint* war, wurde durch die Berechnung einer Potenzialfläche unter Anwendung der für diese Reaktionen entsprechenden Reaktionskoordinaten untersucht.

Reaktionskoordinate R_Y für die Deprotonierung von Ser70 wurde beibehalten. Anstelle von R_X wurde eine neue Reaktionskoordinate R_Z eingeführt, die den Angriff von Ser70 an den Carbonylkohlenstoff beschreibt ($R_Z = d[\text{O}_1:\text{C}_1]$; s. Abbildung 4.15). R_Y wurde in 0,1 Å vergrößert, während R_Z , bestehend aus nur einer Distanz, in 0,05 Å – Schritten reduziert wurde.

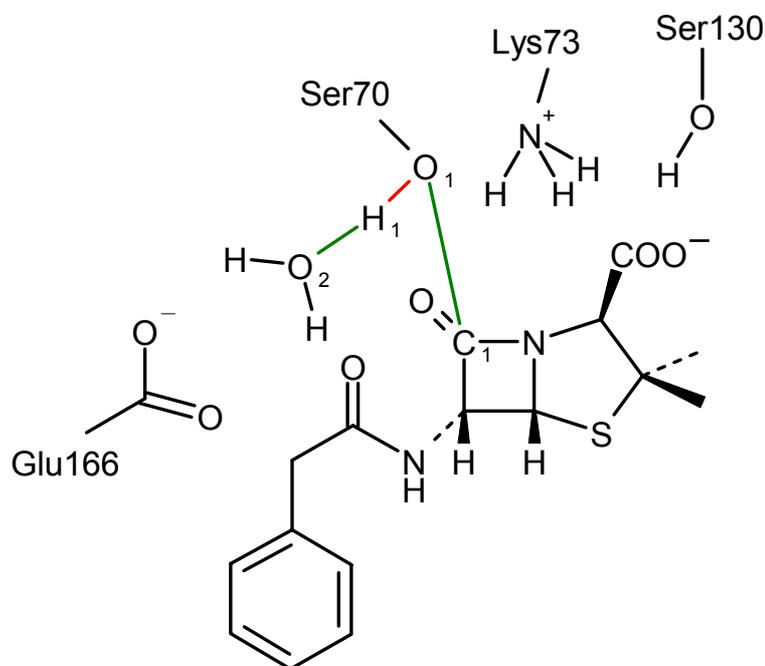


Abbildung 4.15 Definition der R_Y/R_Z -Reaktionskoordinaten für Aktivierung von Ser70
 Rot - zu brechende Bindung
 Grün - zu bildende Bindung

Die mit den Reaktionskoordinaten berechnete PES ist in Abbildung 4.16 dargestellt. Die Energie des Michaelis-Menten Komplexes ist bei den Nullpunkten der beiden Reaktionskoordinaten - analog der R_X/R_Y -PES - zu finden. Die glatt verlaufende Form der Potenzialhyperfläche zeigt, dass bei Anwendung der Reaktionskoordinaten R_Y und R_Z zunächst keine *unrestrained*

Reaktionen auftreten. Das wird auch durch die Analyse der erhaltenen Strukturen bestätigt.

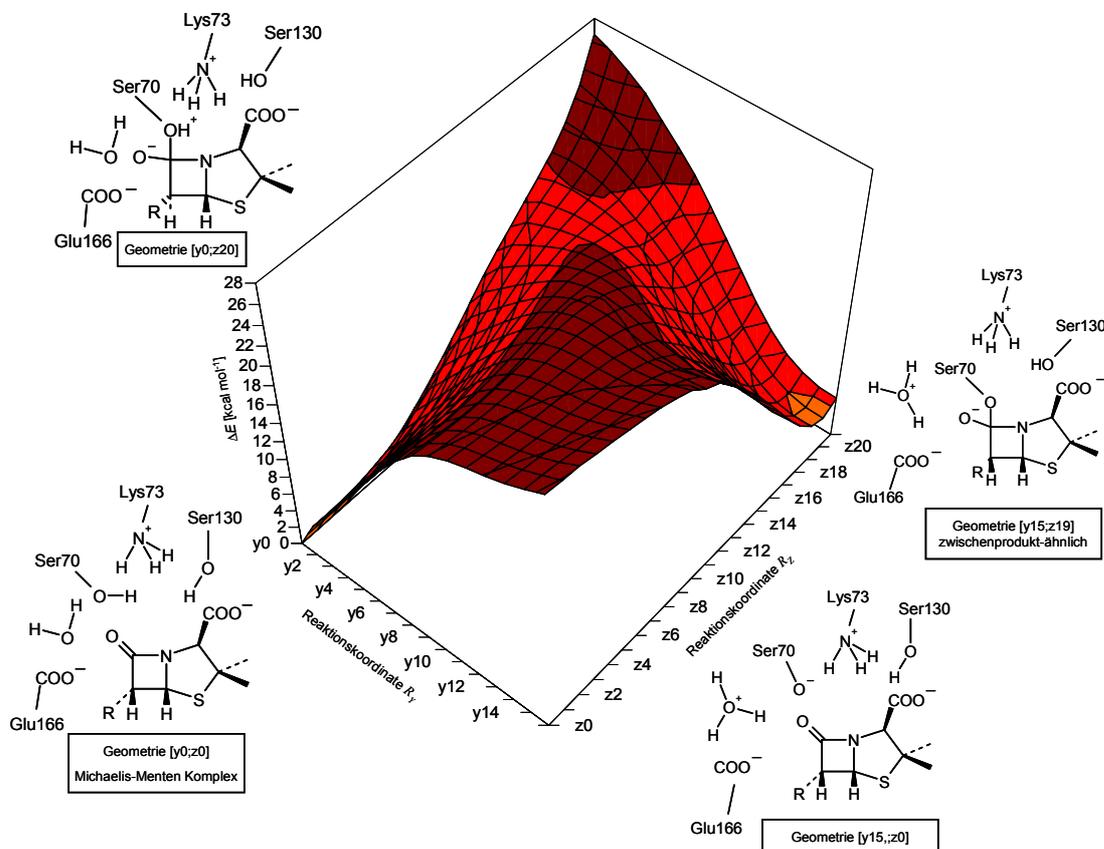


Abbildung 4.16 Potenzialhyperfläche der Reaktionskoordinaten R_y und R_z

Die Potenzialhyperfläche bestätigt die aus vorhergehender PES gewonnenen Erkenntnisse und zeigt eindeutig die Konzertiertheit der beiden Reaktionen (Y, Z) auf. Der Weg der geringsten Energie läuft nicht, einem sequenziellen Mechanismus folgend, entlang nur einer der beiden Reaktionskoordinatenachsen an deren Ende sich ein Energieminimum bildet bevor dann die Reaktion der zweiten Reaktionskoordinaten beginnen würde. Der energetisch günstigste Weg für das System läuft durch die Mitte der Potenzialhyperfläche über den Übergangszustand bei Geometrie $[y_4; z_{16}]$ (s. Abbildung 4.17a) von dem eine Barriere für die Reaktion von $20,7 \text{ kcal mol}^{-1}$ bestimmt werden kann.

Im Übergangszustand befindet sich das Proton von Ser70 mit jeweils $1,2 \text{ \AA}$ Abstand genau in der Mitte zwischen den Sauerstoffatomen des Wassermoleküls sowie der Hydroxylgruppe. Der nucleophile Angriff ist schon vorangeschritten, die Länge der entstandenen Bindung ist jedoch mit $1,67 \text{ \AA}$

noch eindeutig größer als die ideale Bindungslänge im Zwischenprodukt von 1,46 Å.

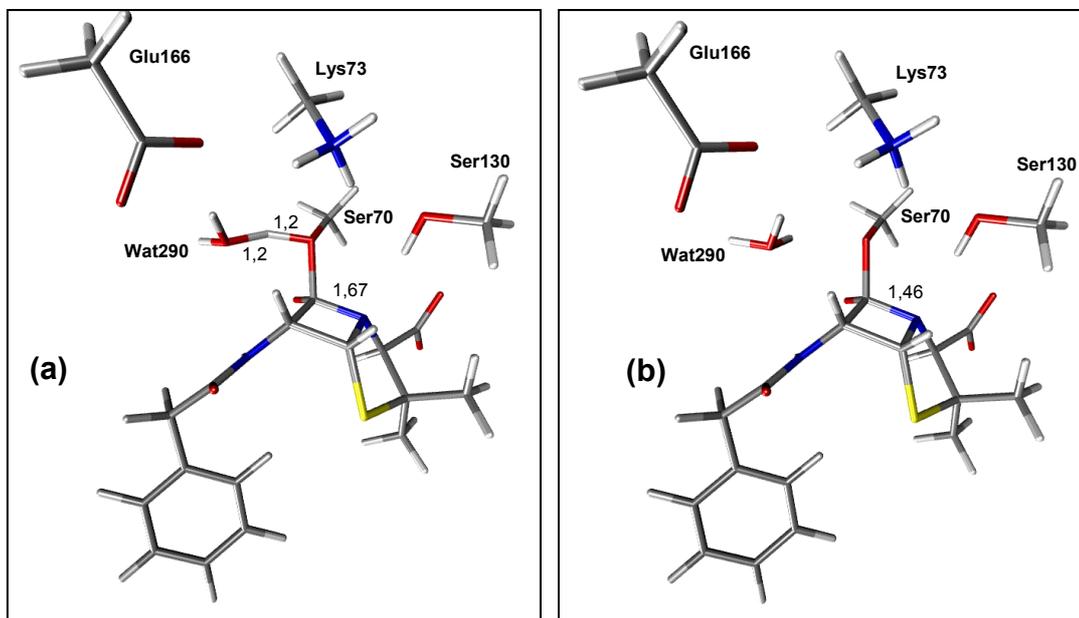


Abbildung 4.17 QM-Atome von repräsentativen Strukturen aus der R_Y/R_Z -Potenzialhyperfläche (Längenangaben in Å)
 (a) Übergangszustand (Geometrie [y4;z16])
 (b) zwischenprodukt-ähnliche Struktur (Geometrie [y11;z10])

Die Struktur des Energieminimums bei [y11;z10] (s. Abbildung 4.17b) entspricht der der zwischenprodukt-ähnlichen Struktur aus der vorhergehenden PES. Ser70 hat die Carbonylgruppe angegriffen und der Carbonylkohlenstoff hat eine tetraedrale Konfiguration angenommen. Das Wassermolekül liegt nach Aufnahme des Protons als Hydroxoniumion vor.

Die Stabilität dieser zwischenprodukt-ähnlichen Struktur ist allerdings fraglich. Trotz der Berechnung eines Energieminimums konnte bei höheren Y-Werten, wenn sich das Proton und damit auch das Wassermolekül weiter von Ser70 entfernen, eine spontane Deprotonierung des Wassers durch Transfer eines Protons zu Glu166 beobachtet werden (Werte nicht gezeigt). Außerdem wurde - ausgehend von der minimierten Geometrie [y15;z19] - eine sehr niedrige Barriere für diesen Protonentransport in einer eindimensionalen Reaktionswegberechnung mit R_X als Reaktionskoordinate (s. Abbildung 4.12) bestimmt. Die Potenzialfläche (s. Abbildung 4.18) zeigt einen großen Energiegewinn nach Überwindung einer Barriere von nur $0,9 \text{ kcal mol}^{-1}$. Die berechnete Barriere ist viel zu gering, als dass es sich tatsächlich um ein

stabiles Zwischenprodukt handeln könnte. Die verwendeten Reaktionskoordinaten scheinen daher trotz der berechneten AM1-Energieminimumstruktur für die Beschreibung des vollständigen ersten Acylierungsschritts nur bedingt geeignet zu sein.

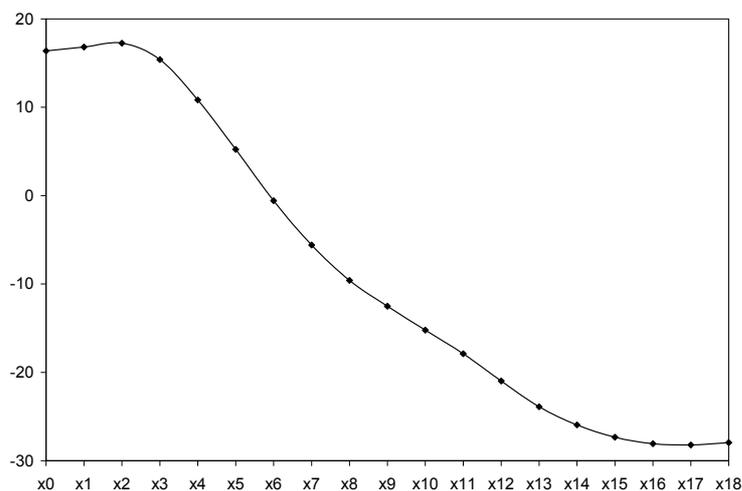


Abbildung 4.18 Potenzialfläche der Reaktionskoordinate R_X

Die AM1-QM/MM-Potenzialfläche der Reaktionskoordinaten R_Y und R_Z wurde überprüft, indem die erhaltenen Energien nach dem in Kapitel 3.5 beschriebenen Verfahren neu berechnet wurden. Die in Abbildung 4.19 gezeigte PES der mit B3LYP korrigierten Energien bestätigt die Erkenntnisse über die bereits angedeutete Instabilität des tetrahedralen Zwischenprodukts 1 bei [y15;z19].

Die vermeintliche zwischenprodukt-ähnliche Struktur wird durch B3LYP als eine Struktur hohen Energieinhalts berechnet, ohne dass auch in dessen Nähe auf der Potenzialfläche ein Energieminimum erkennbar ist. Die ohnehin durch AM1 gering berechnete Stabilität muss daher auf die semiempirische Methode zurückgeführt werden und die Struktur nicht als reelles Zwischenprodukt, sondern als AM1-Energie-Artefakt angesehen werden.

Das Fehlen einer Barriere in der PES zeigt, dass die Reaktion nicht allein durch die zwei angewendeten Reaktionskoordinaten beschrieben werden kann. Die Energie steigt während des nucleophilen Angriffs an und erreicht bis zu seiner Vollendung (z20, $d[\text{O}_1:\text{C}_1] = 1,46 \text{ \AA}$) kein Energieminimum, das einem stabilen Zwischenprodukt entsprechen könnte. In der energieärmsten Struktur auf der

z20-Achse bei [y5;z20] ist das zu abstrahierende Proton noch nicht vollständig transferiert, sondern mit einer Distanz von 1,33 Å zu O₁ sowie 1,13 Å zu O₂ zwischen Donor und Akzeptor platziert.

Eine Struktur mit einem protonierten Wasser im aktiven Zentrum ist instabil. Der zweite Protonentransfer von Wat290 zu Glu166 muss daher einsetzen, bevor das erste Proton von Ser70 vollständig an Wat290 übergegangen ist.

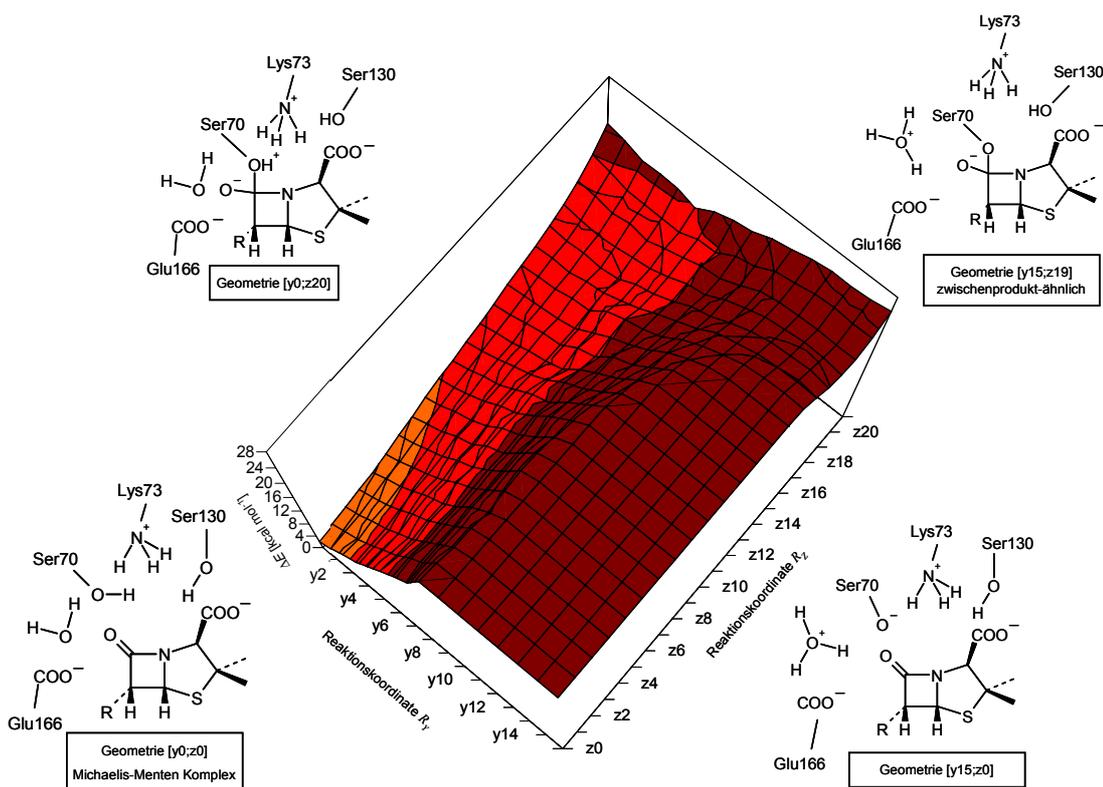


Abbildung 4.19 Potenzialhyperfläche der Reaktionskoordinaten R_Y und R_Z (QM-Energien mit B3LYP/6-31+G(d) neu berechnet)

4.7.1.3 Nucleophiler Angriff, Ser70 Deprotonierung und Protonentransfer zu Glu166

Aus den vorangegangenen Berechnungen ist deutlich geworden, dass alle drei Reaktionen (**X**, **Y** und **Z**) in einem Schritt berücksichtigt werden müssen. Die Reaktionskoordinaten R_Y und R_Z wurden hierfür zu R_{YZ} kombiniert ($R_{YZ} = d[\text{O}_1:\text{H}_1] - d[\text{O}_2:\text{H}_1] - d[\text{C}_1:\text{O}_1]$; s. Abbildung 4.15), während R_X unverändert beibehalten wurde. Die Schrittgröße der Veränderung von R_X wurde mit 0,1 Å nicht verändert. R_{YZ} wurde entsprechend den angewendeten Schrittgrößen der einzelnen Reaktionskoordinaten in 0,15 Å Intervallen vergrößert.

Durch die Definition von R_{YZ} wurde dem System die Freiheit gelassen, zu jeder Phase des Protonenübergangs von Wat290 zu Glu166 (R_X) das günstigste Verhältnis des Fortschritts des nucleophilen Angriffs zu dem der Ser70 Deprotonierung zu berechnen.

Bei Anwendung der Reaktionskoordinaten ergibt sich die in Abbildung 4.20 dargestellte Potenzialhyperfläche.

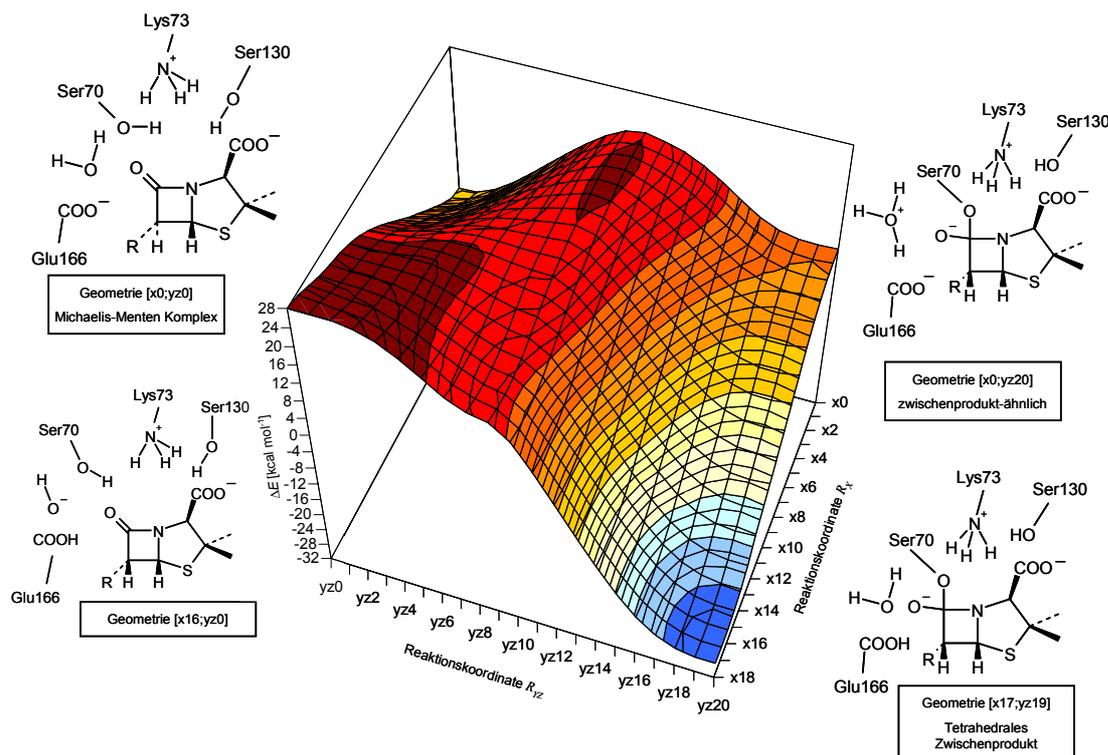


Abbildung 4.20 Potenzialhyperfläche der Reaktionskoordinaten R_X und R_{YZ}

Das Profil der Potenzialfläche entspricht dem einer konzertierten Reaktion. Der Weg der geringsten Energie verläuft durch die Mitte der Potenzialfläche, mit dem von AM1 berechneten Übergangszustand bei [x7;yz9] (s. Abbildung 4.22a) als Punkt höchster Energie. Das Energieminimum, das dem tetrahedralen Zwischenprodukt entspricht, findet sich bei [x17;yz19] (s. Abbildung 4.22b).

Die alleinige simultane Abstraktion des Ser70-Protons zusammen mit dem nucleophilen Angriff der Ser70-Hydroxylgruppe ist nicht der energetisch günstigste Mechanismus, da sonst der Weg der geringsten Energie zunächst entlang der x_0 -Achse verlaufen müsste. Dieses Ergebnis hat sich bereits nach Auswertung der R_Y/R_Z -Potenzialfläche angedeutet.

Nach Neuberechnung der QM-Energien mit B3LYP gibt die PES qualitativ ein identisches Bild wie die reine AM1-QM/MM-Potenzialfläche (s. Abbildung 4.21). Die Konzertiertheit der Reaktion lässt sich auch hier deutlich erkennen.

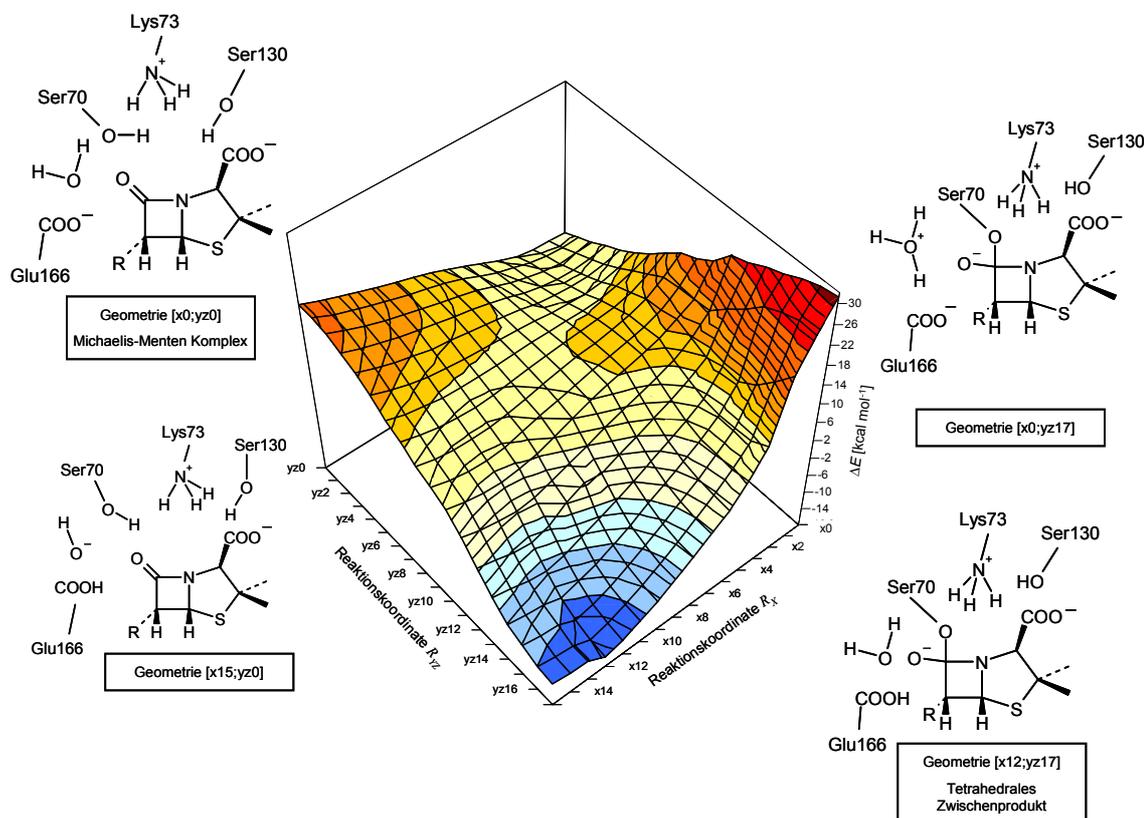


Abbildung 4.21 Potenzialhyperfläche der Reaktionskoordinaten R_x / R_{yz} (QM-Energien mit B3LYP/6-31+G(d) neu berechnet)

Der B3LYP-Übergangszustand (Geometrie [x6;yz7]) ist sehr ähnlich dem durch AM1 erhaltenen Übergangszustand. Allein die Längen der Wasserstoffbrückenbindungen der zu transferierenden Protonen differieren geringfügig. Bei der von B3LYP favorisierten Struktur ist das Proton von Ser70 mit 1,1 Å noch fester an Ser70 gebunden und hat mit 1,3 Å auch noch einen etwas größeren Abstand zu dem Sauerstoff des Wassermoleküls als in der AM1-Struktur, in der es mit Abständen von jeweils um 1,2 Å in der Mitte platziert ist.

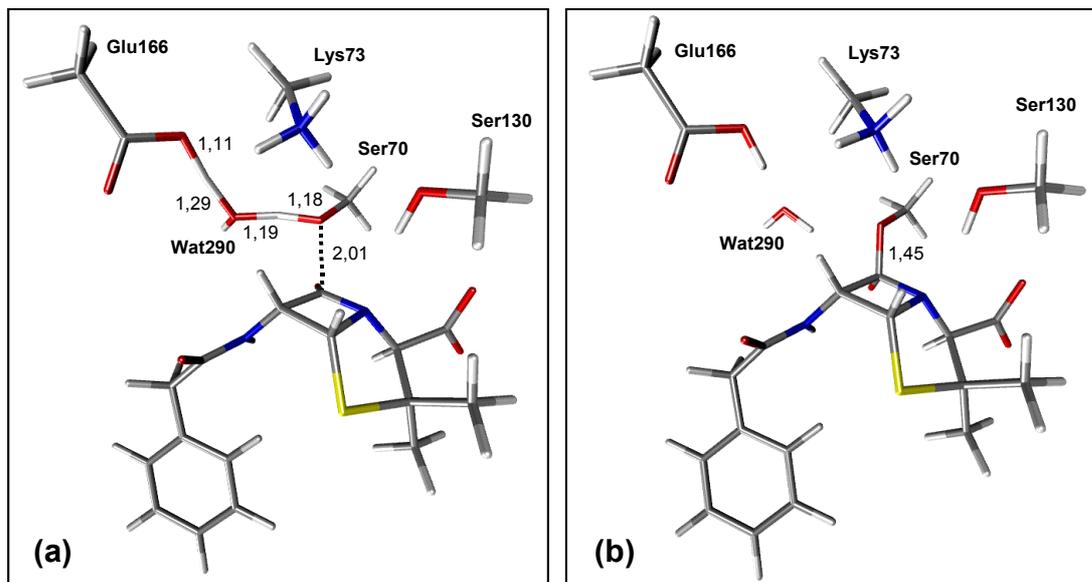


Abbildung 4.22 QM-Atome repräsentativer Strukturen der R_x / R_{yz} Potenzialhyperfläche (Längenangaben in Å)

(a) AM1-Übergangszustand (Geometrie [x7;yz9])

(b) Tetrahedrales Zwischenprodukt (Geometrie [x17;yz19])

Der andere Protonentransfer (**X**) ist mit Distanzen zwischen den beteiligten Atomen von Wat290 und Glu166 zwischen 1,1 und 1,3 Å in beiden Strukturen ähnlich weit fortgeschritten. Die Distanz vom Carbonylkohlenstoff des Penicillins zum nucleophilen Sauerstoff von Ser70 ist sowohl in der AM1-Geometrie (2,01 Å) als auch in der B3LYP-Struktur (2,04 Å) im Vergleich zum Michaelis-Menten Komplex (2,48 Å) bereits deutlich kleiner geworden.

Bei Betrachtung des Übergangszustandes ([x7;yz7] und [x7;yz9]) zeigt sich, dass die Barriere und damit die Umsetzungsrate nicht durch den nucleophilen Angriff, sondern durch die beiden für die Aktivierung nötigen Protonentransfers bestimmt wird. Die zwei Protonen befinden sich ungefähr in der Mitte zwischen den jeweils beteiligten Donor- und Akzeptor-Atomen, während sich die Distanz zwischen O₁ und C₁ zu 2 Å zwar verkürzt hat, der eigentliche nucleophile Angriff jedoch erst noch bevor steht.

Ist Ser70 erst mal aktiviert (deprotoniert), kommt es verbunden mit einem großen Energiegewinn sehr schnell zum nucleophilen Angriff und zur Bildung des tetrahedralen, sp³-hybridisierten Kohlenstoffatoms. Der Sauerstoff des katalytischen Wassermoleküls wird über die Reaktion durch die aus den Protonentransfers resultierenden Wasserstoffbrücken und durch eine weitere

Wasserstoffbrücke mit der C γ -Carbonylgruppe von Asn170 in seiner Position fixiert.

Das Energieminimum und damit die Geometrie des tetrahedralen Zwischenprodukts hat sich im Vergleich zu dem der reinen AM1-QM-Energie von [x17;yz19] auf [x12;yz17] auf der Potenzialhyperfläche ebenfalls leicht verschoben. Die Unterschiede der Geometrien sind aber nur sehr gering, da im Wesentlichen die Position des Wassermoleküls variiert, während die Geometrien der Aminosäuren und des tetrahedralen Kohlenstoffs im noch intakten β -Lactamring nahezu identisch sind. Die Länge der neu geformten Bindung zwischen Ser70 und dem Penicillin beträgt 1,45 Å.

Eine weitaus größere Abweichung ist bei dem Vergleich der jeweils berechneten Barriere festzustellen. Die mit den B3LYP korrigierten Energien erhaltene Barriere konnte mit 8,7 kcal mol⁻¹ deutlich niedriger als die reine AM1-Barriere von 19,6 kcal mol⁻¹ bestimmt werden. Der berechnete Unterschied der Barrieren steht in Einklang mit den Eigenschaften der angewendeten Methoden, die generell in Bezug auf die Vorhersage von Reaktionsbarrieren, aber auch auf die berechneten Stabilitäten von Wasserstoffbrückenbindungen, gegensätzliche Eigenschaften haben.

Semiempirische Methoden wie AM1 berechnen allgemein Aktivierungsenergien deutlich zu hoch, während B3LYP Reaktionsbarrieren, besonders von Protonen- und Wasserstoffübergängen, etwas zu niedrig berechnet. Die daraus resultierende Differenz der Barrieren wird zusätzlich dadurch vergrößert, dass die Struktur des Übergangszustands durch starke Wasserstoffbrücken gekennzeichnet ist (s. Kapitel 4.8), die von AM1 energetisch weniger vorteilhaft und mit einer zu großen Distanz zwischen den beteiligten Atomen vorhergesagt werden. B3LYP dagegen berechnet Wasserstoffbrückenbindungen in ihrer Ausdehnung vergleichsweise kurz sowie energetisch äußerst günstig, so dass die Struktur des Übergangszustands von B3LYP relativ zu AM1 stabiler vorhergesagt wird [151]-[158].

Weiterhin wirkt sich die Bestimmung der B3LYP-Barriere, basierend auf einer nicht durch B3LYP berechneten Geometrie, dem Michaelis-Menten Komplex (Geometrie [x0;yz0]), zusätzlich erniedrigend auf die B3LYP-Barriere aus. Die absolute Energie des Übergangszustands wird maßgeblich durch die von den angewendeten Reaktionskoordinaten hervorgerufenen extremen Bindungslängen und -winkeln bestimmt. Der Bereich des Übergangszustands auf der

Potenzialfläche wurde durch die Wahl der sehr kleinen Schrittgrößen¹ der Reaktionskoordinaten umfassend abgedeckt, so dass die Geometrie des Übergangszustands und zugleich seine Energie – dann auch mit unterschiedlichen Methoden – verhältnismäßig genau bestimmt werden konnte.

Dagegen muss die reelle durch B3LYP-optimierte Geometrie des Michaelis-Menten Komplexes ein niedrigeres Energieniveau haben als die Energie, die von der AM1-minimierten Startstruktur durch das Neuberechnen der QM-Energie mit B3LYP erhalten wurde. Die Geometrie des Minimums resultiert aus einer freien AM1-Optimierung ohne Reaktionskoordinaten-*Restrains*. Die Geometrien der Wasserstoffbrücken können daher nicht denen des potenziellen B3LYP-Energieminimums entsprechen. Der berechnete B3LYP-Energieinhalt dieser Geometrie ist relativ zu dem des Übergangszustands, dessen Geometrie überwiegend durch die Reaktionskoordinaten bestimmt wird, dementsprechend zu groß.

Das relativ zur Energie des Übergangszustands aus der Methode resultierende zu hohe B3LYP-Energieniveau des Michaelis-Menten Komplexes ist für eine leichte Absenkung der Barriere verantwortlich. Die reelle B3LYP-Barriere muss folglich wegen des zu ungenauen Energieminimums und der leicht zu hoch berechneten Stabilität von Wasserstoffbrücken größer sein als die hier durch das AM1-B3LYP-Korrekturverfahren berechnete Barriere.

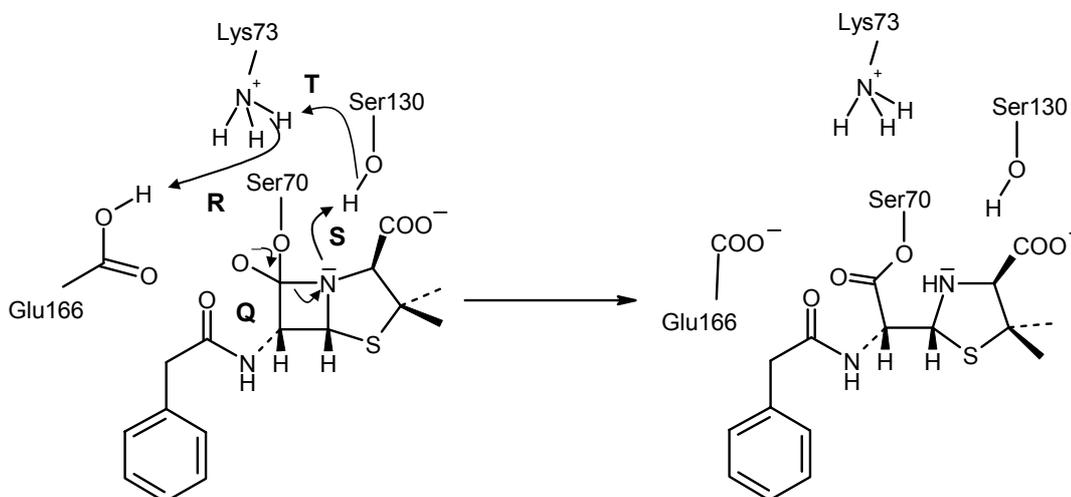
4.7.2 Acylierung 2. Schritt: Bildung des Ser70-Enzym-Esters

Nach der erfolgten Bildung des tetrahedralen Zwischenprodukts, muss nun der β -Lactamring des Benzylpenicillins gespalten sowie das dabei freiwerdende Stickstoffatom des Thiazolidinrings protoniert werden.

Für diese Reaktion sind insgesamt drei Protonentransfers nötig, bei denen das Proton an Glu166 über ein Netzwerk von Wasserstoffbrücken zu dem Stickstoff transportiert wird (s. Abbildung 4.23). Der Stickstoff der sich öffnenden β -Lactambindung (**Q**) wird von Ser130 protoniert (**S**), das als letzter Donor fungiert (s. Kapitel 1.6). Das übergebene Proton wird an Ser130 von Glu166

¹ Die angewendeten kleinen Schrittgrößen, die die Berechnung einer PES sehr rechenintensiv werden lassen, wurden erst auf Berechnungen mit größeren Schrittgrößen folgend durchgeführt, um die quantitativen Ergebnisse zu verbessern.

über das zwischenzeitlich unprotonierte Lys73 als Zwischenstation



zurückgeliefert (**R, T**).

Abbildung 4.23 Reaktionen zur Bildung des Acylenzym aus dem tetrahedralen Zwischenprodukt

4.7.2.1 Protonierung des Thiazolidinstickstoffs und Ser130-Reprotonierung

Zunächst wurde die Protonierung des Stickstoffs und die gleichzeitige Protonierung von Ser130 durch Lys73 in einem Schritt berechnet, da es nach statischen Energie-Berechnungen möglich schien, dass der Stickstoff initial vor der Ringspaltung protoniert werden könnte [159].

Hierfür wurden die Reaktionskoordinaten R_S ($R_S = d[\text{O}_4:\text{H}_4] - d[\text{N}_1:\text{H}_4]$) und R_T ($R_T = d[\text{N}_2:\text{H}_3] - d[\text{O}_4:\text{H}_3]$) definiert (s. Abbildung 4.24). Die in Abbildung 4.25 dargestellte Potenzialfläche wurde berechnet, indem die Reaktionskoordinaten in 0,2 Å – Schritten vergrößert wurden.

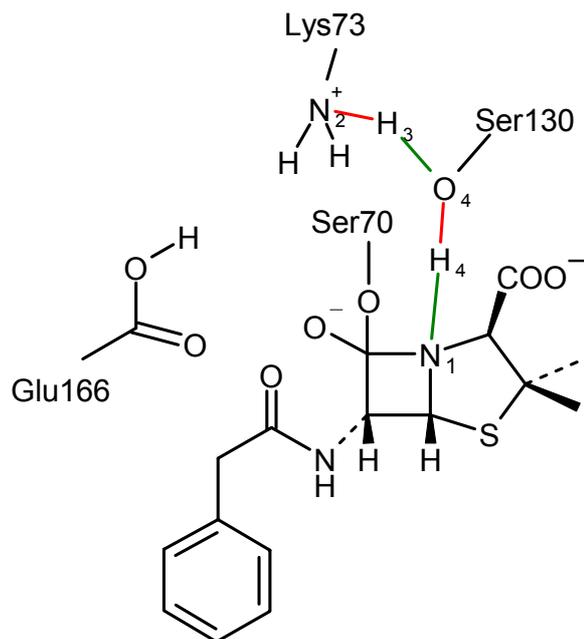


Abbildung 4.24 Definition der R_S und R_T – Reaktionskoordinaten für die Protonierung des Stickstoffs im Thiazolidinring
 Rot - zu brechende Bindung
 Grün - zu bildende Bindung

Als Ausgangsstruktur (Geometrie [s0;t0]) für die Berechnung der Potenzialfläche diene die durch AM1 bestimmte Geometrie des tetrahedralen Zwischenprodukts, des Endproduktes aus der vorangegangenen PES.

Die Berechnung einer Potenzialfläche mit einer Ausgangsstruktur, die als Energieminimum einer mit B3LYP korrigierten PES identifiziert wurde, ist nicht möglich. Die Optimierung der Geometrien einer Reaktionskoordinaten-Berechnung ist nur durch die Anwendung von AM1 als QM-Methode praktikabel, so dass bei der ersten Energieminimierung von der B3LYP-Minimumstruktur auf jeden Fall eine Geometrie erhalten werden würde, die der des AM1-Minimums entspräche.

Die Form der resultierenden Potenzialfläche (s. Abbildung 4.25) zeigt eindeutig, dass die Protonierung des intakten Bicyclus nicht möglich ist. Entlang der Reaktionskoordinate R_S , die den Verlauf dieser Protonierung beschreibt, ist für jeden Wert von R_T ein Energiesprung zu beobachten, der auf die Spaltung des Lactamrings zurückzuführen ist (Reaktion **Q**, s. Abbildung 4.23).

Die Spaltung ist in den hier angewendeten Reaktionskoordinaten nicht berücksichtigt. Die *unrestraint* ablaufende Reaktion führt zu einem plötzlichen Energiesprung, analog zu dem der bei der R_X/R_Y -Potenzialfläche in Abbildung 4.14 beobachtet werden konnte.

Von der Geometrie [s11;t0] kann entlang der R_T -Koordinate ein Energiegewinn von ca. 22 kcal mol⁻¹ bestimmt werden, der sich durch die Reptonierung des entstandenen Ser130-Anions ergibt.

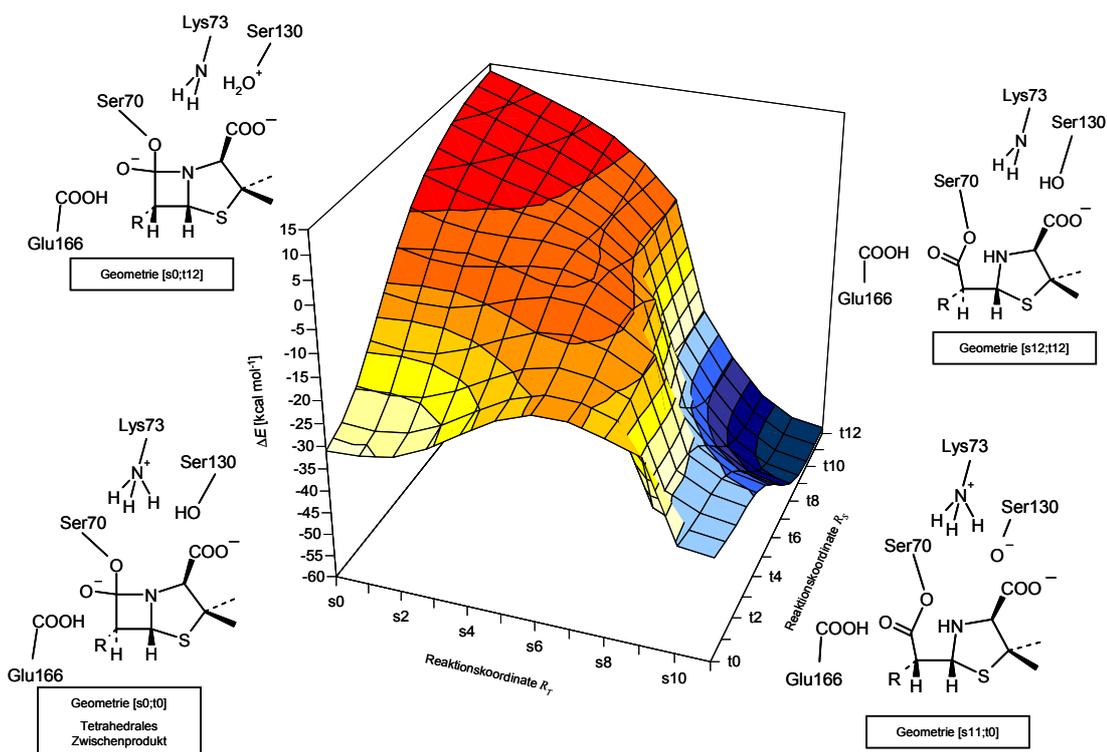


Abbildung 4.25 Potenzialhyperfläche der Reaktionskoordinaten R_S und R_T

4.7.2.2 β -Lactamringspaltung und Protonierung des Thiazolidinstickstoffs

Die beiden Reaktionen, die sich nach Auswertung der vorhergehenden Potenzialfläche als konzertiert ablaufend erwiesen, wurden in einer weiteren PES-Berechnung untersucht. Zu diesem Zweck wurden die Reaktionskoordinaten R_T für die Protonierung des Stickstoffs aus vorangegangener PES und eine neue Reaktionskoordinate R_Q für die Ringspaltung ($R_Q = d[C_1:N_1]$) angewendet (s. Abbildung 4.26). Die Schrittgröße von 0,2 Å von R_T wurde beibehalten, während die aus nur einer Distanz bestehende Reaktionskoordinate R_Q in 0,1 Å-Schritten vergrößert wurde. Die sich aus den berechneten Energien ergebende Potenzialhyperfläche ist in Abbildung 4.27 dargestellt.

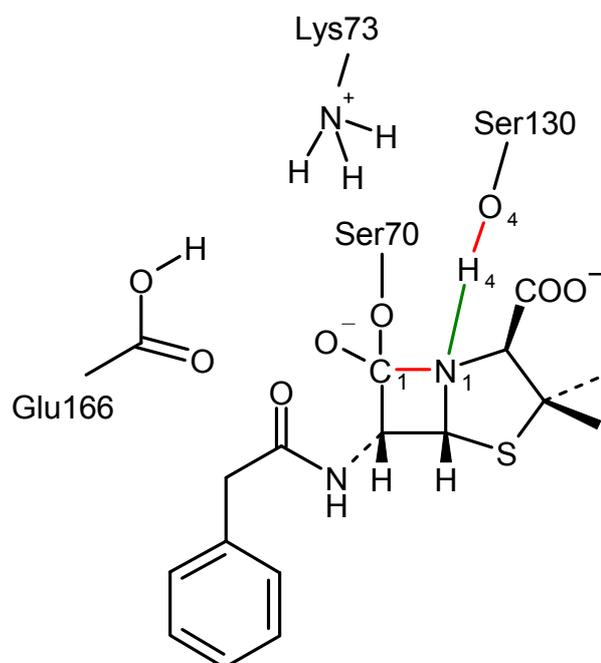


Abbildung 4.26 Definition der R_T und R_Q – Reaktionskoordinaten für die Protonierung des Stickstoffs im Thiazolidinring und die Spaltung des β -Lactamrings.
 Rot - zu brechende Bindung
 Grün - zu bildende Bindung

Ausgangsgeometrie ist hier ebenfalls das tetrahedrale Zwischenprodukt, dessen Energie bei [t0;q0] abzulesen ist. Die Ringspaltung entlang R_Q endet bei niedrigen R_T -Werten in einem Energieminimum. Dieses Minimum [t2;q10] suggeriert einen sequenziellen Reaktionsmechanismus mit einem relativ

stabilen Stickstoffanion, ist aber dennoch als ein Artefakt anzusehen. Die Barriere für die anschließende Protonierung des Stickstoffs entlang R_T liegt nur bei ca. 1 kcal mol⁻¹ und ist damit viel zu gering, als dass es sich um ein stabiles Zwischenprodukt handeln könnte, das für den Nachweis eines sequenziellen Mechanismus unabdingbar ist.

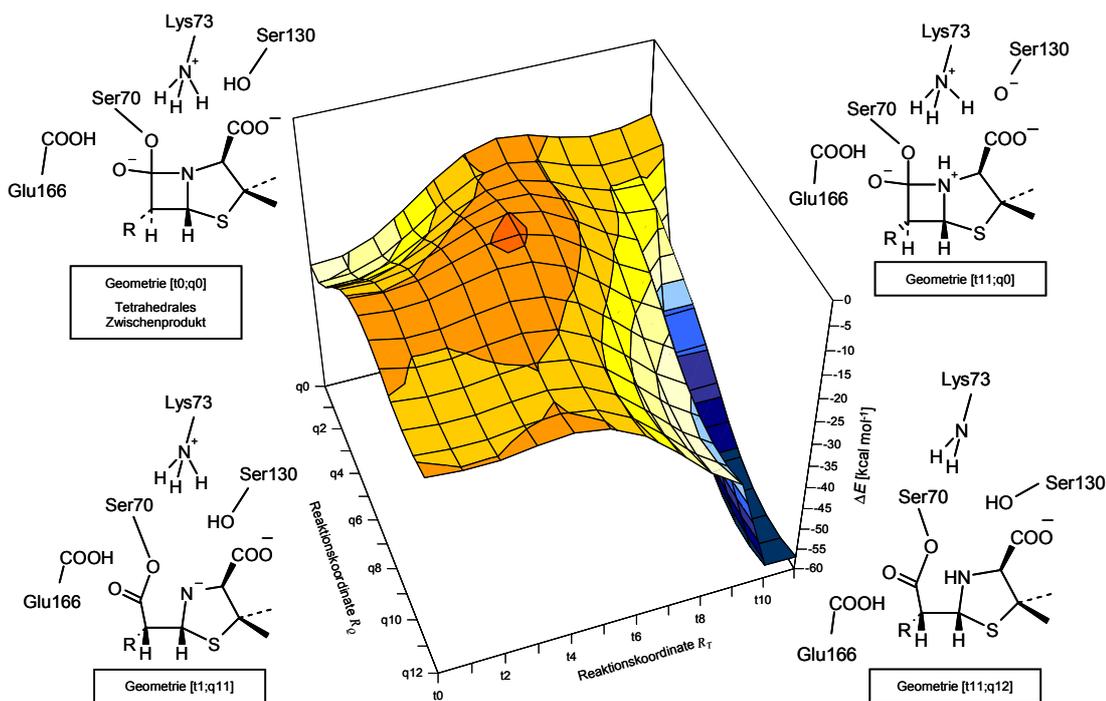


Abbildung 4.27 Potenzialhyperfläche der Reaktionskoordinaten R_T und R_Q

Es scheint trotzdem am energetisch günstigsten zu sein, wenn die Bindung der Lactambindung einleitend anwächst, bevor nach dem Übergangszustand bei [t1;q5] die Protonierung des Stickstoffs des Thiazolidinrings einsetzt. Der Mechanismus dieser beiden Reaktionen ist somit im Sinne einer nicht strikt konzertiert ablaufenden Reaktion zu verstehen. Die beiden Reaktionen sind zeitlich leicht versetzt und erfolgen nicht vollständig parallel. Es wird allerdings keine stabile Struktur als Zwischenprodukt zwischen den beiden Reaktionen gebildet.

Dennoch wird auch bei Anwendung von R_T und R_Q kein stabiles (Zwischen-)Produkt erreicht, sondern es kommt abermals zu einer mit einem großen Energiegewinn einhergehenden *unrestrained* Reaktion. Im Laufe der Protonierung des Thiazolidin-Stickstoffs wird Ser130 bereits durch Lys73 wieder protoniert (Reaktion **S**, s. Abbildung 4.23). Der Betrag des Energiegewinns

dieser *unrestrained* Reaktion entspricht in etwa den 22 kcal mol⁻¹ der gleichen, allerdings *restrained* Reaktion (R_S) aus vorhergehender Potenzialfläche.

Weder die Ringspaltung noch die Protonenübergänge zum β -Lactam-Stickstoff und zu Ser130 folgen einem sequenziellen Reaktionsmechanismus, sondern scheinen konzertiert abzulaufen.

4.7.2.3 β -Lactamringspaltung und Protonenverschiebung von Lys73 über Ser130 zu dem Thiazolidinstickstoff

Die bisher ausgewerteten Potenzialflächen zeigten eindeutig, dass die Protonentransfers **S**, **T** sowie die Ringspaltung **Q** (s. Abbildung 4.23) nicht in aufeinanderfolgenden Reaktionen ablaufen können. Die Berechnung einer PES mit den drei - den Reaktionen entsprechenden - Reaktionskoordinaten R_S , R_T und R_Q wurde nun derart durchgeführt, dass R_S und R_T in einer Reaktionskoordinate R_{ST} vereinigt wurden ($R_{ST} = d[\text{O}_4:\text{H}_4] - d[\text{N}_1:\text{H}_4] + d[\text{N}_2:\text{H}_3] - d[\text{O}_4:\text{H}_3]$; s. Abbildung 4.24 und Abbildung 4.26). R_Q wuchs weiterhin in 0,05 Å Schritten an, während R_{ST} in Schritten von 0,2 Å vergrößert wurde.

Die Reaktionskoordinate R_{ST} wird durch insgesamt vier Distanzen definiert, die zur Erfüllung des *Restrains* vom System gegeneinander abgeglichen werden können. Das System hat dadurch mehr Freiheiten und der Fortgang der Reaktionen ist nicht eindeutig definiert. Bei Vergrößerung von R_{ST} könnte beispielsweise das starke Anwachsen einer Distanz die Veränderungen der Variablen des *Restrains* erfüllen, ohne dass die *restrained* Reaktionen ablaufen.

Die Freiheiten wurden daher durch spezielle *Restrains* eingegrenzt, um das Berechnen artifizierlicher Strukturen zu verhindern. Die zusätzlichen *Restrains* wurden so definiert, dass die Atomabstände $d[\text{N}_1:\text{H}_4]$ und $d[\text{O}_4:\text{H}_3]$ während einer Geometrieoptimierung nur kleiner, die Abstände $d[\text{O}_4:\text{H}_4]$ und $d[\text{N}_2:\text{H}_3]$ nur grösser werden oder unverändert bleiben konnten (s. Anhang F). Die resultierende äußerst rechenintensive Potenzialhyperfläche ist in Abbildung 4.28 abgebildet.

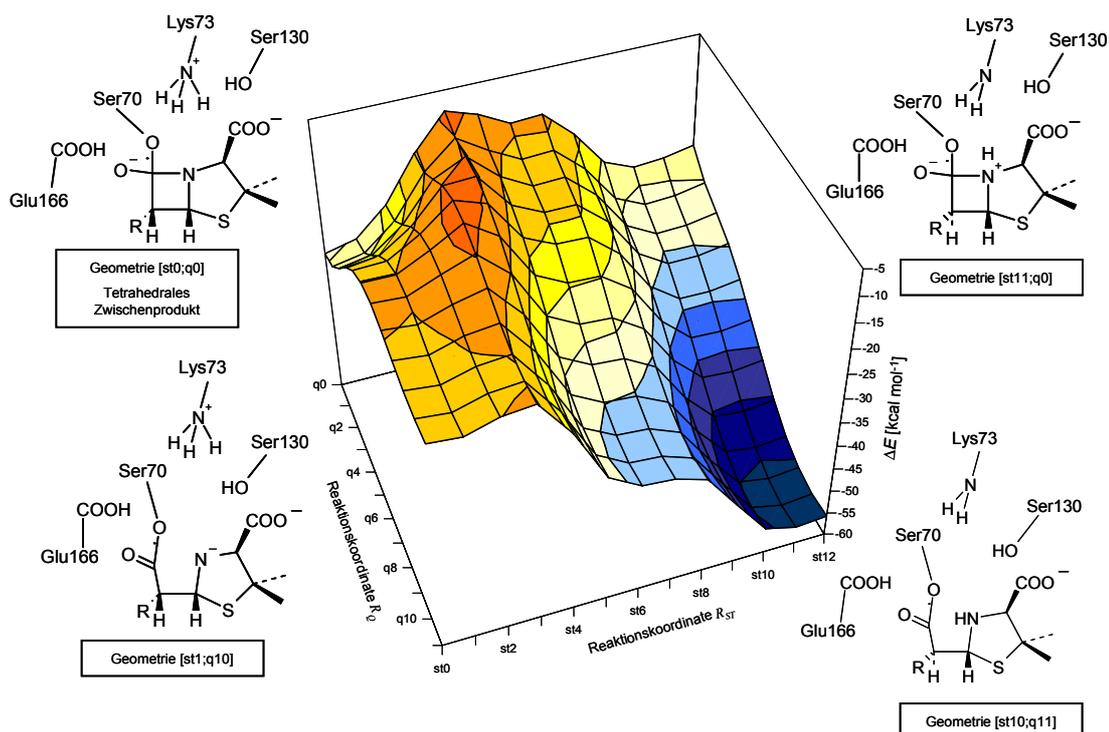


Abbildung 4.28 Potenzialhyperfläche der Reaktionskoordinaten R_{ST} und R_Q

Die Energie des tetrahedralen Zwischenprodukts ist bei [st0;q0] zu finden und entspricht der Ausgangsgeometrie für die Berechnung der PES. Der Weg der niedrigsten Energie führt, wie bereits aus Abbildung 4.27 bekannt, über ein initiales Anwachsen des C-N-Abstandes der sich spaltenden Lactambindung, bevor der Protonentransfer zu dem freiwerdenden Stickstoffatom des Thiazolidinrings einsetzt (**Q**, **S**, s. Abbildung 4.23).

Die gewellte Form der Potenzialfläche entlang der R_{ST} -Achse zeigt, dass die Protonentransfers und die daraus resultierende Energiegewinne nicht gleichmäßig ablaufen. Der Grund hierfür liegt in dem Mechanismus, nachdem die Protonen zwar nicht in einer Reaktion zeitgleich, jedoch auch nicht in zwei aufeinanderfolgenden Reaktionen im Sinne eines sequenziellen Mechanismus transferiert werden. Wie sich auch schon bei der vorangegangenen PES angedeutet hat, setzt die Re protonierung von Ser130 erst gegen Ende der Protonierung des durch die Esterbildung freigewordenen Stickstoffs des Thiazolidinrings ein.

Die Abfolge der beiden Protonentransfers wurde durch die Definition der zugehörigen Reaktionskoordinate R_{ST} in keiner Weise beeinflusst, so dass die ermittelte, leicht versetzte chronologische Abfolge allein aus energetischen

Vorteilen für das System resultiert. Am Ende der drei Reaktionen kann ein stabiles Zwischenprodukt bei dem Energieminimum (Geometrie [st10;q11]) identifiziert werden.

Ein leicht verändertes Bild der Reaktion erhält man durch die B3LYP/6-31G+(d) korrigierte Potenzialfläche (s. Abbildung 4.29). Die von AM1 als zweifelhaftes Energieminimum wiedergegebene Geometrie [st1;q11] stellt sich als Geometrie hohen Energieinhaltes heraus, die in einer ansteigenden Flanke der Potenzialfläche liegt und keinen Charakter eines Minimums besitzt. Es bestätigt sich die von AM1 durch die geringe Barriere der Folgereaktion angedeutete Instabilität dieser Struktur, die mit einem geöffneten, unprotonierten Bicyclus vorliegt.

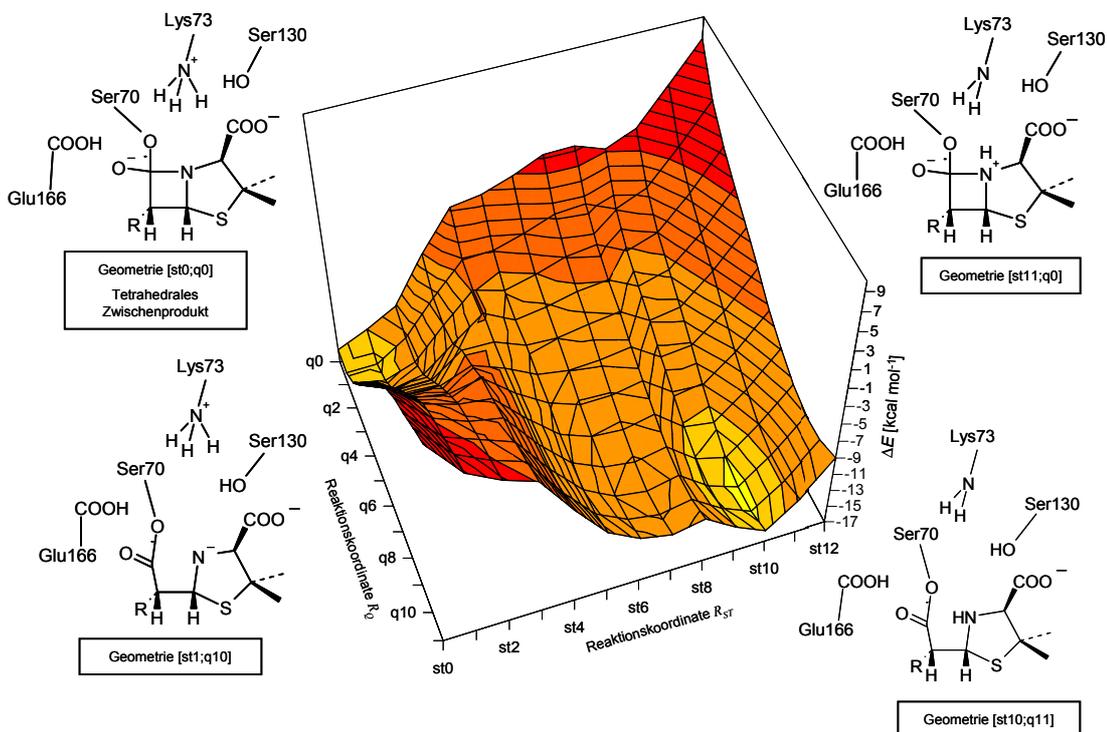


Abbildung 4.29 Potenzialhyperfläche der Reaktionskoordinaten R_{ST} und R_Q (QM-Energien mit B3LYP/6-31+G(d) neu berechnet)

Der entscheidende Unterschied ist allerdings die signifikante Verschiebung des Übergangszustands auf der Potenzialfläche. Der Übergangszustand ist einem konzertierten Reaktionsmechanismus entsprechend auf der PES mehr in die Mitte verschoben. Die Analyse seiner Geometrie ([q4;st3], s. Abbildung 4.30a) dokumentiert den realen, hohen Grad an Konzertiertheit der Protonierung des Stickstoffs und der Reptonierung von Ser130 (Reaktionen **Q**, **S**). AM1 berechnet die Struktur, die von B3LYP als Übergangszustand favorisiert wird, als energetisch ungünstig.

In diesem Übergangszustande beträgt der Abstand der beiden Atome, die die zu spaltende Lactambindung bilden, 1,93 Å ($d[C_1:N_1]$). Das Proton, das den freiwerdenden Stickstoff protoniert (H_4), befindet sich mit 1,34 und 1,22 Å Abstand zwischen dem donierenden Sauerstoff der Hydroxylgruppe von Ser130 (O_4) und dem akzeptierenden Stickstoff des Thiazolidinrings (N_2 ; s. Abbildung 4.30). Das Proton, das von Lys73 zu Ser130 transferiert wird, bildet bereits eine Wasserstoffbrücke zu Ser130 aus, hat aber noch eine ideale Bindungslänge von 1,02 Å.

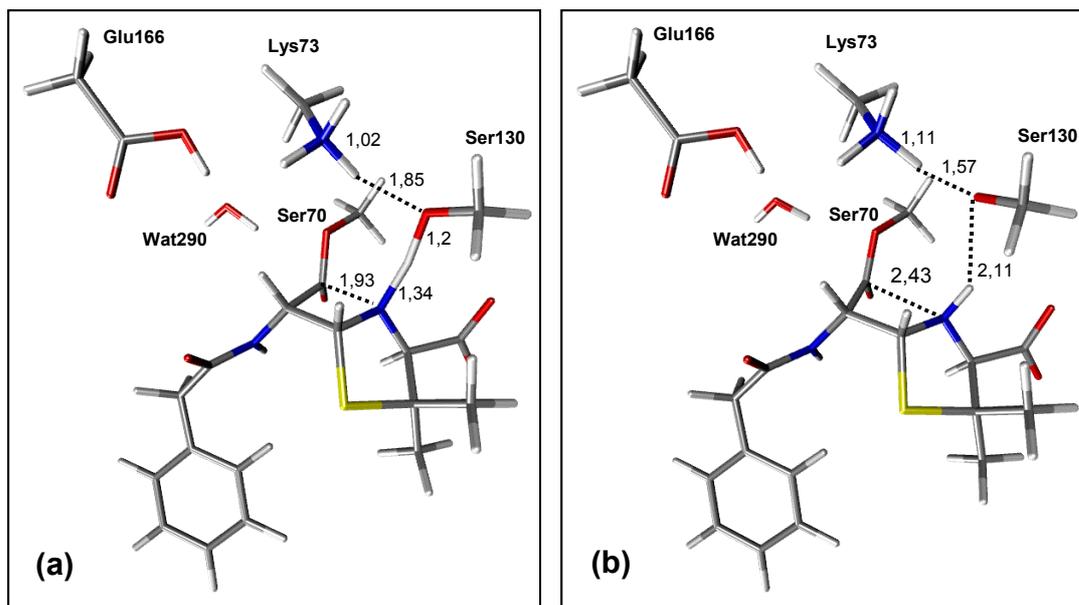


Abbildung 4.30 QM-Atome repräsentativer Strukturen der R_{ST}/R_Q -Potentialhyperfläche (Längenangaben in Å)
 (a) B3LYP-Übergangszustand (Geometrie [q4;st3])
 (b) Geometrie [q9;st7]

Nach dem Übergangszustand wird der erste Protonentransfer (**S**) beendet und der zweite (**T**) setzt ein. Die Welle, die in der reinen AM1-PES zwischen den beiden in R_{ST} *restrainten* Reaktionen das Ende des ersten Transfers kennzeichnete, ist auch in der B3LYP-korrigierten PES noch vorhanden. Hier kann sogar ein sehr kleiner Energieanstieg von $0,5 \text{ kcal mol}^{-1}$ festgestellt werden. Resultierend aus der von B3LYP äußerst stabil berechneten Wasserstoffbrücke, kann diese Barriere und die zugehörige zwischenproduktähnliche Struktur vernachlässigt werden. Der Transfer (**S**) ist bei dieser Struktur (Geometrie [q9;st7], s. Abbildung 4.30b) vollzogen. Der Abstand von $2,43 \text{ Å}$ zwischen den ehemaligen Bindungsatomen der β -Lactambindung kennzeichnet den hier schon vollendeten Bindungsbruch.

In den letzten Schritten wird das Proton von Lys73 vollständig an Ser130 weitergegeben, wobei sich die Distanz zwischen dem Proton und dem Sauerstoffatom der Hydroxylgruppe von Ser130 von $1,5 \text{ Å}$ auf die Bindungslänge von $1,01 \text{ Å}$ verkürzt. Die Struktur des B3LYP-Zwischenprodukts (Geometrie [q9;st10]; s. Abbildung 4.31a) ist sehr ähnlich dem der reinen AM1-Potentialfläche (Geometrie [q10;st11]; s. Abbildung 4.31b). Der Hauptunterschied der beiden Geometrien liegt in der Entfernung des Stickstoffs

der Aminogruppe von Lys73 zum Proton von Ser130. In der von AM1 favorisierten Struktur beträgt die Distanz zwischen den beiden Atomen 2,06 Å, während sie in dem Zwischenprodukt von B3LYP eine erwartungsgemäß kürzere Wasserstoffbrücke von nur 1,76 Å ausbilden.

An der Struktur des Zwischenprodukts lässt sich die Folge der freien AM1-Geometrie-Optimierung des Zwischenprodukts erkennen. Die Wasserstoffbrücke zwischen dem Sauerstoff von Ser130 und Lys73 ist durch den Wegfall der *Restraints* der Reaktionskoordinaten nicht mehr ideal gerichtet. Die Estergeometrien sind in beiden Strukturen identisch. Die Bindung von Ser70 zum Penicillin beträgt jeweils 1,36 Å und hat im Vergleich zum tetrahedralen Zwischenprodukt noch einmal um 0,1 Å abgenommen.

Die Unterschiede der Geometrien von charakteristischen Strukturen müssen hier ebenfalls - wie schon in den vorangegangenen Reaktionsschritten (**X**, **Y**, **Z**) - auf die durch die Methoden unterschiedlich stark berechneten Stabilitäten der Wasserstoffbrücken zurückgeführt werden. Der bei allen Strukturen von st9-st12 zu beobachtende Energienanstieg in der B3LYP-berechneten Potenzialfläche steht ebenfalls im Zusammenhang mit der Vergrößerung der Ausdehnung der entsprechenden Wasserstoffbrücken, die von B3LYP als sehr ungünstig berechnet werden.

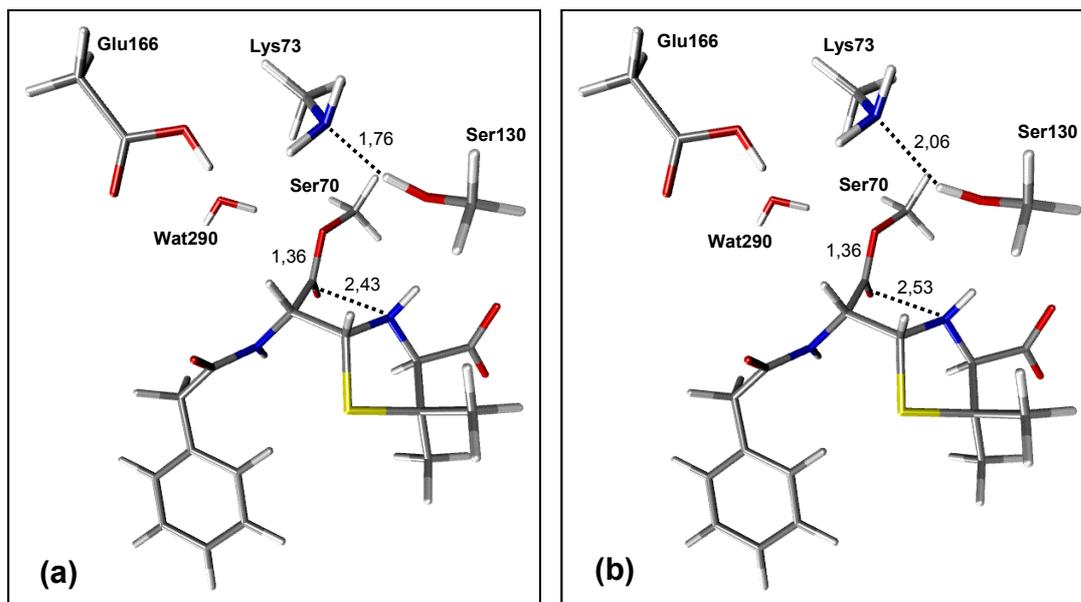


Abbildung 4.31 QM-Atome repräsentativer Strukturen der $R_{ST}R_Q$ -Potentialhyperfläche (Längenangaben in Å)

- (a) B3LYP-Zwischenprodukt
nach den Reaktionen **XYZST** (Geometrie [q9;st10])
- (b) AM1-Zwischenprodukt
nach den Reaktionen **XYZST** (Geometrie [q10;st11])

Die nach der B3LYP-Korrektur erhaltene Barriere für die konzertiert ablaufende Spaltung des Lactamrings und des ersten Protonentransfers beträgt $7,1 \text{ kcal mol}^{-1}$. Die Analyse des Energieverlaufs, der mit reinen AM1-QM/MM-Energien gewonnen wurde, suggeriert dagegen einen partiell sequenziellen Mechanismus. Der entscheidende Schritt wäre dabei der initiale Bruch der Lactambindung, bevor die Protonentransfers einsetzen. Die Barriere läge mit $16,4 \text{ kcal mol}^{-1}$ in einer ähnlichen Größenordnung wie die der geschwindigkeitsbestimmenden Reaktion zur Bildung des tetrahedralen Zwischenprodukts (**X**, **Y**, **Z**).

4.7.2.4 Protonentransfer von Glu166 zu Lys73

Nach der erfolgten Protonierung von Ser130 in den vorangegangenen Reaktionsschritten, befindet sich mit nur $2,9 \text{ Å}$ Abstand das deprotonierte Lys73 in unmittelbarer Nähe zu dem noch protonierten Glu166. Im letzten Reaktionsschritt wird das Proton von Glu166 auf Lys73 übertragen. Ein früherer Einsatz des Protonentransfers zeitgleich mit der Deprotonierung von Ser130, ist durch die räumliche Anordnung der drei beteiligten Aminosäuren nicht möglich. Glu166, Lys73 und Ser130 bilden ehe einer Gerade als ein Dreieck

(s. Abbildung 4.31), so dass die Aminogruppe von Lys73 erst um die $C_\epsilon-N_\epsilon$ -Bindung rotieren muss, bevor das freie Elektronenpaar ein Proton von Glu166 akzeptieren kann. Diese Rotation ist bei Vollendung der Protonierung von Ser130 möglich, so dass intermediär das stabile Zwischenprodukt mit neutraler ϵ -Aminogruppe von Lys73 entsteht.

Die ohne *Restrains* einer Reaktionskoordinate energieminierte Geometrie [q10;st11] aus vorangegangener PES diene als Ausgangsstruktur für die Modellierung des letzten Reaktionsschritts. Für den Protonenübergang wurde eine eindimensionale Reaktionskoordinate R_R ($R_R = d[O_3:H_2] - d[N_2:H_2]$) zur Beschreibung der Reaktion definiert (s. Abbildung 4.32).

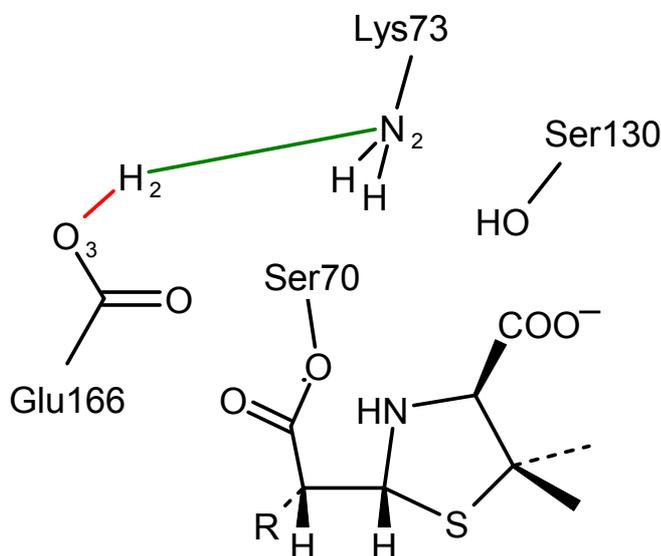


Abbildung 4.32 Definition der R_R - Reaktionskoordinate für den Transfer eines Protons von Glu166 zu Ser130
 Rot - zu brechende Bindung
 Grün - zu bildende Bindung

Die Reaktionskoordinate wurde in 0,2 Å-Schritten vergrößert und die jeweiligen Strukturen danach energieminiert. Anschließend wurde nach Bestimmung der B3LYP-QM-Energien auch hier die zu den erhaltenen Geometrien gehörigen Energien neu berechnet. Sowohl die Energien, die durch ausschließliche Verwendung von AM1 als quantenmechanische Methode berechnet wurden, als auch die mit den B3LYP-QM-Energien zusammengesetzte Werte, sind im Diagramm in Abbildung 4.33 als Funktion von der Reaktionskoordinate R_R aufgetragen.

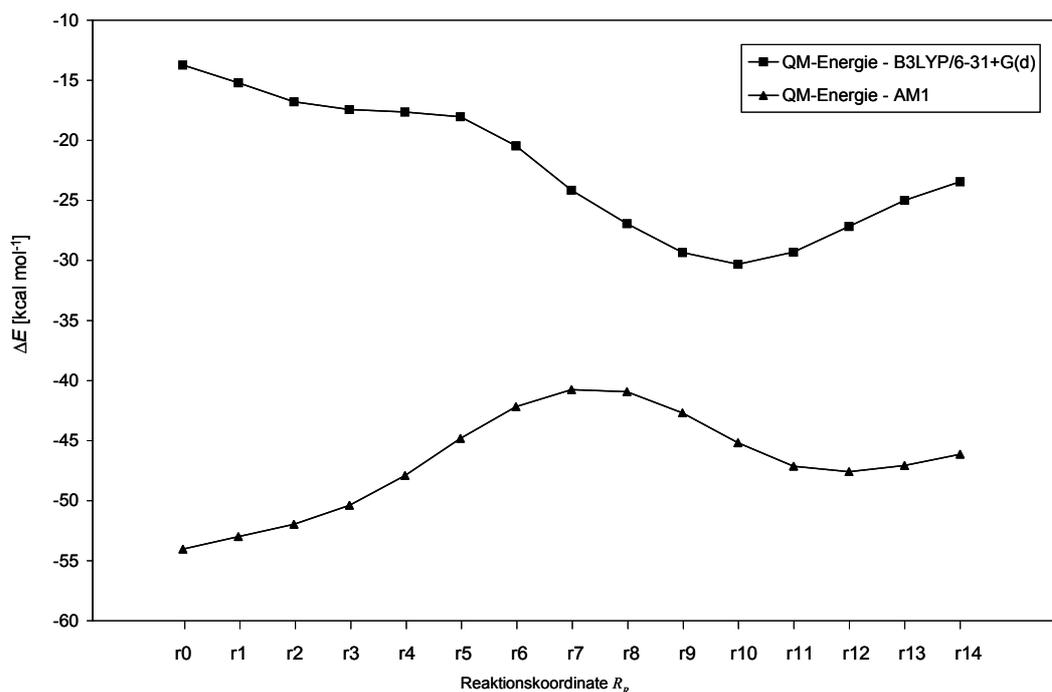


Abbildung 4.33 Potenzialhyperfläche der Reaktionskoordinate R_R

Die beiden Energiekurven unterscheiden sich deutlich in ihren Energiebilanzen. Das AM1-Energieniveau des Acylenzyms (Geometrie [r12]) ist im Vergleich zu der Ausgangsstruktur bei [r0] um $6,5 \text{ kcal mol}^{-1}$ angestiegen, so dass der Anschein erweckt wird es handle sich um einen endothermen Reaktionsschritt.

Die Analyse des B3LYP-Energieverlaufs lässt dagegen auf ein anderes Ergebnis schließen. Die Energie fällt während des Reaktionsverlaufs ab und erreicht bei Geometrie [r10] das Energieminimum des Acylenzyms. Der Energiegewinn von Ausgangsstruktur zu Acylenzym beträgt $16,5 \text{ kcal mol}^{-1}$, so dass die mit B3LYP-korrigierten Energien berechnete Energiebilanz des Reaktionsschritts eindeutig exothermen Charakter hat.

Ein Übergangszustand und der für eine Reaktion typische Verlauf der Energiekurve über das zugehörige Energiemaximum findet sich hier nicht. Trotzdem lässt der uneinheitliche Verlauf der Kurve auf den Ablauf der zugrundeliegenden Reaktion schließen. Die Krümmung der Kurve ändert sich nach Geometrie [r5], die als Sattelpunktsgometrie anzusehen ist und so der Struktur des Übergangszustandes entspricht. Die Geometrien des B3LYP-Zwischenproduktes und des Übergangszustandes entsprechen den durch AM1 bestimmten Geometrien, wenn man die nach der Analyse aller berechneten

Potenzialflächen beobachteten Verschiebungen der B3LYP-Minima und -Maxima zu Geometrien mit kürzeren Wasserstoffbrücken berücksichtigt.

Die Struktur des Übergangszustands zeichnet sich durch die Position des zu übergebenden Protons zwischen Glu166 und Lys73, aus mit denen es jeweils durch eine Wasserstoffbrückenbindung in Kontakt steht. Das Endprodukt des Reaktionsteilschritts und gleichzeitig das Endprodukt der Acylierungsreaktion ist das Acylenzym (s. Abbildung 4.34). Hier hat das Wasser eine zentralere Position zwischen Glu166 und dem noch esterartig am Enzym gebundenen, gespaltenen Benzylpenicillin.

Der Sauerstoff des katalytischen Wassers ist bereits ausgerichtet, um in der folgenden Deacylierung nach Aktivierung durch Glu166, mit dem es bereits eine Wasserstoffbrücke bildet, den Ester nucleophil anzugreifen und zu hydrolysieren, um so das Enzym wieder zu regenerieren (s. Kapitel 1.6.2).

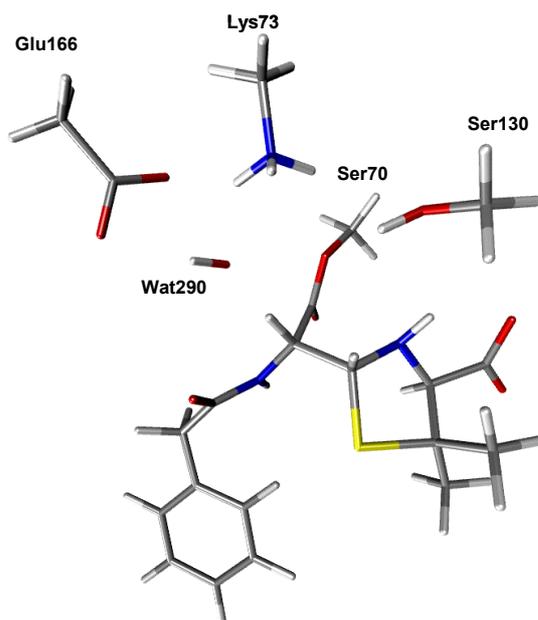


Abbildung 4.34 QM-Atome des Acylenzyms (Geometrie [r12])

Die unterschiedlichen Energiebilanzen dieses Reaktionsschritts von AM1 und B3LYP lassen vermuten, dass AM1 die neutralen Zustände von Lys73 und Glu166 überbewertet und zu stabil berechnet. Um dies zu untersuchen, wurden vergleichende Enthalpieberechnungen durchgeführt.

Die Geometrien der QM-Atome von Lys73 und Glu166 wurden dazu von der Ausgangsstruktur (Geometrie [r0]) und der Struktur des Acylenzyms (Geometrie [r12]) extrahiert und im Vakuum Einzelpunktrechnungen unterworfen. Die erhaltenen Enthalpien für die Protonierung von Methylamin durch Essigsäure sind in Abbildung 4.35 aufgeführt.

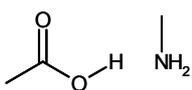
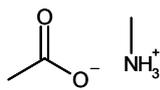
Methode	ΣE_{Edukte} 	$\Sigma E_{\text{Produkte}}$ 	ΔH
B3LYP/ 6-31+G(d)	-203902,57	-203770,92	131,65
AM1	-102,28	42,7	144,98

Abbildung 4.35 Enthalpiewerte [kcal mol^{-1}] für die Protonierung von Methylamin durch Essigsäure im Vakuum

Die Ergebnisse bestätigen den Eindruck aus den Reaktionswegberechnungen. AM1 berechnet die Edukte um ca. 13 kcal mol^{-1} zu stabil im Vergleich zu B3LYP. Im Wesentlichen ist das mit der Berechnung des Methylammoniumions zu begründen. Dieses wird von AM1 sehr energiereich berechnet und führt so relativ zu Methylamin zu einem zu hohen Energieinhalt, der sich auch in der daraus berechneten Enthalpie niederschlägt. Diese Ergebnisse stimmen mit anderen Untersuchungen überein, die ergaben, dass AM1 dazu tendiert, Basizitäten schlecht wiederzugeben [134][135].

4.8 Aminosäuren-Dekompositionsanalyse

Der Einfluss einzelner Aminosäuren auf die Stabilisierung repräsentativer Strukturen der Acylierungsreaktion wurde mit einer Aminosäuren-Dekompositionsanalyse untersucht. Für die Durchführung der Aminosäuren-Dekomposition wurden alle Aminosäuren der zu untersuchenden Struktur in der Reihenfolge ihres Abstandes vom aktiven Zentrum von außen nach innen nacheinander entfernt. Dabei wurde der Abstand vom aktiven Zentrum als die Distanz des zentralen Massepunktes der betreffenden Aminosäure zum Sauerstoff der Ser70-Hydroxylgruppe definiert.

Nach jedem Entfernen einer Aminosäure wurde die Wechselwirkungsenergie zwischen Enzym und Substrat neu berechnet. In der Neuberechnung der Energie haben die gelöschten Aminosäuren keinen Einfluss mehr¹. Der absolute stabilisierende oder destabilisierende Effekt kann direkt an dem entsprechenden Energieanstieg oder -abfall im Vergleich zur vorhergehenden Wechselwirkungsberechnung abgelesen werden.

Für eine aussagekräftigere Analyse wurden die Veränderungen der Wechselwirkungsenergien jeweils relativ zu denen des Michaelis-Menten Komplexes betrachtet, um so die unterschiedlich starke Bedeutsamkeit der entsprechenden Aminosäure für eine Struktur zu erfassen.

Die MM-Energien des Enzyms und Solvents sowie die QM-Energien des Substrats wurden bei diesen Berechnungen nicht berücksichtigt, da sie für den stabilisierenden Effekt des Proteins nicht relevant sind. Die Wechselwirkungsenergien wurden durch Neuberechnung der QM/MM-Energien nach jedem Löschen einer Aminosäure bestimmt, so dass die MM-Energien auf diese Weise nicht einbezogen wurden.

Die QM-Energien der zu vergleichenden Strukturen hingegen wurden durch die Subtraktion der QM/MM-Energie des Michaelis-Menten Komplexes voneinander entfernt. Das ist möglich, weil die Proteinumgebung keinen Einfluss auf die in der QM/MM-Energie enthaltene QM-Energie des Substrats hat (s. Kapitel 3.4.2.2, Gleichung 3.10). Der jeweilige Unterschied der QM-Energien von Michaelis-Menten Komplex und der untersuchten Struktur ist daher bei jeder Wechselwirkungsberechnung konstant und trägt nicht zu dem charakteristischen Ansteigen oder Abfallen der Energie nach Entfernen einer Aminosäure bei.

Die Effekte der Aminosäuren-Seitenketten, die im QM-Teil integriert sind, können allerdings nicht bestimmt werden, so dass sich die für die entsprechenden Aminosäuren angegebenen Werte nur auf die im MM-Teil verbliebenen Atome beziehen.

¹ Alternativ könnten auch sämtliche Parameter der zu untersuchenden Aminosäure auf Null gesetzt werden, um ihren Beitrag zur QM/MM-Energie zu entfernen.

Im Diagramm in Abbildung 4.36 sind die jeweiligen Differenzen der QM/MM-Energien von den zu untersuchenden Strukturen (Übergangszustand, tetrahedrales Zwischenprodukt, Acylenzym) und dem Michaelis-Menten Komplex als eine Funktion vom Abstand der gelöschten Aminosäure zum aktiven Zentrum aufgetragen. Den stabilisierenden Einfluss einer Aminosäure kann man durch den Anstieg der Energie nach dem Entfernen der jeweiligen Aminosäure erkennen, den destabilisierenden Einfluss hingegen durch einen Energieabfall.

Im ersten Diagramm (a) ist die relative Stabilitätsänderung des Übergangszustandes des ersten, für die gesamte Acylierung geschwindigkeitsbestimmenden, Reaktionsschrittes (Geometrie [x7;yz9]; s. Kapitel 4.7.1.3) dargestellt. Das zweite Diagramm zeigt die relative Stabilisierung des tetrahedralen Zwischenprodukts nach Vollendung dieses Reaktionsschrittes (Geometrie [x17;yz19], s. Kapitel 4.7.1.3). Das dritte Diagramm bezieht sich auf die Stabilisierung des Acylenzyms (Geometrie [r12]; s. Kapitel 4.7.2.4) im Vergleich zum Michaelis-Menten Komplex.

Die Diagramme unterscheiden sich deutlich im Ausmaß des stabilisierenden Einflusses der Proteinumgebung auf die einzelnen Geometrien. Am stärksten werden erwartungsgemäß der Übergangszustand und das tetrahedrale Zwischenprodukt stabilisiert. Die Struktur des Acylenzyms zeigt sich dagegen sehr stabil, so dass der Einfluss des Proteins deutlich geringer ist. Aminosäuren, die einen besonders auffälligen Effekt ausüben, sind durch Pfeile gekennzeichnet und werden im Folgenden besprochen.

Für die Interpretation der einzelnen Stabilisationseffekte ist die Kenntnis der Ladungsverteilung des Substrats und der katalytischen Aminosäuren in den verschiedenen Strukturen von entscheidender Bedeutung. Aus diesem Grund wurde von allen untersuchten Strukturen vor der Aminosäuren-Dekomposition eine Ladungsberechnung mit Hilfe einer Mulliken-Populationsanalyse der Atome in der QM-Region durchgeführt [160]. Die Ladungen der entscheidenden Atome sind in Abbildung 4.37 tabellarisch aufgeführt.

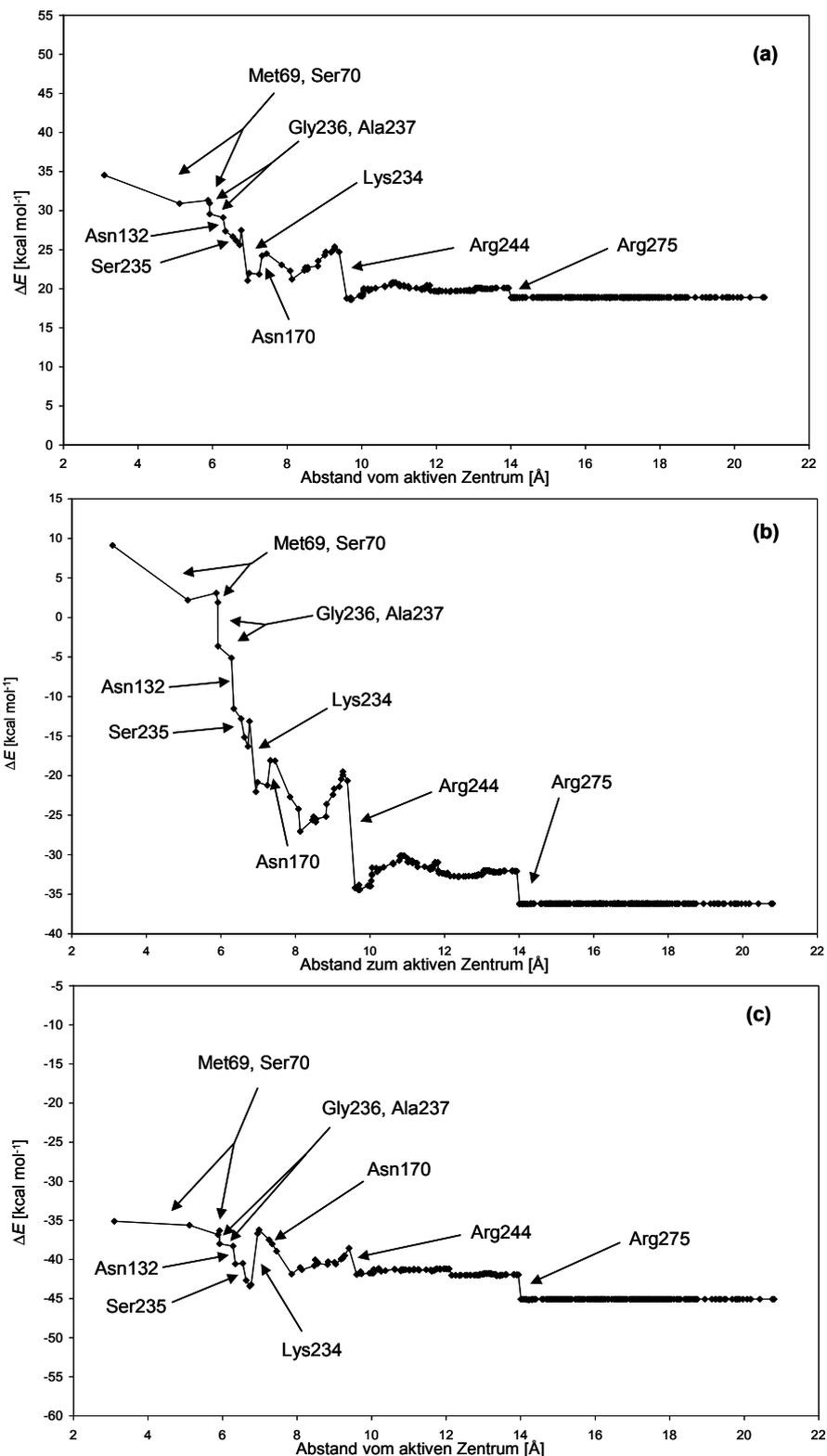
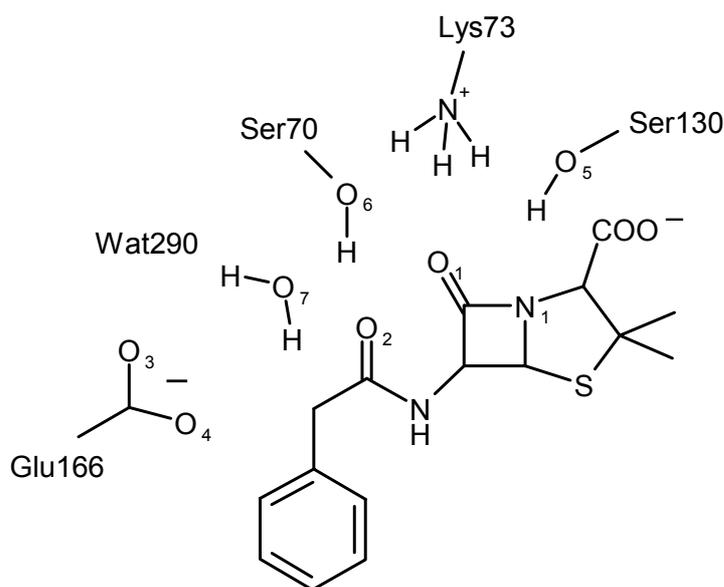


Abbildung 4.36 Aminosäuren-Dekompositionsanalyse

- (a) Übergangszustand (Geometrie [x7;yz9]; s. Kapitel 4.7.1.3)
- (b) tetrahedrales Zwischenprodukt (Geometrie [x17;yz19])
- (c) Acylenzym (Geometrie [r12]; s. Kapitel 4.7.2.4)



Atom	Michaelis-Menten Komplex	Übergangs- zustand	Tetraedrales Zwischenprodukt	Acylenzym
O ₁	-0,39	-0,47	-0,72	-0,47
O ₂	-0,51	-0,54	-0,57	-0,49
O ₃	-0,64	-0,48	-0,33	-0,65
O ₄	-0,67	-0,54	-0,47	-0,68
O ₅	-0,40	-0,42	-0,45	-0,40
O ₆	-0,42	-0,57	-0,39	-0,28
O ₇	-0,55	-0,63	-0,47	-0,50
N ₁	-0,25	-0,26	-0,31	-0,30

Abbildung 4.37 Ladungsverteilung ausgesuchter Atome der QM-Region verschiedener Strukturen

4.8.1 Met69, Ser70, Gly236, Ala237 - Oxyanion Hole

Die vier Aminosäuren Met69, Ser70, Gly236 und Ala237 üben sowohl auf die Struktur des Übergangszustands als auch auf die des tetrahedralen Zwischenprodukts einen stark stabilisierenden Einfluss aus. Die vier Aminosäuren werden zusammen betrachtet, da der stabilisierende Effekt durch Wechselwirkungen hervorgerufen wird, an denen die Atome der zwei durch die Aminosäuren gebildeten Peptidbindungen beteiligt sind.

Die Peptidbindungen liegen an der hinteren Seite des aktiven Zentrums und formen eine elektrophile, positivierte Tasche, das „*Oxyanion Hole*“¹. Das *Oxyanion Hole* ist eine Kavität im aktiven Zentrum, die den β -Lactam-Sauerstoff (O_1) der Carbonylgruppe durch Wasserstoffbrücken bereits bei Bildung des Michaelis-Menten Komplexes koordinativ bindet (s. Kapitel 4.6.1; s. Abbildung 4.38a).

Während des nucleophilen Angriffs kommt es vorübergehend zur Bildung eines tetrahedralen, sp^3 -konfigurierten Carbonylkohlenstoff. Der Sauerstoff ändert dabei seine Ladung, die vom Michaelis-Menten Komplex über den Übergangszustand bis hin zum tetrahedralen Zwischenprodukt zunehmend negativer wird.

Im Acylenzym ist der Kohlenstoff wieder sp^2 -hybridisiert, die Ladung ist jedoch der des Übergangszustands vergleichbar und deutlich negativer als im Michaelis-Menten Komplex. Der Ladungsunterschied beruht auf den unterschiedlichen Arten von Carbonylgruppen, denen der Sauerstoff in den verschiedenen Strukturen zugehörig ist. Der Sauerstoff des im Acylenzym entstandenen Esters liegt durch Resonanz gegenüber dem ketonähnlichen Sauerstoff des intakten β -Lactams des Michaelis-Menten Komplex negativiert vor (s. Kapitel 1.4.2).

Das *Oxyanion Hole* stabilisiert diese negative Ladung des Sauerstoffs durch starke Wasserstoffbrückenbindungen mit den Wasserstoffatomen der peptidischen *Backbone*-Stickstoffe. Der stabilisierende Effekt ist entsprechend der Ladung des Sauerstoffs im tetrahedralen Zwischenprodukt (s. Abbildung 4.38c) mit insgesamt $15,2 \text{ kcal mol}^{-1}$ größer als im Übergangszustand ($5,9 \text{ kcal mol}^{-1}$; s. Abbildung 4.38b) und im Acylenzym (2 kcal mol^{-1} ; s. Abbildung 4.38d).

Das Ausmaß der Stabilisierung der verschiedenen Strukturen lässt sich außer an der Korrelation mit der Ladung des Sauerstoffatoms auch an der damit verbundenen Zunahme der Bindungsstärke der Wasserstoffbrücken ablesen. Als Maß für die Bindungsstärke können die Längenänderungen der Wasserstoffbrückenbindungen herangezogen werden. Im Michaelis-Menten Komplex sind diese noch $1,94$ bzw. $2,01 \text{ \AA}$ lang, verkürzen sich aber bereits im

¹ Der Begriff „*Oxyanion Hole*“ (*Oxyanion*-Loch) ist von den Serin-Proteasen entlehnt worden, bei denen das während der Peptidspaltung auftretende *Oxyanion* durch eine ähnliche Tasche stabilisiert wird.

Übergangszustand zu 1,85 und 1,99 Å. Im tetrahedralen Zwischenprodukt betragen die Distanzen zwischen den Protonen und dem Sauerstoff nur noch 1,79 und 1,9 Å, während sie im Acylenzym wieder zu 1,94 und 1,87 Å angewachsen sind.

Im **tetrahedralen Zwischenprodukt** ist der Sauerstoff durch die Wasserstoffbrücken am stärksten gebunden. Der Sauerstoff trägt die größte negative Ladung (sogar stärker negativ als der Sauerstoff einer Carboxylatgruppe), so dass der Stabilitätsverlust für die Struktur dementsprechend am gravierendsten ist, wenn die Aminosäuren des *Oxyanion Holes* entfernt werden.

Die geringere Auswirkung auf die Stabilität des **Übergangszustands** lässt sich mit dem erst im Beginn befindlichen nucleophilen Angriff auf das β -Lactam erklären. Die negative Ladung des Sauerstoffs hat noch nicht so stark zugenommen und die Längen der Wasserstoffbrückenbindungen haben auch noch nicht so stark abgenommen wie im tetrahedralen Zwischenprodukt. Der Beitrag zum Energiegewinn bei Bildung der Wasserstoffbrücken ist daher im Vergleich zum tetrahedralen Zwischenprodukt entsprechend geringer, zum Michaelis-Menten Komplex jedoch deutlich größer.

Obwohl es sich bei dem **Acylenzym** und dem Michaelis-Menten Komplex um Geometrien eines sp^2 -hybridisierten Kohlenstoffs handelt, sind die Bindungslängen der Wasserstoffbrücken im Acylenzym denen des Übergangszustands vergleichbar und deutlich kürzer als im Michaelis-Menten Komplex. Die Carbonylgruppe des Acylenzyms gehört zu einem Ester (s.o.) und der Sauerstoff ist dementsprechend negativer geladen und wird durch festere Wasserstoffbrücken stabilisiert¹. Das *Oxyanion Hole* ist daher für die Stabilität des Acylenzyms wichtiger als für die des Michaelis-Menten Komplexes.

Der Vergleich der beiden Wasserstoffbrücken zeigt, dass bei jeder Struktur eine stärkere Zunahme der Energie bei Entfernen der Aminosäuren Met69 und Ser70 zu beobachten ist als bei Entfernen der Aminosäuren Gly236 und Ala237. Der Grund dafür ist jedoch nicht nur in der höheren Priorität der

¹ Der Sauerstoff der Carbonylgruppe eines Acetessigesters hat beispielsweise eine Ladung von $-0,481$; während der von Aceton nur eine Ladung von $-0,405$ besitzt (B3LYP-Ladungen).

Wasserstoffbrücke von Ser70 zum Sauerstoff zu sehen, sondern resultiert auch aus der Berechnungsmethode. Sowohl Gly236 als auch Ala237 sind vom aktiven Zentrum weiter entfernt als Met69 und Ser70 und werden dementsprechend auch vorher gelöscht. Kann die Stabilisierung des Sauerstoffs nach dem Entfernen der Aminosäure, die die erste Wasserstoffbrücke zum Sauerstoff formt (Ala237), noch teilweise durch die übriggebliebene Wasserstoffbrücke kompensiert werden, so ist ein stabilisierender Effekt nach dem Löschen von Met69 und Ser70 ganz verschwunden und der Energieanstieg fällt dementsprechend höher aus.

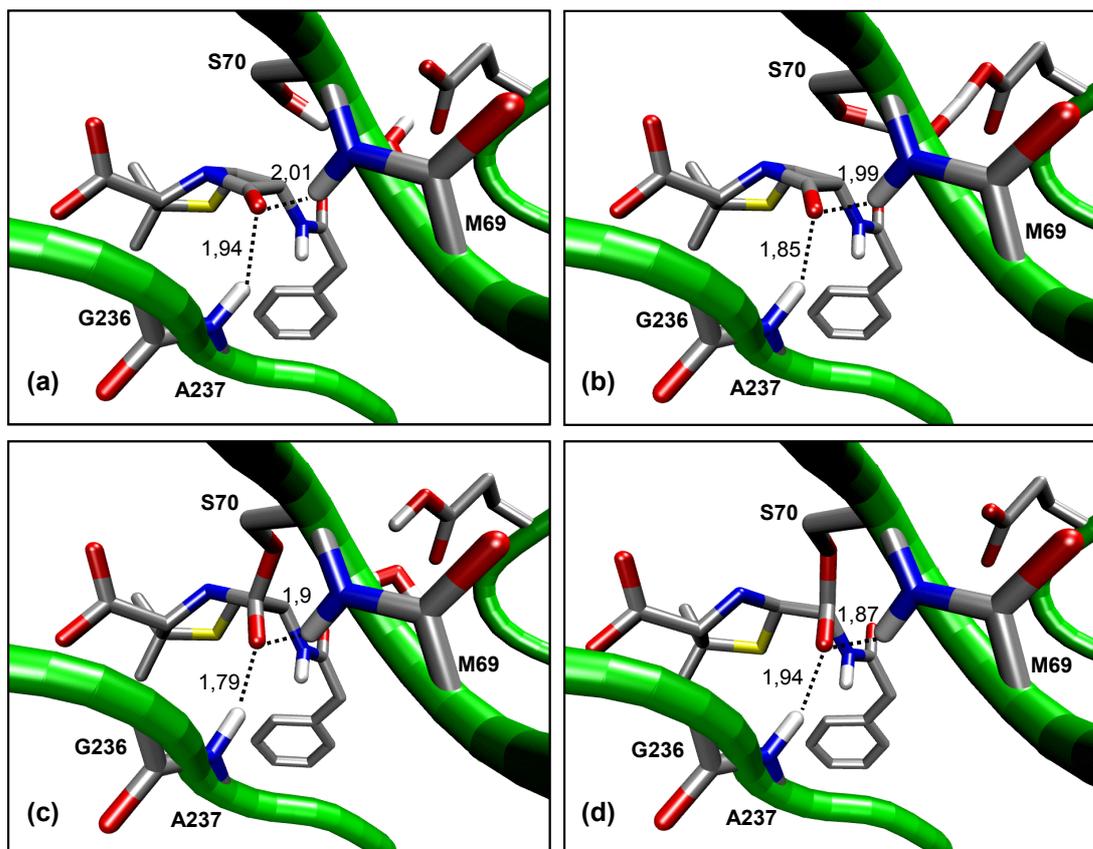


Abbildung 4.38 Wasserstoffbrücken des *Oxyanion Holes*; (Distanzangaben in Å)

- (a) Michaelis-Menten Komplex
- (b) Übergangszustand
- (c) Tetrahedrales Zwischenprodukt
- (d) Acylenzym

4.8.2 Asn132

Die konservierte Aminosäure Asparagin 132 hat auf alle untersuchten Strukturen relativ zum Michaelis-Menten Komplex einen ausgeprägt stabilisierenden Einfluss, der bei dem tetrahedralen Zwischenprodukt mit $6,4 \text{ kcal mol}^{-1}$ am größten ist. Der Übergangszustand und das Acylenzym werden mit $1,8$ und $2,3 \text{ kcal mol}^{-1}$ in einer vergleichbaren Stärke durch Asn132 stabilisiert.

Eine wichtige Aufgabe des Asparagins ist die Immobilisierung der Seitenkette des Penicillins. Diese wird durch eine über die ganze Reaktion existente Wasserstoffbrücke zwischen einem der amidischen Wasserstoffatome und dem peptidischen Sauerstoff (O_2) der Seitenkette gewährleistet (s. Kapitel 4.6.1;

s. Abbildung 4.39a-d). Diese Wechselwirkung bleibt in allen Strukturen nahezu unverändert erhalten. Erkennbar ist das an den mit 2,04 bis 2,15 Å ungefähr gleichbleibenden Längen der Wasserstoffbrücke in allen Strukturen und der konstanten Ladung des beteiligten Sauerstoffatoms aus der QM-Region.

Für die Bildung des Michaelis-Menten Komplexes und die Positionierung im aktiven Zentrum ist diese Wasserstoffbrücke essenziell, die Ursache für die unterschiedlich stark stabilisierenden Auswirkungen von Asn132 kann sie jedoch nicht sein. Verantwortlich für die Energieunterschiede ist die Interaktion von Asn132 mit Lys73 und die damit einhergehende Stabilisierung der positiven Ladung des Lysins. In allen Strukturen bildet der Sauerstoff der amidischen Seitenkette des Asn132 mit Lys73 eine Wasserstoffbrücke.

Im **Michaelis-Menten Komplex** liegt diese Wasserstoffbrücke in gegabelter Form vor, wobei der andere Akzeptor des Wasserstoffs von Lys73 ein Sauerstoffatom der Carboxylatgruppe (O_3) von Glu166 ist, so dass diese Wechselwirkung Salzbrückencharakter hat (s. Abbildung 4.39a). Darüber hinaus bildet die ϵ -Aminogruppe von Lys73 eine weitere gegabelte Wasserstoffbrücke mit den Sauerstoffen der Hydroxylgruppen von Ser70 und Ser130. Die positive Ladung von Lys73 wird jedoch vorwiegend durch die Salzbrücke zu Glu166 stabilisiert. Die Länge der Wasserstoffbrücke zu Asn132 beträgt 1,9 Å, die der Salzbrücke zu Glu166 2,09 Å.

Im **Übergangszustand** ist das Proton der Ser70 Hydroxylgruppe auf halber Distanz zur Carboxylatgruppe von Glu166 übergegangen (s. Abbildung 4.39b). Die negative Ladung des akzeptierenden Sauerstoffatoms (O_3) wird dabei durch die einsetzende Protonierung geringer. Als Folge davon lockert sich die Brücke von Glu166 zu Lys73 und die Länge nimmt auf 2,46 Å zu. Die stabilisierende Wirkung von Glu166 auf die positive Ladung von Lys73 wird dadurch kleiner. Asn132 dagegen gewinnt an Bedeutung für die Stabilisierung des Übergangszustands durch die sich auf eine Länge von 1,78 Å verminderte Wasserstoffbrücke.

Dieser Effekt ist im **tetraedralen Zwischenprodukt** noch stärker ausgeprägt (s. Abbildung 4.39c). Als Folge der hier vollständig protoniert vorliegenden Carboxylatgruppe von Glu166 hat die Ladung an dem protonierten Sauerstoff

(O₃) stark abgenommen. Das Glutamat kann so keinen Beitrag mehr zur Stabilisation der positiven Ladung von Lys73 leisten. Der Abstand des Wasserstoffs und des Sauerstoffs der ehemaligen Salzbrücke ist auf seine maximale Länge von 2,74 Å angewachsen, während die Wasserstoffbrücke zu Asn132 nur noch eine Distanz zwischen den beteiligten Atomen von 1,7 Å überspannt. Die Wasserstoffbrücke hat damit ihre geringste Länge erreicht, der stabilisierende Effekt von Asn132 ist dementsprechend am größten für die Geometrie des tetrahedralen Zwischenprodukts.

Im **Acylenzym** bildet sich ebenfalls eine feste Wasserstoffbrücke von Asn132 zu Lys73 aus, die mit einer Länge von 1,8 Å kürzer als die im Michaelis-Menten Komplex ist, obwohl die Carboxylatgruppe von Glu166 auch hier in deprotonierter, negativer Form vorliegt (s. Abbildung 4.39d). Beide Sauerstoffe der Carboxylatgruppe (O₃, O₄) tragen wieder eine vergleichbare negative Ladung wie im Michaelis-Menten Komplex. Die ebenfalls mögliche Salzbrücke hat mit 2,2 Å zwischen Glu166 und Lys73 eine ähnliche Ausdehnung. Trotzdem ist der berechnete Energiezuwachs beim Acylenzym nach Entfernen von Asn132 um 1,8 kcal mol⁻¹ größer als beim Michaelis-Menten Komplex.

Während der Bildung des Acylenzyms kommt es zu einer Veränderung des Wasserstoffbrückenbindungsmusters auf der anderen Seite von Lys73, das es mit den Sauerstoffen der Hydroxylgruppen von den Aminosäuren Ser130 und Ser70 (O₅, O₆) bildet. In allen bisher betrachteten Strukturen blieben die gegabelten Wasserstoffbrücken, die mit den Sauerstoffatomen der Seitenketten dieser Aminosäuren geformt werden, erhalten.

Im Acylenzym dagegen nimmt die Aminogruppe von Lys73 eine leicht veränderte Position ein, in der das Wasserstoffatom nicht mehr zwischen den beiden Serin-Sauerstoffatomen platziert ist, sondern nur noch zu Ser70 eine Distanz hat, um ein Wasserstoffbrücke zu bilden. Diese Veränderung beruht auf einer Rotation der Aminogruppe um ca. 17°, bei der die Wasserstoffbrücke zum Sauerstoff von Ser130 (O₅) verloren geht und der Abstand der ursprünglich die Brücke formenden Atome auf 3,38 Å anwächst.

Nach der Drehung bildet sich eine neue, gegabelte Wasserstoffbrücke mit den Sauerstoffen von Ser70 (O₆) und dem katalytischen Wasser (O₇) aus, das in der folgenden (nicht modellierten) Deacylierungsreaktion deprotoniert wird, um den Enzym-Penicillinester zu hydrolysieren (s. Kapitel 1.6.2).

Die maßgebliche Veränderung ist jedoch nicht der Austausch des Akzeptors der Wasserstoffbrücke von Ser130 gegen Wat290, sondern die Abnahme der Bindungsstärke der Wasserstoffbrücke zu Ser70. Diese Abnahme steht im Zusammenhang mit der Ladungsänderung des Sauerstoffs von Ser70. Handelt es sich im Michaelis-Menten Komplex bei dem beteiligten Sauerstoffatom noch um den Sauerstoff einer Hydroxylgruppe, so ist es im Acylenzym ein Estersauerstoff, dessen Ladung durch die resonanzbedingte Verteilung der freien π -Elektronen deutlich vermindert ist. Als Konsequenz davon kann das positiv geladene Lys73 durch die resultierende schwächere Brücke zu Ser70 schlechter stabilisiert werden und die Interaktion mit Asn132 gewinnt so für die Stabilität der Struktur des Acylenzyms an Bedeutung.

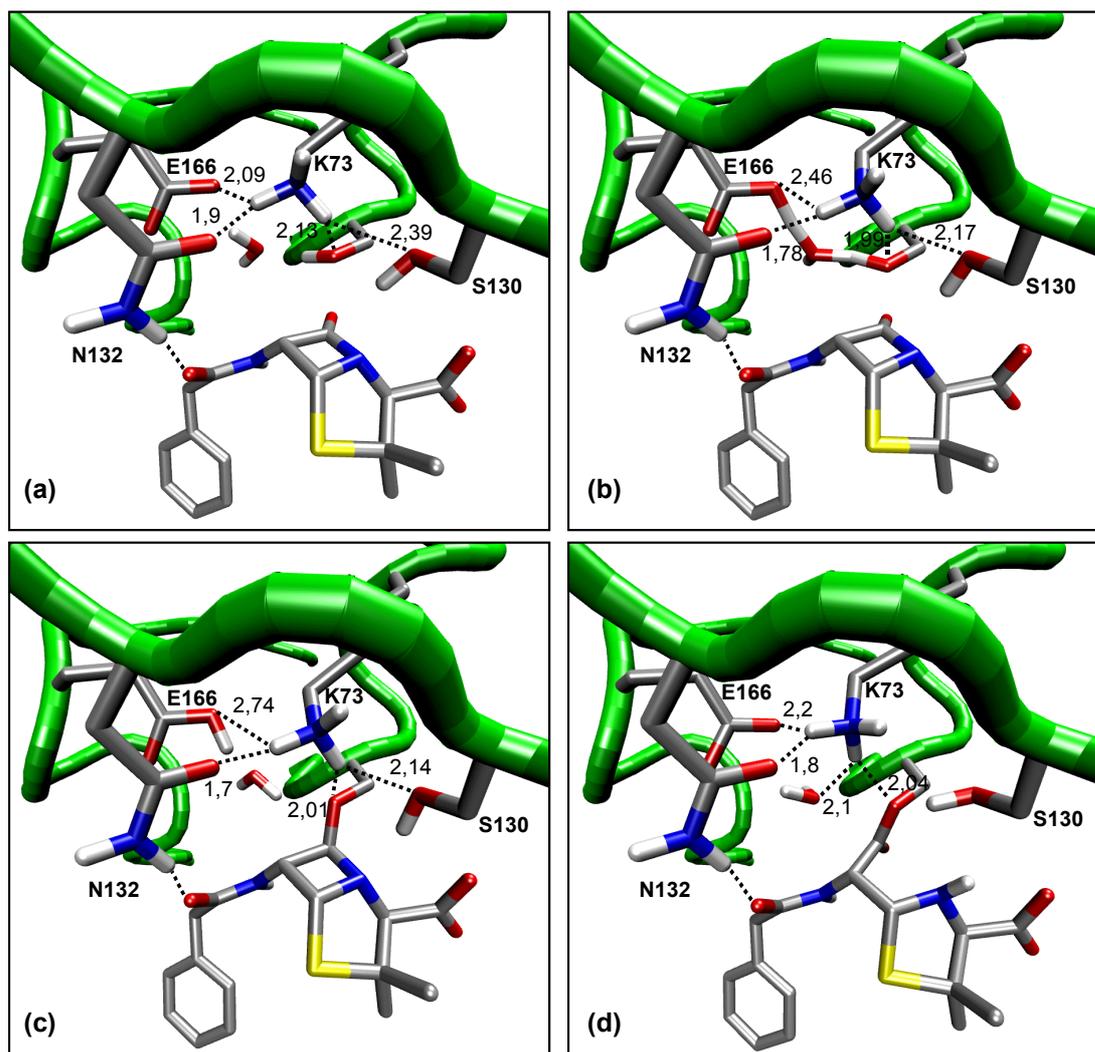


Abbildung 4.39 Stabilisierung von Lys73 durch Asn132 (Distanzangaben in Å)

- (a) Michaelis-Menten Komplex
- (b) Übergangszustand
- (c) Tetrahedrales Zwischenprodukt
- (d) Acylenzym

4.8.3 Asn170

Asparagin 170 fällt in der Dekompositionsanalyse dadurch auf, dass es sich auf den Michaelis-Menten Komplex und das Acylenzym deutlich stabilisierender auswirkt als auf den Übergangszustand und das tetrahedrale Zwischenprodukt. Der Einfluss von Asn170 ist für den Michaelis-Menten Komplex im Vergleich zu dem Übergangszustand um $2,4 \text{ kcal mol}^{-1}$ und zu dem tetrahedralen Zwischenprodukt um $3,2 \text{ kcal mol}^{-1}$ energetisch günstiger. Das Acylenzym

profitiert dagegen von Asn170 gegenüber dem Michaelis-Menten Komplex mit $0,6 \text{ kcal mol}^{-1}$ sogar noch etwas mehr.

Das konservierte Asparagin 170 ist wie Glu166 Bestandteil des Ω -Loops von Klasse A β -Lactamasen. Es erfüllt zwei wichtige Aufgaben während der Katalyse.

- Bei Bildung des Michaelis-Menten Komplexes sorgt es für eine ideale Ausrichtung des Wassermoleküls für die bevorstehenden Protonentransfers durch Bildung einer Wasserstoffbrücke des amidischen Carbonylsauerstoffs der Seitenkette mit dem Proton von Wat290 (s. Abbildung 4.40a). Das beteiligte Proton des Wassers ist das, welches während der gesamten Acylierungsreaktion am Sauerstoff des Wassermoleküls gebunden bleibt.
- Die andere beruht auf der Interaktion des nicht als Protonenakzeptor an der Acylierung beteiligten Sauerstoffs der Carboxylatgruppe von Glu166 (O_4) mit einem Amidwasserstoff von Asn170. Diese Wasserstoffbrücke ist verantwortlich für die Stabilisierung und Ausrichtung von Glu166 im aktiven Zentrum, die für dessen Funktion als *General Base* sehr wichtig ist. Beide Wasserstoffbrücken bleiben über alle Reaktionsschritte erhalten, auch wenn sich ihre Bindungsstärken ändern, was auch die unterschiedlichen Auswirkungen von Asn170 auf die einzelnen Strukturen erklärt.

Die beschriebenen Wasserstoffbrücken sind in allen Strukturen essenziell. Es überwiegt allerdings aufgrund des ionischen Anteils der Energiegewinn durch Bildung der Wasserstoffbrücke zu Glu166 den der Wasserstoffbrücke zu Wat290. Der ionische Anteil dieser Wasserstoffbrücke ändert sich jedoch im Laufe der Reaktion.

Das akzeptierende Sauerstoffatom von Glu166 (O_4) der **Wasserstoffbrücke zwischen Asn170 und Glu166** ist in Folge der fortschreitenden Protonierung des Glutamats an O_3 bereits im Übergangszustand deutlich weniger geladen. Mit abnehmender Ladung des Sauerstoffs nimmt die Bindungslänge der zugehörigen Wasserstoffbrücke von 1,89 auf 1,94 Å zu (s. Abbildung 4.40b).

Im tetrahedralen Zwischenprodukt ist Glu166 vollständig protoniert, der Sauerstoff am wenigsten geladen und die Wasserstoffbrücke zu Glu166 mit 2,04 Å am längsten (s. Abbildung 4.40c). Im Acylenzym liegt Glu166 wieder

deprotoniert vor und das Sauerstoffatom ist wieder ähnlich negativ geladen wie im Michaelis-Menten Komplex (s. Abbildung 4.40d). Die Länge der Wasserstoffbrücke hat sich folgerichtig wieder auf 1,88 Å vermindert und dokumentiert so den - auch am Energiegewinn ablesbaren Zuwachs - des stabilisierenden Einflusses von Asn170.

Die Stärke der Wasserstoffbrücke hängt entscheidend von der Ladung der beteiligten Atome ab, so dass es verständlich ist, dass die beiden Strukturen, die ein weniger stark geladenes Glu166 im aktiven Zentrum besitzen, von der Wasserstoffbrücke zwischen Asn170 und Glu166 auch weniger profitieren.

Die Bindungslänge der **Wasserstoffbrücke zum Wassermolekül** ist aufgrund der zentralen Funktion von Wat290 während der Reaktion mehr von den erforderlichen Positionen des Wassers im entsprechenden Reaktionsschritt abhängig als von den Ladungsverhältnissen der beteiligten Atome. Die Ausdehnung der Wasserstoffbrücke ist so im Übergangszustand mit 2,1 Å größer als in den anderen Strukturen, obwohl sie hier am wichtigsten ist, da sie den partiell mit drei Wasserstoffen verbundenen Sauerstoff des Wassermoleküls stabilisiert. Die energetischen Auswirkungen des Verlusts dieser Wasserstoffbrücke im Übergangszustand durch die Aminosäuren-Dekomposition können jedoch nicht eindeutig abgelesen werden.

Der relative Energieverlust vom Übergangszustand zum Michaelis-Menten Komplex ist durch die Ladungsverminderung der ionischen Ladung an O₄ und der damit zusammenhängenden Abschwächung der zugehörigen Wasserstoffbrücke dominierend und überdeckt einen potenziellen Energiegewinn durch die Wasserstoffbrücke zum Wassermolekül. Bei Bildung des tetrahedralen Zwischenprodukts fällt allerdings auf, dass im Vergleich zum Übergangszustand der um 0,8 kcal mol⁻¹ zunehmende Energieverlust relativ groß im Verhältnis zur Abnahme der Ladung an O₄ ist. Der Energieverlust kann daher nicht ausschließlich von der geringeren Bindungsstärke der Wasserstoffbrücke von Asn170 zu Glu166 im Zwischenprodukt herrühren, sondern muss zusätzlich in der Abnahme der Wichtigkeit der Wasserstoffbrücke von Asn170 zu Wat290 begründet sein.

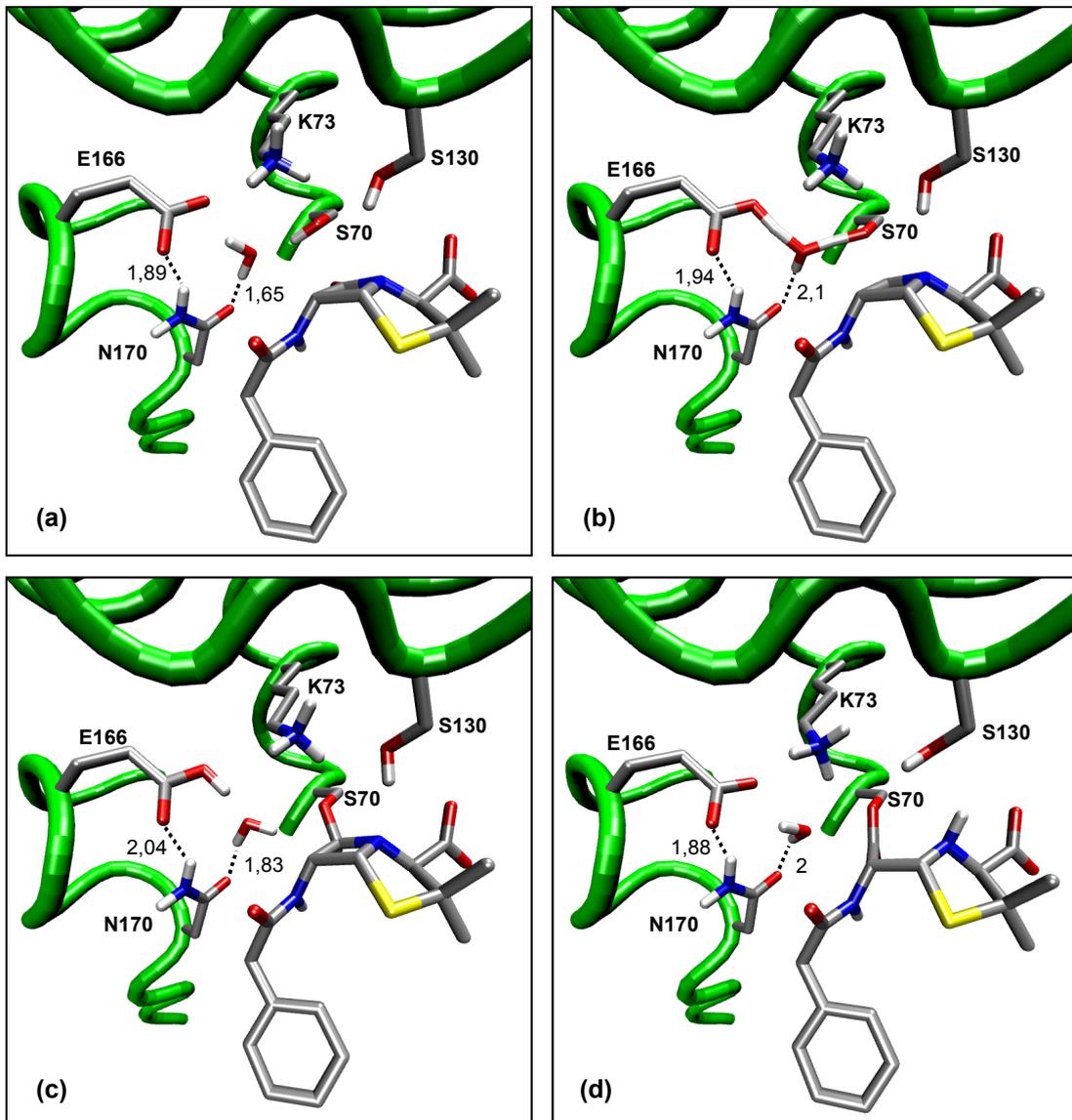


Abbildung 4.40 Wasserstoffbrücken von Asn170, (Distanzangaben in Å)

- (a) Michaelis-Menten Komplex
- (b) Übergangszustand
- (c) Tetrahedrales Zwischenprodukt
- (d) Acylenzym

4.8.4 Lys234, Ser235, Arg244 und Arg275

Die Bedeutung von elektrostatischen Wechselwirkungen für die QM/MM-Energie überwiegt bei Weitem die der van der Waals Interaktionsenergien. Einige der auffälligsten Veränderungen der Wechselwirkungsenergien bei der Dekompositionsanalyse wurden demnach beim Entfernen von geladenen

Aminosäuren beobachtet. Besonders auffällig sind dabei drei positiv geladene Aminosäuren, die aus den gleichen Gründen für das Zwischenprodukt und den Übergangszustand, aber auch für das Acylenzym von Bedeutung sind und deshalb gemeinsam vorgestellt werden. Ser235 ist zwar ungeladen, hat aber einen synergistischen Effekt auf die verschiedenen Strukturen und wird daher in die Analyse von Lys234, Arg244 und Arg275 mit eingeschlossen.

Alle vier Aminosäuren liegen auf der gleichen Seite des aktiven Zentrums, wobei Lys234, Arg244 und Ser235 die Bindungstasche für die Carboxylatseitenkette des Penicillins formen (vgl. Kapitel 1.6.1.1 und Kapitel 4.6.1; s. Abbildung 4.42). Außer Lys234, das relativ zum Michaelis-Menten Komplex für das Acylenzym weniger wichtig ist, wirken die Aminosäuren auf alle untersuchten Strukturen stark stabilisierend. Der aufaddierte, energetische Effekt von Arg234, Ser235 und Arg244 ist beim tetrahedralen Zwischenprodukt am größten und beläuft sich auf 20 kcal mol^{-1} . Bei dem Übergangszustand und dem Acylenzym liegt er mit $7,7$ und $8,7 \text{ kcal mol}^{-1}$ deutlich niedriger.

Das Auftreten dieser Effekte beruht auf den komplexen, elektronischen Veränderungen innerhalb der quantenmechanisch betrachteten Atome während der Acylierungsreaktion. Die Abstraktion des Protons von Ser70 führt zu einer Verschiebung der negativen Ladung von Glu166 in Richtung des Ser70. Im Übergangszustand ist das bereits an der Verminderung der Ladung der Carboxylatsauerstoffe von Glu166 (O_3 , O_4) und der Zunahme an negativer Ladung der Sauerstoffe des katalytischen Wassers (O_7), der Hydroxylgruppe von Ser70 (O_6) und der β -Lactamcarbonylgruppe (O_1), zu erkennen.

Im tetrahedralen Zwischenprodukt ist die Ladung noch weiter verschoben, so dass das am weitesten entfernte Atom von Glu166, nämlich der Sauerstoff des β -Lactams, den größten Teil der negativen Ladung übernommen hat. Die Wanderungsrichtung der Ladung von Glu166 weist genau auf die entgegengesetzte Seite des aktiven Zentrums, wo Lys234, Arg244 und Arg275 positioniert sind. Im Acylenzym ist die negative Ladung zu Glu166 zurückgekehrt, das dann wieder vergleichbare Ladungen wie im Michaelis-Menten Komplex trägt.

Die Änderung der Ladungsverteilung der einzelnen Strukturen kann außer an den Ladungsdaten der einzelnen Atome (s. Ladungstabelle, Abbildung 4.37)

auch anhand von GRID-Interaktionsfeldern verfolgt werden. Das Programm GRID [161]-[164] legt das zu untersuchende Molekül in einen Gitterkäfig und berechnet an jedem Gitterpunkt mit einer vorher festzulegenden GRID-Sonde eine Wechselwirkungsenergie mit dem Molekül. Die Wechselwirkungsenergien setzen sich aus einem dominierenden elektrostatischen, einem van der Waals- und einem Wasserstoffbrücken-Energieterm zusammen. Die berechneten Interaktionsenergien lassen sich in attraktive Wechselwirkungen mit einem negativen Energiewert und repulsive Wechselwirkungen mit einem positiven Energiewert unterscheiden. Die Interaktionsenergien können als Isokonturflächen angezeigt werden, so dass sie in Form von Feldern analysiert werden können.

Zur Untersuchung der Ladungsverschiebung wurden von jeder der vier verglichenen Strukturen die Atome der gesamten QM-Region in einen GRID-Käfig eingeführt und durch die „N3+“-Sonde, die eine positiv geladene Aminofunktion simuliert, abgetastet. Das Anwachsen oder Abnehmen von negativer Ladung kann so indirekt durch Veränderung der dadurch hervorgerufenen zugehörigen Wechselwirkungsfelder verfolgt werden.

Die in Abbildung 4.41 dargestellten Felder wurden bei einem Energiewert von $-5,9 \text{ kcal mol}^{-1}$ konturiert. Die Felder dokumentieren die elektronischen Veränderungen der an der Reaktion beteiligten Atome, die bereits durch die berechneten, unterschiedlichen Ladungsverteilungen erkennbar waren.

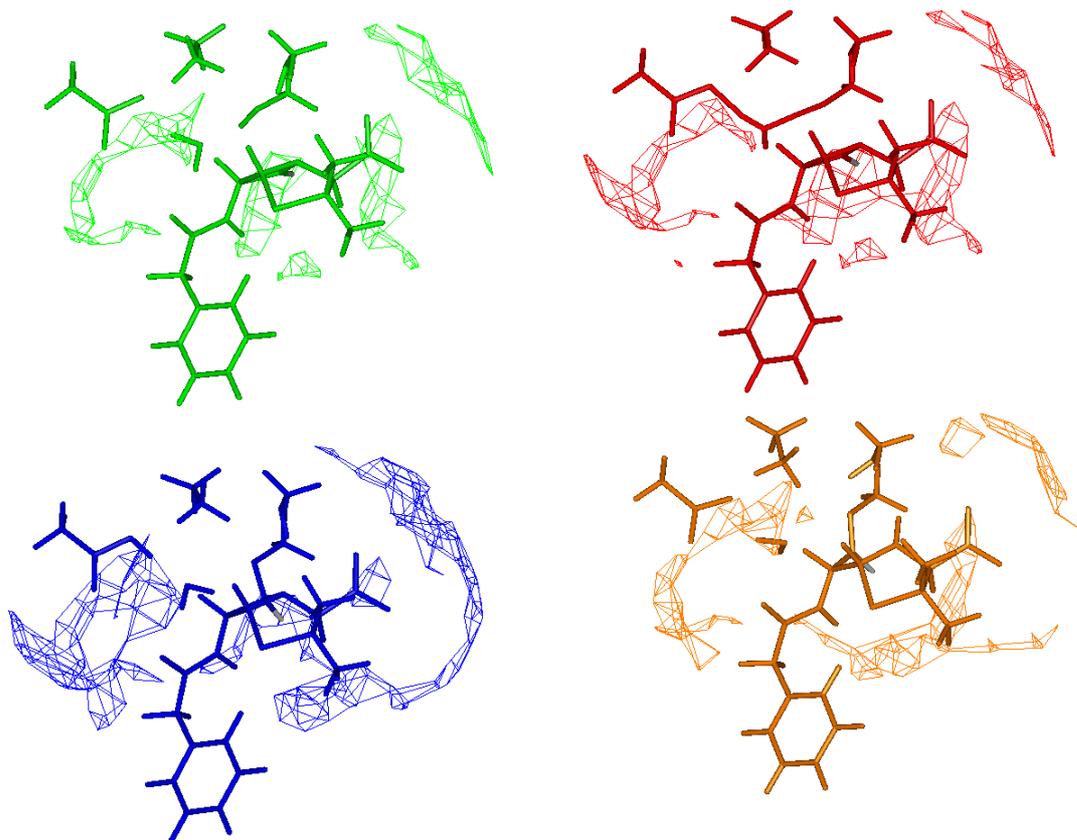


Abbildung 4.41 Gridfelder berechnet mit einer Ammoniumsonde und bei $-5,9 \text{ kcal mol}^{-1}$ konturiert (Grau = β -Lactam-Carbonylsauerstoff)
 Grün: Michaelis-Menten Komplex
 Rot: Übergangszustand
 Blau: Tetrahedrales Zwischenprodukt
 Orange: Acylenzym

Die Untersuchung der Felder zeigt, dass neben der Ladungsverschiebung die durch die Geometrieänderungen hervorgerufenen Effekte eine wichtige Rolle spielen. Bei Angriff des Ser70-Sauerstoffs und bei Bildung des tetrahedralen Zwischenprodukts ändert der Carbonylsauerstoff des β -Lactams seine Ausrichtung als Folge des Wechsels von der sp^2 - zur sp^3 -Hybridisierung des Kohlenstoffs. Bei dem in den Abbildungen gewählten Blickwinkel zeigt der Sauerstoff schon im Übergangszustand weiter nach unten als im Michaelis-Menten Komplex. Diese Ausrichtungsänderung verstärkt sich weiter bis zum tetrahedralen Zwischenprodukt.

Im Acylenzym liegt erneut ein sp^2 -hybridisierter Kohlenstoff vor. Im Gegensatz zum Michaelis-Menten Komplex ist die Carbonylgruppe jedoch nicht mehr in einen Bicyclus eingegliedert und deshalb freier beweglich. Sie nimmt eine Position ein, in der der Sauerstoff ebenfalls nach unten zeigt.

Bei Analyse der Isokonturflächen des Übergangszustands (rot) ist bereits ein Anwachsen des Feldes vom Michaelis-Menten Komplex (orange) festzustellen, auf das der Sauerstoff der Carbonylgruppe deutet. Dadurch wird angezeigt, dass hier die Wechselwirkungen für eine positive Ladung (die Probe) günstiger werden. Außerdem ist schon eine leichte Verschiebung des Feldes nach unten, also in die Richtung, in die sich der Sauerstoff bewegt, zu erahnen.

Im tetrahedralen Zwischenprodukt (blau) sind diese Feldveränderungen viel stärker ausgeprägt zu beobachten. Die Interaktionsfelder haben sich parallel zu der Ausrichtungsänderung des Sauerstoffs deutlich weiter nach unten verschoben und sind weiter angewachsen. Darüber hinaus lässt sich eine generelle Zunahme der Wechselwirkungsfelder auf der rechten Seite der QM-Atome feststellen, wie es sich schon aus der Richtung der Ladungsverschiebung voraussehen ließ.

Die Zunahme der Felder auf der linken Seite im tetrahedralen Zwischenprodukt ist auf eine veränderte Position des Wassers zurückzuführen. Nur dort nimmt es eine Position ein, in der es Wasserstoffbrücken von außen akzeptieren kann und so die Wechselwirkungsfelder induziert. Alle anderen Geometrieänderungen der untersuchten Strukturen haben keine Auswirkungen auf die Fähigkeit bestimmter Strukturelemente der QM-Region, Wasserstoffbrücken zu bilden, so dass die Veränderungen der berechneten Interaktionsenergien nur auf elektrostatische Wechselwirkungen zurückzuführen sind.

Die Bildung des Acylenzyms (grün) geht mit einer Abnahme der Felder auf der rechten Seite, entsprechend dem dortigen Ladungsrückgang, einher. Die potenziellen Wechselwirkungsenergien werden durch die Flächen auf der rechten Seite aber noch immer größer als im Michaelis-Menten Komplex angezeigt. Der Sauerstoff des gebildeten Esters zeigt - wie oben beschrieben - in die gleiche Richtung wie in der tetrahedralen Geometrie, so dass die zugehörigen Felder im Vergleich zum Michaelis-Menten Komplex auch hier deutlich nach unten verschoben sind.

Die beobachteten Ladungsverschiebungen und die Zunahme der Attraktivität für positive Ladungen auf der rechten und der unteren Seite der QM-Atome (bei der hier benutzten Ausrichtung der QM-Atome) ist sehr gut mit den Positionen der geladenen Aminosäuren und dem Verlust an Stabilität bei der Eliminierung ihres Einflusses während der Aminosäuren-Dekomposition in Einklang zu bringen. Sowohl die positiven Ladungen von Arg275 als auch von Arg244 sind

mit ca. 11 und 8 Å Abstand zum Carbonylsauerstoff auf der rechten unteren Seite der QM-Atome positioniert und daher in der Lage, durch elektrostatische Wechselwirkungen die Zunahme der negativen Ladung sowohl an diesem Atom als auch an den übrigen Atomen auf der rechten Seite zu stabilisieren (s. Abbildung 4.42). Dabei kommt dem näher gelegenen Arg244 bei allen Strukturen die bedeutendere Rolle zu, da dessen Einfluss stets größer ist als der von Arg275.

Arg244 ist darüber hinaus auch deswegen bedeutungsvoller als Arg275, weil es eine wichtige Salzbrücke zu der Carboxylatgruppe des Benzylpenicillins ausbildet. Die Carboxylatgruppe unterliegt während der Reaktion keiner Veränderung, so dass sie im Michaelis-Menten Komplex wie in allen anderen Strukturen auf die gleichen Wechselwirkungspartner angewiesen ist. Die Stabilisation der anionischen Carboxylatgruppe ist jedoch in Strukturen essenzieller, bei denen in der Umgebung ein Überschuss an negativer Ladung zu verzeichnen ist.

Ausser mit Arg244 unterhält die Carboxylatgruppe auch noch Wechselwirkungen mit Lys234 und Ser235. Lys234 ist oberhalb der Carboxylatgruppe auf der Seite der QM-Atome platziert, von der sich der während der Reaktion abknickende Carbonylsauerstoff des β -Lactams weiter entfernt. Die Hauptaufgabe von Lys234 ist somit nicht eine elektrostatische Interaktion mit diesem Atom, sondern die Stabilisation der Carboxylatgruppe des Penicillins, besonders wenn Arg244 im Laufe der Reaktion für die Stabilisierung der sich verschiebenden Ladung im Substrat essenzieller wird.

Der Verlust von Arg244 im Zuge der Dekompositionsanalyse kann durch Lys234 ausgeglichen werden. Der Energieverlust ist daher bei Elimination von Arg244 nicht so groß wie bei dem späteren Entfernen von Lys234. Ser235 bleibt als letzter Wechselwirkungspartner mit der Ausbildung einer stabilen Wasserstoffbrücke zur Carboxylatgruppe in der Dekompositionsanalyse erhalten. Es kann jedoch nicht die gleiche Stabilisation leisten wie die positiv geladenen Arginine durch die ionischen Interaktionen. Trotzdem zeigt sich, dass auch Ser235 im Vergleich zum Michaelis-Menten Komplex ebenfalls für alle anderen Strukturen größere Bedeutung hat und auf die während der Reaktion entstehenden Geometrien stärker stabilisierend wirkt als auf den Michaelis-Menten Komplex.

Es fällt auf, dass Lys234 für das Acylenzym weniger essenziell als für den Michaelis-Menten Komplex ist. Das tetrahedrale Zwischenprodukt und der

Übergangszustand werden von Lys234 noch mit 8,9 und 6,4 kcal mol⁻¹ stabilisiert, während sich dessen Einfluss auf den Michaelis-Menten Komplex um 6 kcal mol⁻¹ günstiger auswirkt als auf das Acylenzym.

Der Grund liegt in der Ladungsänderung des benachbarten Sauerstoffs der ehemaligen Ser70 Hydroxylgruppe (O₆). Die von Glu166 stammende, negative Ladung, die noch im Übergangszustand und Zwischenprodukt auf die rechte Seite der QM-Atome verschoben war, ist im Acylenzym zu Glu166 zurückgekehrt. Trotzdem ist der Carbonylsauerstoff (O₁) negativer als im Acylenzym, da es sich nun um den Sauerstoff eines Esters handelt. Die Elektronendichte des Sauerstoffs von Ser70 ist infolge der Resonanz geringer und dessen Ladung weniger negativ. Die Interaktion mit Lys234 wirkt sich für das Acylenzym daher nicht mehr so energieerniedrigend aus wie noch im Michaelis-Menten Komplex.

Darüber hinaus liegt der ebenfalls zu Lys234 benachbarte β -Lactamstickstoff (N₁) im Acylenzym nach Spaltung der β -Lactambindung protoniert vor. Der Stickstoff ist zwar etwas negativer geladen als im Michaelis-Menten Komplex, die Ladung ist jedoch durch den gebundenen Wasserstoff auch entsprechend abgeschirmt, so dass die elektrostatische Wechselwirkung mit Lys234 abgeschwächt ist.

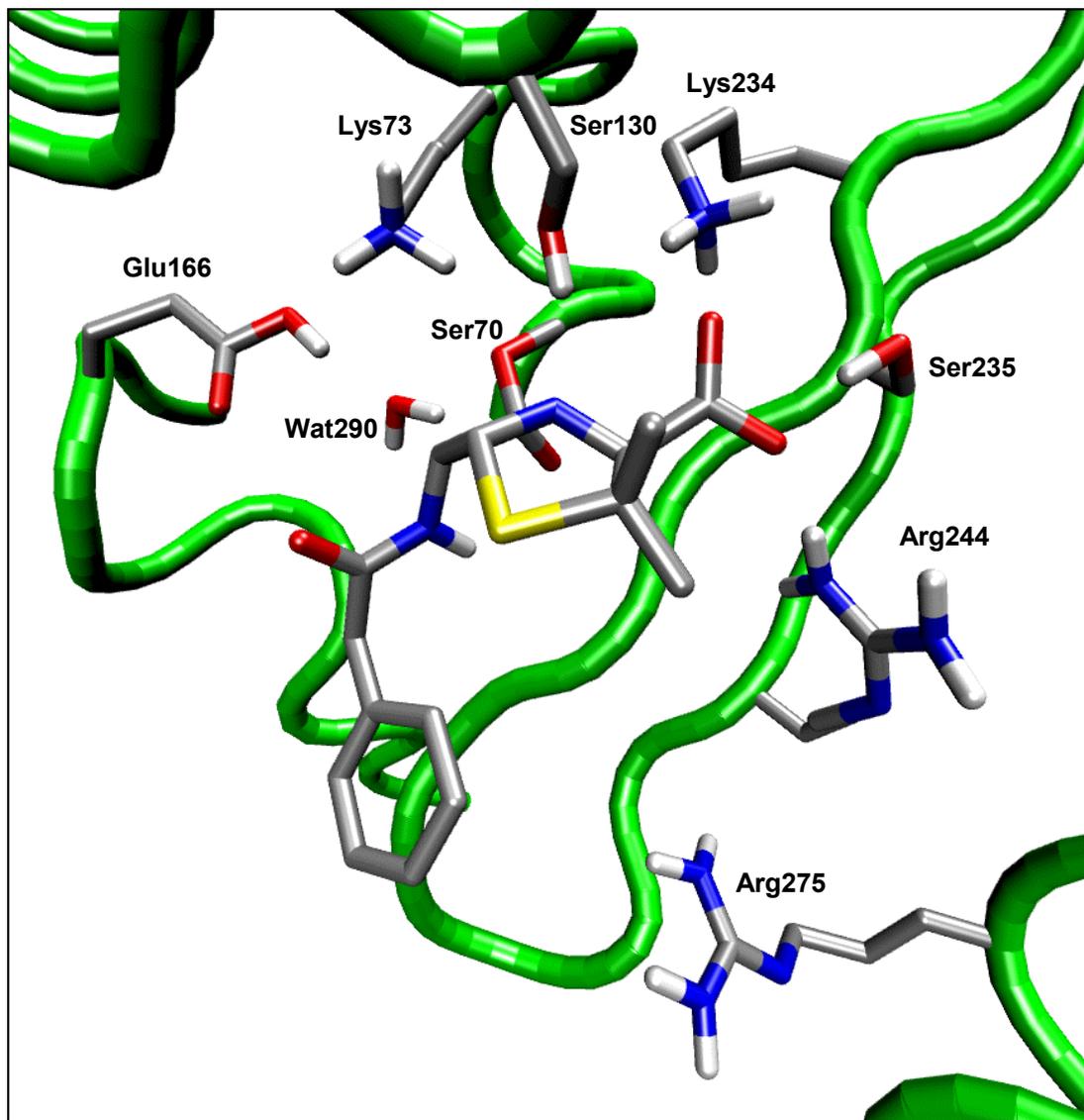


Abbildung 4.42 Lokalisation verschiedener wichtiger Aminosäuren zur Stabilisation der Ladungsverschiebungen während der Acylierung (Beispielstruktur: Tetrahedrales Zwischenprodukt)

5 DISKUSSION

5.1 General Base

Im modellierten Reaktionsmechanismus wurde Glutamat 166 als *General Base* eingesetzt, da unter Berücksichtigung aller verfügbaren Daten und den in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen des aktiven Zentrums, nur Glu166 die Aminosäure sein kann, die Ser70 durch Deprotonierung aktiviert. Der Mechanismus konnte darüber hinaus durch die berechneten Energiebarrieren bestätigt werden. Der Ausschluss des Mechanismus, der in Analogie zu den Serin-Proteasen ein Lysin (Lys73) als *General Base* nutzt, sowie der anderen Mechanismen beruht auf folgenden Schlussfolgerungen.

Die Theorien, die einen Mechanismus unterstützen, der Lys73 als *General Base* nutzt, basieren im Wesentlichen auf der Beobachtung, dass Mutanten ohne Glu166 immer noch von β -Lactam-Antibiotika acyliert werden können, auch wenn die Rate dann stark reduziert ist. Aus diesem Grund wird angenommen, könne nur Lys73 in neutraler Form als Akzeptor für das Proton von Ser70 dienen. Grundbedingung für diesen Mechanismus ist also ein drastisch erniedrigter pK_S -Wert für die Aminogruppe des Lysins.

Der pK_S von Lys73 kann jedoch nicht als Folge der elektrostatischen Gegebenheiten im aktiven Zentrum um vier Zehnerpotenzen erniedrigt sein. Die Analyse des aktiven Zentrums ergab, dass Dipoleffekte von α -Helices aufgrund ihrer räumlichen Anordnung zu dem Lysin keinen Einfluss auf dessen pK_S -Wert haben können. Die Basizitätserhöhung müsste demnach allein durch die benachbarten Aminosäuren hervorgerufen werden. Die Untersuchung des aktiven Zentrums mit Hinblick auf die Lage von geladenen Aminosäuren zu Lys73 lieferte jedoch keinen eindeutigen Hinweis darauf, warum eine derartig starke Erniedrigung des pK_S -Werts erfolgen sollte.

In unmittelbarer Nähe zu Lys73 befinden sich mit Lys234 und Glu166 nur zwei gegensätzlich geladene Aminosäuren. Alle anderen in Frage kommenden Aminosäuren haben schon deutlich mehr Abstand und werden teilweise durch andere benachbarte, negativ geladene Aminosäuren in ihrem Einfluss auf Lys73 abgeschwächt.

Es könnte weiterhin erwartet werden, dass sich die Mutation von Glu166 nicht negativ auf die Acylierungsrate auswirkt, da das für ein mögliches neutrales

Vorliegen von Lys73 verantwortliche, positive elektrostatische Umgebungspotenzial noch verstärkt werden würde. Alle Glu166-Mutanten zeigen jedoch eine drastische Abnahme der Acylierungsrate [74]-[77].

Die Dimensionen der Abnahme der Acylierungsrate von E166- und K73-Mutanten weisen ebenfalls eindeutig auf Glu166 als *General Base* hin. So ist bei einer K73R-Mutante die Geschwindigkeitskonstante der Acylierung (k_2 ; s. Kapitel 1.5) um das 200fache kleiner, während bei einer E166N-Mutante sowohl k_2 als auch die Konstante für die Deacylierung k_3 um das 2000fache abgeschwächt werden [74].

Messungen der Umsatzraten von Klasse A β -Lactamasen in Abhängigkeit vom pH-Wert zeigten typische Glockenkurven mit zwei kritischen pH-Werten. Bei der Absenkung des pH-Wertes unterhalb von 5 fällt die Umsatzrate stark ab. Dieser erste pH-Wert kann nur Glu166 zugeschrieben werden. Mutationsstudien an Lys73 und Lys234 ergaben, dass der Umsatzrückgang ab pH-Werten größer als 8 von Lys73 und Lys234 abhängt und suggeriert, dass sich diese nahe beieinander liegenden Lysine eventuell gegenseitig in ihrer Funktion ersetzen können. Lys73 kann aber keinesfalls alleine eine so wichtige Funktion, wie die der *General Base* haben [165][166].

Die Aufklärung der Kristallstruktur einer K73H-Mutante zeigte, dass der Imidazolring des substituierten Histidins positiv geladen ist. Die einzige signifikante Veränderung, die im aktiven Zentrum beobachtet worden ist, war die Drehung von Ser70 in eine Konformation, die äußerst ungünstig für den nucleophilen Angriff an ein Substrat ist und so die schlechteren katalytischen Eigenschaften dieser Mutante erklärt [80].

Bisher bekannte theoretische Untersuchungen stärken ebenfalls die Rolle von Glu166 als *General Base*. Berechnungen des pK_S -Wertes der ϵ -Aminogruppe von Lys73 ergaben, dass dieser größer als 10 und damit unvereinbar mit einem Mechanismus mit Lys73 als *General Base* ist [167]. Der berechnete pK_S -Wert konnte außerdem durch eine NMR-Titration experimentell bestätigt werden [168].

Die vorgestellten substratinduzierenden Mechanismen sind in Anbetracht des nötigen pK_S -Sprungs von 10 auf 6 ebenso unwahrscheinlich, zumal bei pK_S -Berechnungen auch mit Substraten im aktiven Zentrum immer pK_S -Werte größer als 10 bestimmt wurden [169].

Hierfür müsste Ser130 initial durch die Carboxylatgruppe des Penicillins deprotoniert werden. Dies ist bei Betrachtung der beteiligten Atome im Michaelis-Menten Komplexes eher unwahrscheinlich. Einerseits konnte Ser130 immer als Wasserstoffbrückenbindungspartner für den β -Lactam-Stickstoff identifiziert werden, was auch durch unabhängige Untersuchungen bestätigt wurde [170]. Andererseits ist die Carboxylatgruppe des β -Lactams durch direkte Wechselwirkungen mit Lys234, Arg244 und Ser235 sehr gut im aktiven Zentrum gebunden. Es erscheint daher äußerst unwahrscheinlich, dass sich dieses Muster ändern und die Carboxylatgruppe eine andere Funktion als die hier beschriebene Ankerfunktion im aktiven Zentrum haben könnte.

Auch die Modellierung der Mechanismen, die eine ringartige Protonenverschiebung mit oder ohne Einbeziehung der Carboxylatgruppe des Substrats vorsahen, ergaben durchweg sehr hohe Barrieren ($\sim 40 \text{ kcal mol}^{-1}$), die diese Mechanismen unrealistisch erscheinen lassen [83].

Die Ergebnisse der durchgeführten Moleküldynamik-Simulationen stützen ebenfalls einen protonierten Zustand von Lys73 und daher einen Mechanismus mit Glu166 als *General Base*. Aufgrund des geringen strukturellen Unterschieds zwischen neutralem und protoniertem aktiven Zentrum, der sich auch in zahlreichen Kristallstrukturen verschiedener Mutanten zeigt [71][80], beruhen die Schlussfolgerungen von den Ergebnissen der Simulationen ebenfalls nur auf geringen Unterschieden. Diese deuten jedoch alle auf ein Lysin im protonierten Zustand hin.

Bedeutung hat dabei die erhöhte Mobilität des katalytischen Wassermoleküls im aktiven Zentrum des neutralen Lysins, die im Kontrast zu der invariablen Position des Wassers in den bekannten Kristallstrukturen steht. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die, für eine mögliche Aktivierung von Ser70 durch ein neutrales Lys73, essenzielle Wasserstoffbrücke des zu transferierenden Protons zwischen diesen beiden Aminosäuren in der MD-Simulation nicht existent war. Ähnliche Ergebnisse wurden, unabhängig von den hier vorgestellten Untersuchungen, durch MD-Simulationen von TEM1 im Komplex mit Benzylpenicillin kürzlich veröffentlicht [170].

5.2 Molekularer Reaktionsmechanismus

Nach der Untersuchung des aktiven Zentrums wurde die Acylierung als symmetrischer Mechanismus zu der Deacylierung, d.h. unter Nutzung der identischen Aminosäure als *General Base* (Glu166), modelliert. Die Modellierung der Acylierungsreaktion sowie die anschließende Analyse des Reaktionswegs als Bestätigung des Mechanismus aus theoretischer Sicht, stellte die größte Herausforderung der vorliegenden Arbeit dar.

Die Acylierung lässt sich aufteilen in fünf Protonenübergänge, die Bildung einer Sauerstoff-Kohlenstoff- und den Bruch einer Kohlenstoff-Stickstoffbindung. Es konnte gezeigt werden, dass die einzelnen Reaktionen jedoch nicht in aufeinanderfolgenden Schritten ablaufen, sondern komplexeren konzertierten Mechanismen folgen.

Die Simulation dieser zusammengesetzten Reaktionen konnte unter Anwendung der QM/MM-Methodik durch Berechnung von Potenzialhyperflächen durchgeführt werden, die durch verschiedene parallel oder einzeln angewendete Reaktionskoordinaten berechnet wurden. Als unverzichtbare, allerdings äußerst rechenintensive Maßnahme zeigte sich hierbei das Korrekturverfahren der semiempirisch gewonnenen, quantenmechanischen Energien mit der DFT-Methode B3LYP.

Mit den berechneten Potenzialflächen lassen sich Barrieren und Energieminima bestimmen und auch Fragen zur Konzertiertheit oder zum sequenziellen Ablauf der einzelnen Reaktionsschritte beantworten. Das Energieschema in Abbildung 5.1 zeigt den Energieverlauf der gesamten Acylierungsreaktion auf. Die Energien entsprechen den Energiemaxima und -minima der für die jeweilige quantenmechanische Methode berechneten Potenzialhyperflächen.

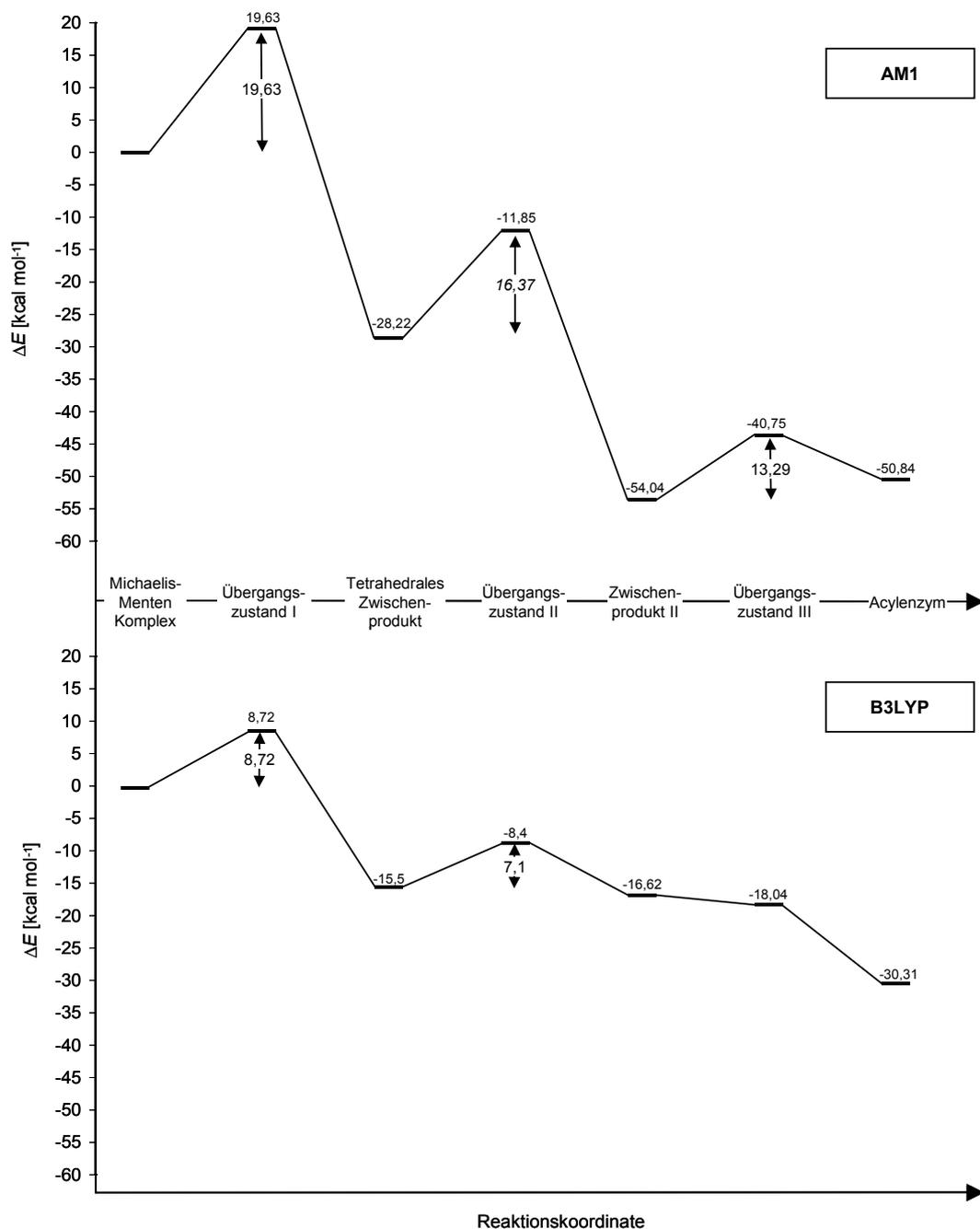


Abbildung 5.1 Energieverlauf der Acylierungsreaktion von Klasse A β -Lactamasen
oben: QM-Anteil der QM/MM-Energie mit AM1 berechnet
unten: QM-Anteil der QM/MM-Energie mit B3LYP berechnet

Der geschwindigkeitsbestimmende erste Schritt in der Acylierungsreaktion beginnt mit der Abstraktion eines Protons von Ser70 durch das katalytische Wasser. Das Wassermolekül überbrückt dabei als Zwischenstation die Distanz zur *General Base* (Glu166), an die es zeitgleich ein Proton weitergibt. Simultan dazu greift der aktivierte Sauerstoff von Ser70 nucleophil den Kohlenstoff der β -Lactamcarbonylgruppe an, der dabei in einen tetrahedralen, sp^3 -hybridisierten Zustand übergeht.

Die Berechnung reiner AM1-QM/MM-Potenzialflächen, die den B3LYP-Korrekturen vorangegangen waren, konnte bereits die Konzertiertheit der Aktivierung von Ser70 und des nucleophilen Angriffs beweisen (Publikation 2003 [171]). Das Produkt dieser beiden Reaktionen wäre ein tetrahedrales Zwischenprodukt, das im aktiven Zentrum ein protoniertes Wasser besäße. Allerdings wurde die Existenz dieses Zwischenprodukts durch seine berechnete geringe Stabilität in Frage gestellt.

Die Abhängigkeit der Stabilität des mutmaßlichen Zwischenprodukts von der angewendeten quantenmechanischen Methode zur Beschreibung der in der QM-Region enthaltenen Atome, konnte durch B3LYP-Korrekturen der AM1-Energien eindeutig aufgezeigt werden. Demnach kann die Struktur mit einem protonierten Wassermolekül im aktiven Zentrum nicht als ein Zwischenprodukt bewertet werden. Der zweite Protonentransfer zur *General Base*, Glu166, muss daher zeitgleich zur Protonierung des Wassermoleküls erfolgen.

Erweiterte, zusammengesetzte Reaktionskoordinaten erwiesen sich als sehr gut geeignet, um beide Protonentransfers und den nucleophilen Angriff zu beschreiben, so dass eine harmonisch verlaufende Potenzialhyperfläche des ersten Reaktionsschritts berechnet werden konnte. Das Produkt dieser Reaktion ist das tetrahedrale Zwischenprodukt. Die Geometrie des berechneten Übergangszustands beweist, dass die Reaktionen strikt konzertiert ablaufen, wobei die Protonentransfers, die Energie des Übergangszustands bestimmen. Die Bildung der Ser70-Penicillin-Bindung erfolgt sehr schnell, sobald der Sauerstoff der Ser70 Hydroxylgruppe genügend aktiviert worden ist. Eine ausreichende Nucleophilie des Sauerstoffs wird erreicht, wenn die Distanz zwischen dem Proton und dem Sauerstoff der Hydroxylgruppe von Ser70 auf eine bestimmte Größe angewachsen ist (ca. 1,17-1,2 Å). Im Übergangszustand ist die *General Base* Glu166 bereits partiell, im Zwischenprodukt dann vollständig protoniert.

Dieser Protonierungszustand ist experimentell während der Untersuchungen zu der vorliegenden Arbeit, durch eine hochaufgelöste TEM1-Röntgenkristallstruktur (0,8 Å) nachgewiesen worden, die ein Borsäure-Analogon des Übergangszustands bzw. des tetrahedralen Zwischenprodukts¹ im aktiven Zentrum enthält [130].

Anhand der Kristalldaten konnten unterschiedliche Bindungslängen der Carboxylatsauerstoffe zu dem Carboxylatkohlenstoff von Glu166 bestimmt werden, die auf die Protonierung des Glutamats schließen lassen. Ein Vergleich der während der Modellierung erhaltenen Strukturen mit dieser Kristallstruktur ist aufgrund der extremen Unterschiede der Substrate nur schwer möglich. Es lässt sich aber feststellen, dass auch in der Kristallstruktur das Wassermolekül durch Ser70, Glu166 und Asn170 in seiner Position fixiert wird. Die absolute Position des Wassers scheint jedoch noch zentraler zwischen diesen drei Aminosäuren als im modellierten Übergangszustand zu sein. Hier dominiert der Kontakt zu den an der Katalyse direkt beteiligten Aminosäuren Ser70 und Glu166. Die Kristallstruktur enthält demnach eher ein Analogon, das einem Zwischenprodukt entspricht, in dem die Position des katalytischen Wassers durch gleichberechtigte, elektrostatische Wechselwirkungen bestimmt wird und nicht durch dessen Beteiligung an Protonentransfers.

Der auf die Bildung des tetrahedralen Zwischenprodukts folgende Reaktionsschritt ist gekennzeichnet durch die Spaltung des Lactamrings und durch die Bildung eines Esters, in dem der tetrahedrale Kohlenstoff wieder in einer sp^2 -hybridisierten, planaren Konformation vorliegt. Es konnte wie im ersten Reaktionsschritt gezeigt werden, dass es sich auch hierbei um eine hochkonzertierte Reaktion handelt. Infolge der Spaltung kommt es zur Protonierung des freiwerdenden Stickstoffs durch Ser130, das seinerseits von Lys73 protoniert wird.

Die Konzertiertheit der drei Reaktionen kann nur schlecht von der angewendeten semiempirischen Methode AM1 wiedergegeben werden und wird erst durch die Ergebnisse nach der Neuberechnung der

¹ Die verwendete Struktur spiegelt das Cephalosporin Cefatazidim wider. Die Autoren legen sich anhand ihrer Ergebnisse nicht eindeutig fest, ob es sich um ein Übergangs- oder Zwischenprodukt-Analogon handelt. Es stellt auf jeden Fall ein Analogon zu einer Struktur mit einer tetrahedralen Konformation des β -Lactamkohlenstoffs dar.

quantenmechanischen Energien mit B3LYP deutlich. Der Grund dafür ist, dass AM1 Wasserstoffbrücken nur ungenügend genau berechnet.

Protonentransferreaktionen werden im Wesentlichen durch die beiden Wasserstoffbrücken zu den Donor- und Akzeptoratomen stabilisiert. Werden diese Wasserstoffbrücken - wie im Falle von AM1 - nicht mit dem entsprechenden Energiegewinn für das System berechnet, liegt auch die zugehörige Barriere zu hoch. Als Konsequenz davon ist es unwahrscheinlich, dass Multi-Protonentransferreaktionen von AM1 als konzertierte Reaktionen vorausgesagt werden. Die hier beobachtete unterschiedliche Form der AM1- und der B3LYP-Potenzialhyperfläche ist ein Beispiel für dieses Verhalten.

Sowohl die AM1- als auch die B3LYP-Ergebnisse belegen, dass der Protonentransfer zu Ser130 erst gegen Ende der Protonierung des β -Lactamrings einsetzt, ohne dass vorher ein stabiles Zwischenprodukt mit deprotonierter Hydroxylgruppe von Ser130 gebildet wird. Im Gegensatz zu der, mit der Protonierung des Stickstoffs des Thiazolidinrings, hochkonzentriert ablaufenden Spaltung des Lactamrings, ist die Protonierung von Ser130 dazu als nicht strikt konzertiert ablaufende Reaktion zu werten.

Die primär Stabilität bringende Reaktion während dieses Reaktionsschritts ist die Bildung des Esters aus dem tetrahedralen Zwischenprodukt. Eine Folge davon ist die Spaltung der Lactambindung, die erst die Protonierung des freiwerdenden Stickstoffs durch Ser130 und darauf folgend die Protonierung von Ser130 induziert. Die Protonierung von Ser130 kann demnach nicht mit den vorhergehenden Reaktionen simultan, sondern muss zeitlich versetzt ablaufen, was sowohl durch die Ergebnisse von AM1 als auch von B3LYP bestätigt werden konnte. Die Funktion von Ser130 als letzter Donor konnte darüber hinaus durch Potenzialflächen verifiziert werden, in denen ausschließlich von Ser130 spontan ablaufende Protonierungen des β -Lactam-Stickstoffs beobachtet wurden.

Die Ergebnisse widerlegen die auf statischen Berechnungen beruhende Theorie einer initialen Protonierung des Stickstoffs [159]. Diese Reaktion wurde in keiner der berechneten Potenzialflächen beobachtet, so wie auch gezeigt werden konnte, dass eine Struktur mit einem protonierten Stickstoff im intakten β -Lactamring instabil ist.

Der von AM1 berechnete Energiegewinn des zweiten Reaktionsschritts ist mit $16,37 \text{ kcal mol}^{-1}$ auffallend groß im Verhältnis zu den B3LYP-Ergebnissen. Die Dimension des Energiegewinns beruht auf der in dieser Reaktion auftretenden Reduktion der ionischen Ladungen innerhalb der QM-Region und der Deprotonierung der Lys73-Aminogruppe. Der Protonentransfer der positiv geladenen Aminogruppe zu dem partiell als Anion vorliegenden Ser130 vermindert die ionische Ladungszahl von drei auf nur noch eine Ladung der Carboxylatgruppe des Benzylpenicillins.

Der unverhältnismäßige Energiegewinn resultiert hauptsächlich aus der Schwäche von AM1 bei der Berechnung des Energieinhaltes der protonierten Aminogruppe (Lys73), die zu energiereich im Verhältnis zum neutralen Amin berechnet wird und dadurch den zu großen Energiegewinn bei Deprotonierung verursacht. Des Weiteren sind generell die Energiebilanzen, die AM1 bei Reaktionen liefert, die auf Edukt- und Produktseite ein Ungleichverhältnis bei der Anzahl der ionischen Ladungen aufweisen, nur bedingt vertrauenswürdig (vgl. Kapitel 4.7.2.4). Dennoch sind die von AM1 berechneten Geometrien qualitativ so gut, dass die Neuberechnungen der QM-Energieanteile der QM/MM-Energien mit einer aufwendigeren quantenmechanischen Methode möglich war.

Die bekannten AM1-Schwächen führen bei Energieberechnungen nur dann zu Ungenauigkeiten, wenn sich die zu vergleichenden Strukturen hinsichtlich des Protonierungszustandes von Lys73 oder in der Anzahl der ionischen Nettoladungen unterscheiden. Außer bei der Protonierung von Ser130 durch Lys73 sind diese Bedingungen auch im folgenden Reaktionsschritt bei der Protonierung von Lys73 durch Glu166 erfüllt.

Im letzten Schritt der Reaktion wird das noch deprotoniert vorliegenden Lys73 durch Glu166 wieder protoniert und die Bildung der Zwischenproduktstruktur des Acylenzym damit abgeschlossen. Die berechneten Potentiale von AM1 und B3LYP sind aufgrund der semiempirischen Ungenauigkeiten hinsichtlich ihrer Energiebilanzen uneinheitlich. Der von AM1 berechnete, nicht reale Energieverlust während dieses Schrittes, konnte jedoch durch die B3LYP-Korrektur erfolgreich bereinigt werden.

Die B3LYP-Ergebnisse zeigen in diesem Punkt die Grenzen von AM1 bei der Beschreibung von chemischen Reaktionen in quantitativer wie auch in qualitativer Hinsicht auf. Der Verlauf der mit B3LYP neu berechneten Energien

fällt bis hin zu dem Energieniveau des Acylenzyms ab, ohne ein Energiemaximum einer Übergangszustandsstruktur zu passieren. Dies steht im Kontrast zu den Ergebnissen von AM1. Hier trennt eine relativ hohe Barriere von 13,3 kcal mol⁻¹ die Struktur mit neutral vorliegender Aminogruppe (Zwischenprodukt II) und das Acylenzym mit protonierter Aminogruppe. Die Geometrie des Zwischenprodukts müsste demnach als stabiles Energieminimum eingeschätzt werden. Aufgrund der B3LYP-Ergebnisse muss aber postuliert werden, dass auch der letzte Protonentransfer von Glu166 zu Lys73 ähnlich wie der vorangehende von Lys73 zu Ser130 im Sinne einer nicht strikt konzertierten Reaktion abläuft.

Die B3LYP-Ergebnisse korrigieren außerdem den von AM1 vorausgesagten endothermen Charakter des Reaktionsschritts. Die Protonierung von Lys73 durch Glu166 wird von B3LYP als eindeutig exotherm mit einem Energiegewinn von 13,7 kcal mol⁻¹ berechnet.

Der sequenzielle Reaktionsmechanismus und die positive Energiebilanz, den die AM1-Ergebnisse in diesem Schritt suggerieren, sind das Resultat der unzureichenden Beschreibung der geladenen Aminogruppe von Lys73 sowie der Veränderungen der Ladungsverteilung innerhalb der QM-Region (s.o.).

5.3 Einfluss der Proteinumgebung

Die Modellierung des Reaktionsmechanismus von Klasse A β -Lactamasen ermöglichte die Untersuchung der Funktion von einzelnen Aminosäuren während der Reaktion auf atomarer Ebene. Die Aminosäuren mit dem größten Einfluss konnten dabei durch Anwendung der Aminosäuren-Dekompositionsanalyse identifiziert werden.

Grundsätzlich lässt sich feststellen, dass der wichtigste Effekt der Aminosäuren und damit die umsatzsteigerndste Eigenschaft des Enzyms die Stabilisierung der negativen Ladung ist, die zwischenzeitlich am Substrat bei Bildung der tetrahedralen Konformation zusätzlich auftritt. Den größten stabilisierenden Einfluss haben demgemäss Aminosäuren, die positiv geladene Seitenketten tragen und entsprechend zum aktiven Zentrum und dem Substrat positioniert sind. Die andere essenzielle Struktur ist die des *Oxyanion Holes*, das zwar ungeladen ist, aber dafür im direkten Kontakt mit der zu stabilisierenden Ladung, dem negativ geladenen Sauerstoffatom der β -Lactambindung, steht. Die drei Aminosäuren Lys234, Arg244, Arg275 und das *Oxyanion Hole* tragen

so schon allein ca. 75% zur Stabilisierung des tetrahedralen Zwischenprodukts bei.

Die Ergebnisse dokumentieren, dass die größte stabilisierende Wirkung auf das tetrahedrale Zwischenprodukt und nicht auf den Übergangszustand ausgeübt wird. Die Veränderungen während der Reaktion sind im Übergangszustand bereits erkennbar, erreichen jedoch im tetrahedralen Zwischenprodukt ihren Höhepunkt. Dies sind vor allem die Geometrieänderungen des Kohlenstoffs der β -Lactamcarbonylgruppe und die zugehörigen elektronischen Veränderungen der beteiligten Atome, die sowohl im Übergangszustand als auch im tetrahedralen Zwischenprodukt von denselben Strukturen des aktiven Zentrums aufgefangen werden. In beiden Geometrien muss die Entstehung von ähnlich lokalisierten Ladungen kompensiert werden. Eine entsprechend stabilisierend wirkende Aminosäure hat so auch auf beide Strukturen den gleichen qualitativen Einfluss, der sich entsprechend der Größe der zu stabilisierenden Ladung nur in quantitativer Hinsicht unterscheidet. Das tetrahedrale Zwischenprodukt wird demnach auch entsprechend seiner Ladungsverteilung am stärksten stabilisiert.

Die Geometrie des Übergangszustands wird durch die beiden Protonentransfers bestimmt, die ein partiell protoniertes Wassermolekül hervorrufen. Dieses dreibindige Wassermolekül wird durch das Enzym ebenfalls effektiv stabilisiert, allerdings konnte dieser Effekt nicht durch die Dekompositionsanalyse erfasst werden. Die entscheidenden Atome von zwei der beteiligten Aminosäuren, nämlich die des protonendonierenden Ser70 und die des protonenakzeptierenden Glu166, sind in der QM-Region enthalten, so dass deren Effekt nicht einzeln evaluiert werden konnte. Der stabilisierende Einfluss von Asn170 auf das Wassermolekül hingegen, konnte nicht bestimmt werden, da es durch seine Wechselwirkung mit Glu166 im Vergleich zum Michaelis-Menten Komplex insgesamt weniger vorteilhaft für den Übergangszustand ist.

Das Pauling-Prinzip [172], wonach Enzyme u.a. deswegen katalytisch wirken, weil sie Übergangszustände stabilisieren, ist auch bei TEM1 erfüllt. Der stabilisierende Effekt des Enzyms auf den Übergangszustand wurde durch die Dekompositionsanalyse mit ca. 16 kcal mol^{-1} bestimmt. Die Barriere würde sich somit ohne den Einfluss der Proteinumgebung ungefähr verdoppeln.

Der Stabilisierung des tetrahedralen Zwischenprodukts kommt darüber hinaus ebenfalls eine entscheidende katalysierende Bedeutung zu. Ohne sie würde das Energieniveau des Zwischenprodukts um ca. 45 kcal mol^{-1} ansteigen und sich dieser erste Reaktionsschritt in eine endotherme Reaktion mit einem Energieverlust von ca. 17 kcal mol^{-1} wandeln, der sich ebenfalls stark erniedrigend auf die Umsetzungsrate auswirken würde.

Die wichtigsten umsatzsteigernden Effekte des Enzyms sind so zum einen die Stabilisierung des Übergangszustands und die daraus hervorgehende Erniedrigung der Barriere. Zum anderen wird das eigentlich sehr hohe Energieniveau des tetrahedralen Zwischenprodukts durch das aktive Zentrum äußerst effektiv abgesenkt. Erst dies führt neben dem Zusammenspiel der an den Protonentransfers beteiligten Aminosäuren zu den hohen Wechselzahlen von Klasse A β -Lactamasen.

Außer der Identifizierung von Aminosäuren, die auf die Geometrie des Substrates einwirken, ist es auch möglich gewesen, die Wirkungsweise solcher Aminosäuren zu erschließen, die einen direkten Einfluss auf die Funktionalität des aktiven Zentrums haben.

Die bereits angeführte Aminosäure Asn170 ist in allen Strukturen für die Ausrichtung und Bindung des katalytischen Wassers erforderlich. Sie konnte darüber hinaus auch als die Aminosäure identifiziert werden, die Glu166 für dessen Funktion als *General Base* im Michaelis-Menten Komplex und im Acylenzym ausrichtet und stabilisiert.

Es gelang des Weiteren nicht nur die postulierte Rolle von Asparagin 132 als Interaktionspartner der peptidischen Seitenkette des Substrats zu bestätigen, sondern dessen äußerst wichtige Funktion als Wechselwirkungspartner von Lys73 nachzuweisen. Diese Interaktion ist besonders wichtig in Geometrien wie dem Übergangszustand und dem tetrahedralen Zwischenprodukt, in denen die negative Ladung und damit der Einfluss des Hauptwechselwirkungspartners, Glu166, stark abgeschwächt sind.

Lys73 ist ebenfalls eine essenzielle Aminosäure für das aktive Zentrum wie in zahlreichen Mutationsstudien gezeigt werden konnte [64][74][166]. Die Funktion bei Klasse A β -Lactamasen ist jedoch nicht die der *General Base*. Trotzdem kommen Lys73 zwei Schlüsselfunktionen in dem Acylierungsmechanismus zu.

Es ist zum einen direkt katalytisch beteiligt, um das während der Reaktion von Glu166 gebundene Proton im Zuge der Protonierung des β -Lactam-Stickstoffs an Ser130 zu übergeben. Zum anderen hat Lys73 die wichtigste ordnende Funktion für das aktive Zentrum. Die Platzierung im Mittelpunkt des aktiven Zentrums erlaubt es Lys73, mit allen wichtigen katalytisch wirkenden Aminosäuren in Kontakt zu treten und sie so entsprechend ihren Funktionen im Laufe der Reaktion zu positionieren. Außerdem sättigt es die freien Valenzen der Ser130-Hydroxylgruppe ab, so dass die Bildung einer Wasserstoffbrücke zwischen Ser70 und Ser130 verhindert wird, die eine Aktivierung von Ser70 durch Glu166 und damit die Acylierung stark erschweren würde.

5.4 Vergleich von Ergebnissen

5.4.1 Ergebnisse experimenteller Untersuchungen

Die Aktivierungsenergie für die Spaltung von Benzylpenicillin durch TEM1 ist in verschiedenen, unabhängigen, experimentellen Untersuchungen zwischen 12,7 und 13,7 kcal mol⁻¹ bestimmt worden [74][173]-[175]. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist dabei die Acylierungsreaktion und hierbei die Bildung des tetrahedralen Zwischenprodukts [64][71]. Die Modellierung dieses ersten und wichtigsten Schritts konnte erfolgreich durchgeführt werden, ohne dass - wie in anderen für die Umsetzungsrate unbedeutenderen Reaktionsschritten - Mängel in den AM1-berechneten Energien einen Einfluss auf das Ergebnis hatten.

Die durch AM1 erhaltene Barriere liegt mit 19,6 kcal mol⁻¹ sichtlich höher als die experimentell ermittelte. Die Differenz liegt jedoch im Rahmen der zu erwartenden Abweichungen bei Anwendung von semiempirischen Methoden, die Reaktionsbarrieren im Allgemeinen zu hoch berechnen. Eine weitere sich ungünstig auf die Genauigkeit der Barriere auswirkende Gegebenheit ist die Struktur des Übergangszustands.

Die Geometrie des Übergangszustands wird maßgeblich durch zwei simultan ablaufende Protonentransfers bestimmt. Der Energieinhalt dieser Geometrie und damit die Barriere der Reaktion hängt somit entscheidend von vier

Wasserstoffbrückenbindungen bzw. vier schwachen, kovalenten Bindungen zwischen den zu transferierenden Wasserstoffatomen und den Donor- und Akzeptoratomen ab. Die Genauigkeit, mit der semiempirischen Methoden diese Bindungen berechnen, ist jedoch nicht befriedigend. In der von AM1 berechneten Barriere ist daher eine zusätzliche artifizielle Erhöhung enthalten, die von der unzureichenden Beschreibung von Wasserstoffbrücken durch AM1 herrührt. Aus diesen Gründen sind die von AM1 absolut zu hoch berechneten Barrieren gut mit den experimentellen Werten zu vereinbaren.

Nach der Neuberechnung der QM-Anteile der QM/MM-Energien mit B3LYP konnte die Barriere mit $8,7 \text{ kcal mol}^{-1}$ unterhalb der experimentellen Barriere bestimmt werden. Die Absenkung der Barriere kommt aus den in Kapitel 4.7.2.3 ausführlich erläuterten Gründen zustande. Sie steht in Zusammenhang mit der, auf der Geometrie des AM1-Energieminimums basierenden, zu hohen B3LYP-Energie des Michaelis-Menten Komplexes und der B3LYP-Eigenschaft, die Stabilität von Wasserstoffbrücken zu übertreiben. Die reelle B3LYP-Barriere muss demnach leicht erhöht sein und liegt viel näher an den experimentellen Daten.

Die Acylierung von TEM1 kann als Beispiel dafür angesehen werden, dass die angewandte Methode der Energie-Neuberechnung mit B3LYP sehr gut geeignet ist, um realistische Energiewerte für die Modellierung enzymatischer Prozesse, ausgehend von Daten, die durch AM1-QM/MM-Kalkulationen gewonnen wurden, zu erhalten.

5.4.2 Ergebnisse theoretischer Untersuchungen

Aspekte der Acylierungsreaktion von Klasse A β -Lactamasen sind in verschiedenen theoretischen Ansätzen untersucht worden.

Der Vergleich der Ergebnisse mit denen einer reinen Vakuum *ab initio*-Untersuchung [176] mit einem reduzierten Modell des aktiven Zentrums demonstriert die Wichtigkeit, die Proteinumgebung bei der Modellierung von Enzymreaktionen einzuschliessen, wie es in der vorliegenden Arbeit im QM/MM-System durchgeführt wurde. Die Barrieren sind sehr uneinheitlich berechnet worden und umfassen eine Breite von 16 bis 39 kcal mol^{-1} . Ein weiterer Hinweis für die Mängel eines reinen QM-Modells sind die berechneten Energiebilanzen dieses Systems. Die Energien der Produkte sind hierbei deutlich höher bestimmt worden als die Energien der Edukte. Das steht im

Gegensatz zu dem exothermen Charakter der Reaktion und den im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen eines QM/MM-Modells.

Die Resultate der *ab initio*-Studie konnten allerdings anhand der Ergebnisse der Aminosäuren-Dekompositionsanalyse nachvollzogen werden. Hier konnte ebenfalls ein drastischer Energieanstieg der Produkte und Zwischenprodukte beim Entfernen des Einflusses der molekularmechanisch beschriebenen Aminosäuren bis zu einem reinen QM-Modell beobachtet werden.

Eine andere statische *ab initio*-Studie beschäftigte sich ausschließlich mit den Auswirkungen des *Oxyanion Holes* auf verschiedene Strukturen der Acylierungsreaktion [177]. Trotz der Anwendung eines stark reduzierten QM-Modells sind dabei mit B3LYP/6-31+G(d)//RHF/6-31+G(d) sehr ähnliche Ergebnisse erzielt worden, wie in der hier präsentierten Analyse des quantitativen Effekts des *Oxyanion Holes*. Der energetische Einfluss ist ebenfalls für die das Zwischenprodukt repräsentierende Struktur mit 17 kcal mol^{-1} deutlich stabilisierender berechnet worden als für den Übergangszustand mit 4 kcal mol^{-1} . Die vorgestellten Ergebnisse der Aminosäuren-Dekompositionsanalyse ergaben im Vergleich dazu $15,2$ und $5,9 \text{ kcal mol}^{-1}$. Übereinstimmend mit dieser Studie kann der Schluss gefolgert werden, dass das *Oxyanion Hole* - wie andere Aminosäuren auch - primär die Stabilisierung des Zwischenprodukts gewährleistet.

In einer QM/MM Studie ist der Acylierungsmechanismus, der als *General Base* ein neutrales Lys73 einsetzt, modelliert worden [178][179]. Dabei sind statische Einzelpunktrechnungen und primitivere eindimensionale Reaktionskoordinaten verwendet worden, die - wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte - nicht ausreichend sein können, um die komplexen, konzertiert ablaufenden Reaktionen innerhalb des aktiven Zentrums umfassend zu beschreiben. Trotz des Einsatzes der gleichen semiempirischen Methode (AM1) und des gleichen Kraftfeldes (CHARMM) sind Barrieren von bis zu 45 kcal mol^{-1} ermittelt worden. Sie liegen damit deutlich höher, als die Barriere des hier verifizierten Mechanismus mit Glu166 als *General Base* und um ein vielfaches höher als die experimentell ermittelten Ergebnisse.

Glu166 kann daher sowohl durch die Übereinstimmung der qualitativen, experimentellen und theoretischen Ergebnisse als auch durch den Vergleich der experimentellen mit den hier berechneten quantitativen Daten, die einzige Aminosäure sein, die die Aufgabe hat, Ser70 zu aktivieren.

Die trotz Mutation von Glu166 stattfindende Acylierung von β -Lactamasen steht nicht im Gegensatz dazu, obwohl sie immer wieder als Gegenargument gegen eine Glutamat vermittelte Aktivierung angeführt worden ist.

PBPs werden von β -Lactam-Antibiotika effizient acyliert, besitzen aber keinen Ω -Loop oder eine mit Glu166 vergleichbare Aminosäure. PBPs müssen daher über einen anderen Acylierungsmechanismus als den über Glu166 der Klasse A β -Lactamasen verfügen. Aufgrund der Abstammung der β -Lactamasen von den PBPs und aufgrund der vorhandenen Ähnlichkeiten zwischen den aktiven Zentren dieser Enzyme liegt es nahe, dass Klasse A β -Lactamasen noch immer in der Lage sind, diesen Mechanismus, wenn auch mit kleineren Geschwindigkeitskonstanten, zu nutzen.

Diese These wird durch Beobachtungen gestützt, die mit β -Lactamen gemacht wurden, die eine 6- bzw. 7 α -Methoxyseitenkette tragen (s. Kapitel 1.6.2). Diese von den Enzymen nicht abzuspaltenden Lactame acylieren Wild-Typ Klasse A β -Lactamasen wie auch E166-Mutanten, die dabei durch die Deplatzierung des katalytischen Wassers sowie die eventuell vorliegende Mutation von Glu166, keinen Mechanismus mit Glu166 als *General Base* nutzen können. Die Acylierungsrate solcher Substanzen wird bei E166-Mutanten [76] um das bis zu 750fache erhöht und zeigt, dass der sekundäre Mechanismus durch Glu166 bzw. dessen negative Ladung gestört wird. Diese Erkenntnis ist logisch mit einem Alternativmechanismus in Verbindung zu bringen, der Lys73 als dann neutrale Aminosäure und *General Base* vorsieht, da die wichtigste unmittelbar auf das protonierte Lys73 ladungsstabilisierend wirkende Aminosäure, nämlich Glu166, fehlt

6 ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Acylierungsmechanismus von Klasse A β -Lactamasen untersucht. Die mit der Acylierung einhergehende Spaltung von β -Lactam-Antibiotika durch β -Lactamasen stellt den wichtigsten Resistenzmechanismus von Bakterien gegen diese Klasse von Antibiotika dar. Als Modellstrukturen für die Untersuchungen wurden mit der Lactamase TEM1 von *Escherichia Coli* sowie dem Benzylpenicillin jeweils die prominentesten Vertreter der Klasse A β -Lactamasen und der β -Lactam-Antibiotika ausgewählt. Anhand von theoretischen Untersuchungen wurde ein mit experimentellen Untersuchungsergebnissen übereinstimmender Reaktionsmechanismus erarbeitet und anschließend die Acylierungsreaktion modelliert und analysiert.

Es mussten zunächst Hinweise für die Identität der den Mechanismus bestimmenden *General Base* durch *Molecular-Modelling*-Techniken gewonnen werden. Ergebnisse von MD-Simulationen konnten hierbei, in Einklang mit allen verfügbaren Daten, ein strukturell konserviertes Glutamat als *General Base* verifizieren. Die erfolgreiche Modellierung der gesamten Acylierungsreaktion konnte anschließend den Mechanismus bestätigen.

Durch Anwendung von quantenmechanisch/molekularmechanischen-Hybridmethoden (QM/MM) konnte eine der komplexesten, theoretisch dargestellten Enzymreaktionen modelliert werden. Hier wurde nicht nur auf den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Acylierung Wert gelegt, sondern die vollständige Reaktion berechnet. Es wurde gezeigt, dass sich die einzelnen Reaktionen der Acylierung in zwei Reaktionsschritte aufteilen. Innerhalb dieser Reaktionsschritte wurden hochkonzentriert und nicht strikt konzentriert ablaufende Reaktionen beobachtet, die das perfekte Zusammenspiel der katalytischen Aminosäuren demonstrieren.

Die Analyse der Übergangszustandsstruktur des geschwindigkeitsbestimmenden Schritts erbrachte, dass die Umsatzrate dieser Enzyme von den Protonentransfers abhängt, die das aktive Serin für den nucleophilen Angriff an den β -Lactamring des Antibiotikums aktivieren.

Es konnten darüber hinaus Energiebarrieren für die Acylierung berechnet werden, die, unter Berücksichtigung der durch die gegenwärtig anwendbaren Methoden zu erreichenden Genauigkeiten, gut mit den experimentell bestimmten Aktivierungsenergien in Einklang zu bringen sind.

Schließlich war es möglich, katalytisch essenzielle Aminosäuren der Klasse A β -Lactamasen zu identifizieren. Dabei konnte der Mechanismus der

Stabilisierung von wichtigen repräsentativen Strukturen der Acylierungsreaktion aufgeklärt und der Effekt quantifiziert werden. Hier scheint der Kompensation von Ladungsverschiebungen innerhalb des aktiven Zentrums während der Reaktion die größte Bedeutung zuzukommen.

7 LITERATUR

-
- [1] Fleming, A. The antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenza*. *Br. J. Exp.* **1929**, *10*, 226-236.
- [2] Chain, E.B.; Florey, H.W.; Gardner, A.D.; Heatley, N.G.; Jennings, M.A. & Orr-Ewing, J. Penicillin as a chemotherapeutic agent. *Lancet* **1940**, *1*, 226-228.
- [3] *Epidemiologisches Bulletin* (Hrs. Roland-Koch-Institut, Berlin) **2003**, *35*.
- [4] Bacterial Cell Wall. *New Comprehensive Biochemistry (Vol. 27)* (eds. J.-M. Ghuysen and R. Hakenbeck) (Elsevier Science B.V., Amsterdam, 1994)
- [5] Labischinski, H.; Barnickel, G.; Bradczech, H. & Giesbrecht, P. On the secondary and tertiary structure of murein. Low and medium-angle X-ray evidence against chitin-based conformations of bacterial peptidoglycan. *Eur. J. Biochem.* **1979**, *95*, 147-155.
- [6] Thwaites, J.J. & Mendelson, N.H. Mechanical behaviour of bacterial cell walls. *Adv. Microb. Physiol.* **1991**, *32*, 173-222.
- [7] Labischinski, H.; Barnickel, G. & Naumann, D. The state of order of bacterial peptidoglycan. In: *The target of penicillin* (eds. Hakenbeck, R.; Höltje, J.-V.; Labischinski, H.) 49-54 (Walter de Gruyter, Berlin, 1983).
- [8] Höltje, J.-V. & Schwarz, U. Biosynthesis and growth of the murein sacculus. In *Molecular Cytology of Escherichia Coli* (ed. Nanninga, N.) 77-119 (Academic Press, London, 1985).
- [9] Weidel, W. & Pelzer, H. Bagshaped macromolecules: A new outlook on bacterial cell walls. *Adv. Enzymol.* **1964**, *26*, 193-232.
- [10] van Heijenoort, J. Biosynthesis of peptidoglycan. In *New Comprehensive Biochemistry. The Bacterial Cell Wall (Vol. 27)* (eds. Ghuysen, J.-M.; Hakenbeck, R.) 39-54 (Elsevier, Amsterdam, 1994).
- [11] van Heijenoort, J. Assembly of the monomer unit of bacterial peptidoglycan. *Cell. Mol. Life Sci.* **1998**, *54*, 300-304.
- [12] Ghuysen, J.-M.; Frère, J.-M.; Leyh-Bouille, M.; Nguyen-Distèche, M. & Coyette, J. Active-site-serine D-alanyl-D-alanine-cleaving-peptidase-catalysed acyl-transfer reactions. *Biochem. J.* **1986**, *235*, 159-165.
- [13] Matsushashi, M. Utilization of lipid-linked precursors and the formation of peptidoglycan in the process of cell growth and division: membrane enzymes involved in the final steps of peptidoglycan synthesis and the mechanism of their regulation. In *New Comprehensive Biochemistry. The Bacterial Cell Wall (Vol. 27)* (eds. Ghuysen, J.-M.; Hakenbeck, R.) 55-71 (Elsevier, Amsterdam, 1994).
- [14] Frère, J.-M. & Joris, B.; Penicillin-sensitive enzymes in peptidoglycan biosynthesis. *Crit. Rev. Microbiol.* **1985**, *235*, 159-165.
- [15] Ghuysen, J.-M. Serine beta-lactamases and penicillin-binding proteins. *Annu. Rev. Microbiol.* **1991**, *45*, 37-67.
- [16] Suginaka, H.; Blumberg, P.M. & Strominger, J.L. Multiple penicillin-binding proteins in *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia Coli*. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* **1972**, *11*, 299-396.
- [17] Blumberg, P. & Strominger, J.L. Interaction of penicillin with the bacterial cell. Penicillin-binding proteins and penicillin-sensitive enzymes. *Bacteriol. Rev.* **1974**, *38*, 291-335.
- [18] Spratt, B.G. & Pardee, A.B. Penicillin-binding proteins and cell-shape in *Escherichia Coli*. *Nature* **1975**, *254*, 516-517.

- [19] Spratt, B.G. Distinct penicillin-binding proteins involved in the division elongation and shape of *Escherichia Coli* K12. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1975**, *72*, 2999-3003.
- [20] Spratt, B.G. Penicillin-Binding Proteins and the future of. *J.Gen.Microbiol.* **1983**, *81*, 1247-1260.
- [21] Zhu, Y.F.; Curran, I.J.; Joris, B.; Ghuysen, J.-M. & Lampen, J.O. Identification of BlaR, signal transducer for β -Lactamase production in *Bacillus licheniformis* as penicillin-binding protein with strong homology to the Oxa-2 β -Lactamase (class DDD) of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **1990**, *172*, 1137-1141.
- [22] Ghuysen, J.-M. Molecular structures of Penicillin-binding proteins and β -lactamases. *Trends Microbiol.* **1994**, *2*, 45-60.
- [23] Ghuysen, J.-M. Penicillin-binding-proteins. Wall peptidoglycan assembly and resistance to penicillin: facts, doubts and hopes. *Int. J. Antimicrob. Agents* **1997**, *8*, 45-60.
- [24] Ghuysen, J.-M. Molecular structures of penicillin-binding proteins and β -Lactamases. *Trends Microbiol.* **1994**, *2*, 372-380.
- [25] Massova, I. & Mobashery, S. Kinship and Diversification of Bacterial Penicillin-Binding Proteins and β -Lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, *42*, 1-17.
- [26] Waxman, D.J. & Strominger, J.L. Penicillin-binding proteins and the mechanism of action of β -lactam antibiotics. *Ann. Rev.Biochem.* **1983**, *52*, 825-869.
- [27] Massova, I. & Mobashery, S. Structural and Mechanistic Aspects of Evolution of β -Lactamases and Penicillin-Binding Proteins. *Curr. Pharm. Design* **1998**, *5*, 929-937.
- [28] Meroueh, S.O.; Minasov, G.; Lee, W. Shoichet, B.K. & Mobashery, S. Structural Aspects for Evolution of β -Lactamases from Penicillin-Binding Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9612-9618.
- [29] Ghuysen, J.-M. Serine β -Lactamases and Penicillin-Binding Proteins. *Annu. Rev. Microbiol.* **1991** *45*, 37-67.
- [30] Sawai, T.; Mitsuhashi, S. & Yamagishi, S. Drug resistance of enteric bacteria. XIV. Comparison of β -lactamases in gram-negative rod bacteria resistant to α -aminobenzylpenicillin. *Japan J. Microbiol.* **1968**, *12*, 531-533.
- [31] Richmond, M.H. & Sykes, R.B. The beta-lactamases of gram-negative bacteria and their possible physiological role. *Adv. Microb. Physiol.* **1973**, *9*, 31-88.
- [32] Sykes, R.B. & Matthew, M. J. The β -lactamases of Gram-negative bacteria and their role in resistance to β -lactam antibiotics. *Antimicrob. Chemother.* **1976**, *2*, 115-157.
- [33] Ambler, R.P. The structure of β -lactamases. *Philos. Trans. R. Soc. London B* **1980**, *289*, 321-331.
- [34] Bush, K. Characterization of beta-lactamases. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **1989**, *33*, 259-263
- [35] Kelly, J.A.; Dideberg, O.; Charlier, P.; Werz, J.P.; Libert, M.; Moews, P.C.; Knox, J.R.; Duez, C.; Fraipoint, C.; Joris, B.; Dusart, J.; Frère, J.-M. & Ghuysen, J.-M. On the origin of bacterial resistance to penicillin: comparison of a beta-lactamase and a penicillin target. *Science*, **1986**, *231*, 1429-1431.
- [36] Matagne, A.; Misselyn-Bauduin A.-M.; Joris, B.; Erpicum, T.; Granier, B. & Frère, J.-M. The diversity of catalytic properties of class A β -lactamases. *Biochem. J.*, **1990**, *265*, 131-146.

- [37] Boeckmann, B.; Bairoch, A.; Apweiler, R.; Blatter, M.-C.; Estreicher, A.; Gasteiger, E.; Martin, M.J.; Michoud, K.; O'Donovan, C.; Phan, I.; Pilbout, S. & Schneider, M. The SWISS-PROT protein knowledgebase and its supplement TrEMBL in 2003. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 365-370.
- [38] Pares, S.; Mouz, N., Petillot, Y.; Hakenbeck, R. & Dideberg, O. X-Ray structure of *Streptococcus pneumoniae* PBP2x, a primary penicillin target enzyme. *Nat. Struct. Biol.* **1996**, *3*, 284-289.
- [39] Lin, D. & Strynadka, N.C. Structural Basis for the beta lactam resistance of PBP2a from Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat. Struct. Biol.* **2002**, *11*, 870-876.
- [40] Samaroui, B.; Sutton, B.J.; Todd, R.J.; Artymiuk, P.J.; Waley, S.G. & Phillips, D.C. Tertiary structure similarity between a class A β -lactamase and a penicillin-sensitive D-alanyl carboxypeptidase-transpeptidase. *Nature*, **1986**, *320*, 378-390.
- [41] Frishman, D. & Argos, P. Knowledge-based secondary structure assignment. *Proteins* **1995**, *23*, 566-579.
- [42] Ambler, R.P.; Coulson, A.F.W.; Frère, J.-M.; Ghuysen, J.-M.; Joris, B.; Forsman, M.; Levesque, R.C.; Tiraby, G. & Waley, S.G. A standard numbering scheme for the Class A β -lactamases. *Biochem J* **1991**, *276*, 269-272.
- [43] Tipper, D.J. & Strominger, J.L. Mechanism of Action of Penicillins: a Proposal Based on Their Structural Similarity to Acyl-D-alanyl-D-alanine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1965**, *54*, 1133-1141
- [44] Page, M.I. *The Chemistry of β -Lactams* (ed Page, M.I.) 79-100 (Blackie, Glasgow, 1992).
- [45] von Baeyer, A. Die Theorie des Ringschlusses und die Doppelbindung. *Berichte der deutschen Chemischen Gemeinschaft* **1885**, 2269-2281.
- [46] Page, M.I. The Mechanisms of Reactions of β -Lactam Antibiotics. *Adv. Phys. Org. Chem.* **1987**, *23*, 165.
- [47] Spratt, B.G. Resistance to β -Lactam Antibiotics. In: *New Comprehensive Biochemistry-Bacterial Cell Wall* (Vol. 27) (eds. Ghuysen, J.-M.; Hakenbeck, R.) 1994 (Elsevier, Amsterdam) 517-534.
- [48] Bacquero, F. Pneumococcal resistance to β -Lactam Antibiotics. *Microb. Drug Resist.* **1995**, *1*, 115-120.
- [49] Hakenbeck, R. Mosaic Genes and their role in penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Electrophoresis* **1998**, *19*, 597-601.
- [50] Tomasz, A. Benefit and risk in the β -Lactam antibiotic-resistance strategies of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* *Trend. Microbiol.* **1994**, *2*, 380-385.
- [51] Ghuysen, J.-M.; Frère, J.-M.; Leyh-Bouille, M.; Nguyen-Distèche, M. & Coyette, J. Active-site-serine D-alanyl-D-alanine-cleaving-peptidase-catalysed acyl-transfer reactions. *Biochem. J.* **1986**, *235*, 159-165
- [52] Page, M.I. The reactivity of β -Lactams, the Mechanism of Catalysis and the Inhibition of β -Lactamases. *Curr. Pharm. D.* **1999**, *5*, 895-913.
- [53] Fersht, A.R. & Renard, M. pH dependence of chymotrypsin catalysis. Appendix: substrate binding to dimeric alpha-chymotrypsin studied by x-ray diffraction and the equilibrium method. *Biochemistry* **1974**, *13*, 1416-1426.

- [54] Huber, R.; Kukla, D.; Bode, W.; Schwager, P.; Bartels, K.; Deisenhofer, J. & Steigmann, W. Structure of the complex formed by bovine trypsin and bovine pancreatic trypsin inhibitor. II. Crystallographic refinement at 1.9 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **1974**, *89*, 73-101.
- [55] Warshel, A.; Náray-Szabó, G.; Sussman, F. & Hwang, J.-K. How do serine proteases really work? *Biochemistry*, **1989**, *28*, 3629-3637.
- [56] Perona, J.J.; & Craik, C.S. Structural basis of substrate specificity in the serine proteases. *Protein Sci.* **1995**, *4*, 337-360.
- [57] Neurath, H. In *Proteolytic Enzymes* (eds. Beynon, R.J.; Bond J.S.) **1989** (Irl Press) 1-13.
- [58] Bulychev, A. & Mobashery, S. *Antimicrob. Agents Chemther.* Class C - Lactamases Operate at the Diffusion Limit for Turnover of Their Preferred Cephalosporin Substrates. **1999**, *43*, 1743-1746.
- [59] Hardy, L.W. & Kirsch, J.F. Diffusion-limited component of reactions catalyzed by *Bacillus cereus* beta-lactamase I. *Biochemistry* **1984**, *23*, 1275-1282.
- [60] Martin, A.F.; Morris, J.J. & Page, M.I. Intramolecular general acid catalysis in the aminolysis of Benzylpenicillin. A preferred direction of nucleophilic attack. *J. Chem. Soc. Commun.* **1979**, *6*, 298-299.
- [61] Matagne, A. & Frère, J.-M. Contribution of mutant analysis to the understanding of enzyme catalysis: The case of class A β -Lactamases. *Biochim. et Biophys. Acta* **1995**, *1246*, 109-127.
- [62] Matagne, A.; Lamotte-Brasseur, J. & Frère, J.-M. Catalytic Properties of class A β -Lactamases: efficiency and diversity. *Biochem. J.*, **1998**, *330*, 581-598.
- [63] Herzberg, O. & Moulton, J. Penicillin-binding and degrading enzymes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1991**, *1*, 946-953.
- [64] Matagne, A.; Dubus, A.; Galleni, M. & Frère, J.-M. The β -Lactamase cycle: a tale of selective pressure and bacterial ingenuity. *Nat. Prod. Rep.* **1999**, 1-19.
- [65] Paetzel, M. & Dalbey, R.E. Catalytic hydroxyl/amine dyads within serine proteases. *Trends Biochem. Sci.* **1997**, *22*, 28-31.
- [66] Oefner, C. & Winkler, F.K. refined crystal structure of β -Lactamase from *Citrobacter freundii* indicates a mechanism for β -lactam hydrolysis. *Nature* **1990**, *343*, 284-288.
- [67] Strynadka, N.C.J.; Adachi, H.; Jensen, S.E.; Johns, K.; Sielecki, A.; Betzel, C.; Sutoh, K. & James, M.N.G. Molecular Structure of the acyl-enzyme intermediate in β -lactam hydrolysis at 1.7 Å resolution. *Nature* **1992**, *359*, 700-705.
- [68] Escobar, W.A., Tan, A.K. & Fink, A.L. Site directed mutagenesis of β -Lactamase leading to Accumulation of a Catalytic Intermediate. *Biochemistry*, **1991**, *30*, 10783-10787.
- [69] Guillaume, G.; Vanhove, M.; Lamotte-Brasseur, J.; Ledent, P.; Jamin, M.; Joris, B. & Frère, J.-M. Site-directed Mutagenesis of Glutamate 166 in Two β -lactamases. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 5438-5444.
- [70] Adachi, H. Ohta, T. & Matsuzawa, H. Site-directed mutants, at position 166, of RTEM-1 β -lactamase that form a stable acyl-enzyme intermediate with penicillin. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 3186-3191.
- [71] Lietz, E.J., Truher, D.K., Hokenson, M.J. & Fink, A.L. Lysine-73 Is Involved in the Acylation and Deacylation of β -Lactamase. *Biochemistry* **2000**, *39*, 4971-4981.

- [72] Lamotte-Brasseur, J.; Dive, G.; Dideberg, O.; Charlier, P.; Frère, J.-M. & Ghuysen, J.-M. Mechanism of acyl transfer by the class A serine β -lactamase of *Streptomyces albus* G. *Biochem J.* **1991**, *279*, 213-221.
- [73] Vijayakumar, S.; Ravishanker, G.; Pratt, R.F. & Beveridge, D.L. Molecular Modeling Simulations of a Class A beta-Lactamase; Structural and Mechanistic Implications. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 1722-1730.
- [74] Gibson, R.M.; Christensen, H. & Waley, S.G. Site-directed mutagenesis of β -lactamase I. *Biochem J.* **1990**, *272*, 613-619.
- [75] Escobar, W.A.; Tan, A.K.; Lewis, E.R. & Fink, A.L. Site-directed Mutagenesis of Glutamate-166 in β -Lactamase Leads to a Branched Path Mechanism. *Biochemistry* **1994**, *33*, 7619-7626.
- [76] Guillaume, G.; Vanhove, M.; Lamotte-Brasseur, J.; Ledent, P.; Jamin, M.; Joris, B. & Frère, J.-M. Site-directed Mutagenesis of Glutamate 166 in Two β -lactamases. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 5438-5444.
- [77] Escobar, W.A.; Tan, A.K. & Fink, A.L. Site-directed mutagenesis of beta-lactamase leading to accumulation of a catalytic intermediate. *Biochemistry* **1991**, *30*, 10783-10787.
- [78] Swarén, P.; Maveyraud, L.; Guillet, V.; Masson, J.-M.; Mourey, L. & Samama, J.-M. Electrostatic analysis of TEM1 β -lactamase: effect of substrate binding, steep potential gradients and consequences of site-directed mutations. *Structure* **1995**, *3*, 603-613.
- [79] Chen, C.C.; Rahil, J.; Pratt, R.F. & Herzberg, O. Structure of a phosphonate-inhibited beta-lactamase. An analog of the tetrahedral transition state/intermediate of beta-lactam hydrolysis. *J. Mol. Biol.* **1993**, *234*, 165-178.
- [80] Chen, C.H.C.; Smith, T.J.; Kapadia, G.; Wäsch, S.; Zawadzke, L.E.; Coulson, A. & Herzberg, O. Structure and Kinetics of the beta-lactamase mutants S70A and K73H from *Staphylococcus aureus* PC1. *Biochemistry* **1996**, *35*, 12251-12258.
- [81] Zawadzke, L.E.; Chen, C.H.C.; Banerjee, Z.L.; Wäsch, S.; Kapadia, G.; Moulton, J. & Herzberg, O. Elimination of the Hydrolytic Water Molecule in a Class A β -Lactamase Mutant: Crystal Structure and Kinetics. *Biochemistry* **1996**, *35*, 16475-16482.
- [82] Ishiguro, M. & Imajo, S. Modeling Study on an Hydrolytic Mechanism of Class A β -lactamases. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 2207-2218.
- [83] Díaz, N.; Suárez, D; Sordo, T.L. & Merz, K.M Acylation of Class A β -lactamases by Penicillins: A Theoretical Examination of the Role of Serine 130 and the β -lactam Carboxylate Group. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 11302-11313.
- [84] Herzberg, O. & Moulton, J. Bacterial Resistance to β -Lactam Antibiotics: Crystal Structure of β -Lactamase from *Staphylococcus aureus* PC1 at 2.5 Å Resolution. *Science* **1987**, *236*, 694-701.
- [85] Matagne, A.; Lamotte-Brasseur, J.; Dive, G.; Knox, J.R. & Frère, J.-M. Interactions between active-site-serine β -lactamases and compounds bearing a methoxy side chain on the α -face of the β -lactam ring: kinetic and molecular modelling studies. *Biochem. J.* **1993**, *293*, 607-611.
- [86] Castillo, R.; Silla, E. & Tunon, I. Role of Flexibility in Enzymatic Catalysis: Quantum Mechanical-Molecular Mechanical Study of the Deacylation Reaction in Class A β -Lactamases. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 1809-1816.
- [87] Brooks, B.R.; Bruccoleri, R.E.; Olafson, B.D.; States, D.J.; Swaminathan, S. & Karplus, M. CHARMM: A Program for Macromolecular Energy, Minimization, and Dynamics Calculations. *J. Comput. Chem.* **1983**, *4*, 187-217.

- [88] MacKerell, A.D.; Bashford, D.; Bellot, M.; Dunbrack, R.L.; Evanseck, J.D.; Field, M.J.; Fischer, S.; Gao, J.; Guo, J.; Ha, S.; Joseph-McCarthy, D.; Kuchnir, L.; Kuczera, K.; Lau, F.T.K.; Mattos, C.; Michnick, S.; Ngo, T.; Nguyen, D.T.; Prodhom, B.; Reiher, W.E.; Roux, B.; Schlenkrich, M.; Smith, J.C.; Stote, R.; Straub, J.; Watanabe, M.; Wiorkiewicz-Kuczera, J.; Yin, D. & Karplus, M. *J. Phys. Chem. B All-Atom Empirical Potential for Molecular Modeling and Dynamics Studies of Proteins* **1998**, *102*, 3586-3616.
- [89] Höltje, H.-D.; Sippl, W.; Rognan, D. & Folkers, G. *Molecular Modeling – Basic Principles and Applications*. (2nd edition) 2003 (Wiley-VCH Germany) 15-16.
- [90] Steinbach, P.J. & Brooks, B.R. New Spherical-Cutoff Methods for Long-Range Forces in Macromolecular Simulation *J. Comp. Chem.* **1994**, *15*, 667-683.
- [91] Ryckaert, J.-P.; Ciccotti, G.; Berendsen, H.J.C. & Van Gunsteren, W. Numerical Integration of the Cartesian Equations of Motion of a System with Constraints: Molecular Dynamics of n-Alkanes. *J. Comp. Chem.* **1977**, *23*, 327-341.
- [92] Boyd, R.H. Method for calculation of the conformation of minimum potential-energy and thermodynamic functions of molecules from empirical valence-force potentials-application to the cyclophanes. *J. Chem. Phys.* **1968**, *19*, 2574-2583.
- [93] Gaedt, K.; Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf **1998**
- [94] Schappach, A.; Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf **2000**
- [95] Brooks, C.L., III & Karplus, M. Solvent effects on protein motion and protein effects on solvent motion. Dynamics of the active site region of lysozyme. *J. Mol. Biol.* **1989**, *208*, 159-181.
- [96] Warshel, A. & Levitt, M. Theoretical studies of enzymic reactions: dielectric, electrostatic and steric stabilization of the carbonium ion in the reaction of lysozyme. *J. Mol. Biol.* **1976**, *103*, 227-249.
- [97] Bash, P.A., Field, M.J., Davenport, R.C., Petsko, G.A., Ringe, D. & Karplus, M. Computer Simulation and Analysis of the Reaction Pathway of Triosephosphate Isomerase. *Biochemistry* **1991**, *30*, 5826-5832.
- [98] Born, M. & Huang, K. *Dynamical Theory of Crystal Lattices* 1954 (Oxford University Press, London).
- [99] Schäfer III, H.F. *Methods in Electronic Structure Theory* In: Modern Theoretical Chemistry (Vol. 3,4) 1977 (Plenum Press, New York).
- [100] Szabo, A. & Ostlund, N.S. *Modern Quantum Chemistry* 1996 (Dover Publications Inc., New York).
- [101] Dewar, M.J.S., Zoebisch, E.G., Healy, E.F. & Stewart, J.J.P. AM1: A New General Purpose Quantum Mechanical Molecular Model. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 3902-3909.
- [102] Dewar, M.J.S. & Zoebisch, E.G. Extension of AM1 to the halogens. *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)* **1988**, *180*, 1-21.
- [103] Sadley, J. *Semi-Empirical methods of Quantum Chemistry* (Wiley) 1985.
- [104] Field, M.J.; Bash, P.A. & Karplus, M. A Combined Quantum Mechanical and Molecular Mechanical Potential for Molecular Dynamics Simulations. *J. Comput. Chem.* **1990**, *11*, 700-733.
- [105] Born, M. & Von Karman, T. Vibrations in Space-gratings (Molecular frequencies). *Physik Z.* **1912**, *13*, 297-309.

- [106] Brooks, C.L., III & Karplus, M. Deformable stochastic boundaries in molecular dynamics. *J. Chem. Phys.* **1983**, *79*, 6312
- [107] Davis, T.D.; Magiora, G.M. & Christofferson, R.E. *Ab Initio* Calculations on Large Molecules Using Molecular Fragments. Unrestrained Hartree-Fock Calculations on the Low-Lying States of Formaldehyde and Its Radical Ions. *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 7878-7887
- [108] Monard, G.; Loos, M.; Théry, v.; Baka, K. & Rivail, J.-M. Hybrid classical quantum force field for modeling very large molecules. *Int. J. Quant. Chem.* **1996**, *58*, 153-159.
- [109] Gao, J.; Amara, P.; Alhambra, C. & Field, M.J. A Generalized Hybrid Orbital (GHO) Approach for the Treatment of Link-Atoms using Combined QM/MM Potentials. *J. Phys. Chem.* **1998**, *102*, 4714-4721.
- [110] Singh, U.C. & Kollmann, P.A. A combined ab initio quantum mechanical and molecular mechanical method for carrying out simulations on complex molecular systems: applications to the CH₃Cl+Cl⁻ exchange reaction and gas phase protonation of polyethers. *J. Comput. Chem.* **1986**, *7*, 718-730.
- [111] Ridder, L.; Rietjens, M.C.M. I.; Vervoort, J. & Mulholland A.J. Quantum Mechanical/Molecular Mechanical Free Energy Simulations of the Glutathione S-Transferase (M1-1) Reaction with Phenanthrene 9,10-Oxide. *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 9926-9936.
- [112] Ridder, L., Mulholland A.J., Rietjens, M.C.M. I. & Vervoort, J. A Quantum Mechanical/Molecular Mechanical Study of the Hydroxylation of Phenol and Halogenated Derivatives by Phenol Hydroxylase. *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, 8728-8738.
- [113] Reuter, N.; Dejaegere, A.; Maignet, B. & Karplus, M. Frontier Bonds in QM/MM Methods: A Comparison of Different Approaches. *J. Phys. Chem. A*, **2000**, *104*, 1720-1735.
- [114] Stewart, J.J.P. MOPAC: A general purpose MNDO and MNDO/3 program. Quantum Chemistry Program Exchange 455, 1986, Vol. 6, No. 391.
- [115] Lee, C.; Yang, W. & Parr R. G. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys. Rev. B* **1988**, *37*, 785-789.
- [116] Becke, A. D. Density-functional exchange-energie approximation with correct asymptotic behavior. *J. Chem. Phys.* **1988**, *38*, 3098-3100.
- [117] Miehlich, B.; Savin, A.; Stoll, H. & Preuss, H. Results obtained with the correlation energy density functionals of Becke and Lee, Yang and Parr. *Chem. Phys. Let.* **1989**, *157*, 200-206.
- [118] Becke, A. D. A new mixing of Hatree-Fock and local density-functional theories. **1993**, *98*, 1372-1377.
- [119] Foresman, J.B. & Frisch, Æ. High Accuracy Energy Models. In: *Exploring Chemistry with Electronic Structure Methods*. 1996 (2nd Edition Gaussian Inc; Pittsburgh, USA) 155-161.
- [120] Scheiner, A.C.; Baker, J. & Andzelm, J.W. Molecular energies and properties from density functional theory: Exploring basis set dependence of Kohn - Sham equation using several density functionals. *J. Comput. Chem.* **1997**, *18*, 775.
- [121] Bauschlicher, C.W. Jr.; Ricca, A.; Partridge, H. & Langhoff, S.R. In: *Recent Advances in Desnity Functional Theory Methods. Part II* (ed. Chong, D.P.) 1995 (World Scientific, Singapore)

- [122] Eurenium, K.P.; Chatfield, D.C.; Brooks, B.R. & Hodoscek, M. Enzyme mechanisms with hybrid quantum and molecular mechanical potentials. I. Theoretical considerations. *Int. J. Quantum Chem.* **1996**, *60*, 1189-1200.
- [123] Berman, H.M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T.N.; Weissig, H.; Shindyalov, I.N.; & Bourne, P.E. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research* **2000**, *28*, 235-242.
- [124] Sutcliffe, J.G. Nucleotide sequence of the ampicillin resistance gen of *Escherichia Coli* plasmid pBR322. *Proc. Natl. Sci. USA*, **1978**, *75*, 3732-3736.
- [125] Ambler, R.P. & Scott, G.K. Partial amino acid sequence of penicillinase coded by *Escherichia Coli* plasmid R6K. *Proc. Natl. Sci. USA*, **1978**, *75*, 3737-3741.
- [126] Swarén, P.; Golemi, D.; Cabantous, S.; Bulychev, A.; Maveyraud, L.; Mobashery, S. & Samama, J.-M. X-Ray Structure of the Asn276Asp Variant of the *Escherichia Coli* Tem-1 Beta-Lactamase: Direct Observation of Electrostatic Modulation in Resistance to Inactivation by Clavulanic Acid. *Biochemistry* **1999**, *38*, 9570
- [127] Wang, X.; Minasov, G.; Blazquez, J.; Caselli, E.; Prati, F. & Shoichet, B. K. Recognition and Resistance in TEM β -Lactamase. *Biochemistry* **2003**; *42*; 8434-8444.
- [128] Nukaga, M.; Mayama, K.; Hujer, A.M.; Bonomo, R.A. & Knox J.R. Ultrahigh resolution structure of a class A beta-lactamase: on the mechanism and specificity of the extended-spectrum SHV-2 enzyme. *J. Mol. Biol.* **2003**, *328*, 289-301.
- [129] Shimamura, T.; Ibuka, A.; Fushinobu, S.; Wakagi, T.; Ishiguro, M.; Ishii, Y. & Hiroshi Matsuzawa, H. Acyl-Intermediate Structures of the Extended-Spectrum Class a Beta-Lactamase, Toho-1, in Complex with Cefotaxime, Cephalothin, and Benzylpenicillin. *J. Biol. Chem.* **2002**; *277*, 46601-46608.
- [130] Minasov, G.; Wang, X. & Shoichet, B.K. An Ultrahigh Resolution Structure of TEM1 β -Lactamase Suggests a Role for Glu166 as the General Base in Acylation. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 5333-5340.
- [131] Wang, X.; Minasov, G. & Shoichet, B.K. The Structural Bases of Antibiotic Resistance in the Clinically Derived Mutant Beta-Lactamases Tem-30, Tem-32 and Tem-34. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 32149-32156.
- [132] Fonze, E.; Vanhove, M.; Dive, G.; Sauvage, E.; Frere, J.-M. & Charlier, P. Crystal Structures of the *Bacillus licheniformis* BS3 Class A β -Lactamase and of the Acyl-Enzyme Adduct Formed with Cefoxitin. *Biochemistry*, **2002**, *41*, 1877-1885.
- [133] Schröder, S. & Thiel, W. Comparison of semiempirical and ab initio transition states. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 4422-4430.
- [134] Lewars, E. Semiempirical Calculations. In: *Computational Chemistry 2003* (Kluwer Academic Publishers, Dordrecht) 339-382.
- [135] Holder, A.J. AM1 In: *Encyclopedia of computational chemistry* 1998 (Wiley & Sons, West Sussex) 8-11.
- [136] Dexter, D.D. & van der Veen, J.M. Conformations of penicillin G: crystal structure of procaine penicillin G monohydrate and a refinement of the structure of potassium penicillin G. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.1* **1978**, 3185-3190
- [137] SYBYL 6.5, Tripos Inc., St. Louis, M, USA
- [138] Clark, M.; Kramer, R.D., III & van Opdenbosch, N. Validation of the general purpose Tripos 5.2 force-field. *J. Comput. Chem.* **1989**, *10*, 982-1012.
- [139] Hehre, W.J. Practical Strategies for Electronic Structure Calculations (Wavefunction Inc. Irvine) 1995.

- [140] 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. *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 11263-11267.
- [141] Jelsch, C.; Mourey, L., Masson, J.M. & Samama, J.P. *Protein Struct. Funct. Gen.* **1993**, *16*, 364-383.
- [142] Brunger, A.T. & Karplus, M. Polar hydrogen positions in proteins: empirical energy placement and neutron diffraction comparison. *Proteins*, **1988**, *4*, 148-156.
- [143] Brooks, .C.L. III; Brunger, A. & Karplus, M. Active site dynamics in protein molecules: a stochastic boundary molecular-dynamics approach. *Biopolymers* **1985**, *24*, 843-65.
- [144] Mulholland, A.J. & Richards, W.G. Acetyl-CoA Enolization in Citrate Synthase: A Quantum Mechanical/Molecular Mechanical (QM/MM) Study. *Proteins* **1997**, *27*, 9-25.
- [145] Cui, Q. & Karplus, M. Quantum Mechanical/ Molecular Mechanical Studies of the Triosephosphate Isomerase-Catalyzed Reaction: Verification of Methodology and Analysis of Reaction Mechanisms. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 1768-1798.
- [146] Ranaghan K. E.; Ridder, L.; Szefczyk, B.; Sokalski, W. A.; Hermann, J. C. & Mulholland, A. J. Insights into enzyme catalysis from QM/MM modelling: transition state stabilization in chorismate mutase. *Mol. Phys.* **2003**, *101*, 2695–2714.
- [147] Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D.; Impey, R. W. & Klein, M. L. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* **1983**, *79*, 926-935.
- [148] Dannenberg, J.J. Hydrogen bonds: a comparison of semiempirical and ab initio treatments. *J. Mol. Struct. (Theochem)* **1997**, *410*, 279-286.
- [149] Zheng, Y.-J. & Merz, K.M. Study of hydrogen bonding interactions relevant to biomolecular structure and function. *J. Comp. Chem.* **1992**, *13*, 1151-1169.
- [150] Jensen, F. *Semi-Empirical Methods* In: Introduction to computational chemistry 1999 (Wiley, West Sussex) 81-96.
- [151] Sim, F.; St-Amant, A., Papai, I. & Salahub, J. Gaussian density functional calculations on hydrogen-bonded systems. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 4391-4400.
- [152] Adamo, C. & Barone, V. In: Recent Advances in Density Functional Theory Methods. Part II (ed. Chong, D.P.) 1997 (World Scientific, Singapore).
- [153] Loszynski, M.; Ruisnka-Roszak, D. & Mack, H.-G. Hydrogen Bonding and Density Functional Calculations: The B3LYP Approach as the Shortest Way to MP2 Results. *J. Phys. Chem. A* **1998**, *102*, 2899-2903.
- [154] Jursic, B. S. Hydrogen radical and hydroxyl radical hydrogen abstraction reaction from formyl fluoride studied with hybrid density functional theory methods. *J. Mol. Struct. Theochem* **1998**, *434*, 53-58.
- [155] Truhlar, D. G. Chemical reaction theory: summarizing remarks. *Faraday Discuss.* **1998**, *110*, 521-535.
- [156] Kobayashi, Y.; Kamiya, M. & Hirao, K. The hydrogen abstraction reactions: a multireference Moller-Plesset perturbation (MRMP) theory study. *Chem. Phys. Lett.* **2000**, *319*, 695-700.
- [157] Dkhissi, A.; Adamowicz, L. & Maes, G. Density Functional Theory Study of the Hydrogen-Bonded Pyridine-H₂O Complex: A Comparison with RHF and MP2 Methods and with Experimental Data. *J. Phys. Chem. A* **2000**, *104*, 2112-2119.

- [158] Lynch, B. J. & Truhlar, D. G. How Well Can Hybrid Density Functional Methods Predict Transition State Geometries and Barrier Heights? *J. Phys. Chem. A* **2001**, *105*, 2936-2941.
- [159] Atanasov, B.P.; Mustafi, D. & Makinen, M.W. Protonation of the β -lactam nitrogen is the trigger event in the catalytic action of class A β -lactamases. *PNAS* **2000**, *97*, 3160-3165.
- [160] Mulliken, R. S. Electronic population analysis on LCAO molecular wave functions. *J. Chem. Phys.* **1955**, *23*, 1833-1844.
- [161] Goodford, P. J. A computational procedure for determining energetically favorable binding sites on biologically important macromolecules. *J. Med. Chem.* **1985**, *28*, 849-857.
- [162] Boobbyer, D. N.; Goodford, P. J.; McWhinnie, P. M. & Wade, R. C. New hydrogen-bond potentials for use in determining energetically favorable binding sites on molecules of known structure. *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 1083-1094.
- [163] Wade, R. C.; Clark, K. J. & Goodford, P. J. Further development of hydrogen bond functions for use in determining energetically favorable binding sites on molecules of known structure. 1. Ligand probe groups with the ability to form two hydrogen bonds. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 140-147.
- [164] Wade, R. C. & Goodford, P. J. Further development of hydrogen bond functions for use in determining energetically favorable binding sites on molecules of known structure. 2. Ligand probe groups with the ability to form more than two hydrogen bonds. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 148-156.
- [165] Ellerby, L.M.; Escobar, W.A.; Fink, A.L., Mitchinson, A.L. & Wells, J.A. The Role of Lysine-234 in β -Lactamase Catalysis Probed by Site-Directed Mutagenesis. *Biochemistry* **1990**, *29*, 5797-5806.
- [166] Lietz, E.J.; Truher, H.; Kahn, D.; Hokenson, Mark.J. & Fink, A.L. Lysine-73 is Involved in the Acylation and Deacylation of β -Lactamase. *Biochemistry* **2000**, *39*, 4971-4981.
- [167] Raquet, X., Lounnas, V., Lamotte-Brasseur, J., Frère, J.M. & Wade, R. pKa calculations for class A beta-lactamases: methodological and mechanistic implications. *Biophysical J.* **1997**, *73*, 2416-2426.
- [168] Damblon, C.; Raquet, X.; Lian, L.-Y.; Lamotte-Brasseur, J.; Fonze, E.; Charlier, P.; Gordon, C.K.R. & Frère, J.-M. The catalytic mechanism of β -lactamases: NMR titration of an active-site lysine residue of the TEM-1 enzyme. *Proc.Natl.Acad.Sci.* **1996**, *93*, 1747-1752.
- [169] Lamotte-Brasseur, J., Wade, R. & Raquet, X. pKa Calculations for Class A β -lactamases: Influence of substrate binding. *Protein Sci.* **1999**, *8*, 404-409.
- [170] Díaz, N.; Sordo, T.L., Merz, K.M. & Suárez, D. Insights into Acylation Mechanism of Class A β -lactamases from Molecular Dynamics Simulations of the TEM-1 Enzyme Complexed with Benzylpenicillin. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 672-684.
- [171] Hermann, J.C.; Ridder, L.; Mulholland, A.J. & Höltje, H.-D. Identification of Glu166 as the General Base in the Acylation Reaction of Class A β -Lactamases through QM/MM Modeling. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9590-9591.
- [172] Pauling, L. The nature of forces between large molecules of biological interest. *Nature* **1948**, *161*, 707-709.
- [173] Fisher, J.; Belasco, J.G.; Khosla, S. & Knowles J.R. β -Lactamase Proceeds via an Acyl-Enzyme Intermediate. Interaction of *Escherichia coli* RTEM Enzyme with Cefoxitin. *Biochemistry* **1980**, *19*, 2895-2900.

-
- [174] Dalbadie-McFarland, G.; Neitzel, J.J. & Richards, J.H. Active-Site Mutants of β -Lactamase: Use of Inactive Double Mutant To Study Requirements for Catalysis. *Biochemistry* **1986**, *25*, 332-338.
- [175] Osuna, J.; Viadiu, H.; Fink, A.L. & Soberon, X. A new TEM beta-lactamase double mutant with broadened specificity reveals substrate-dependent functional interactions. *J. Bio. Chem.* **1995**, *270*, 775-780.
- [176] Massova, I. & Kollman, A.P. pK_a , MM, and QM Studies of Mechanisms of β -Lactamases and Penicillin-Binding Proteins: Acylation Step. *J. Comput. Chem.* **2002**, *23*, 1559-1576.
- [177] Wladkowski, B.D.; Chenoweth, S.A.; Sanders, J.; Krauss, M. & Stevens, W.J. Acylation of β -lactams by Class A β -lactamase: An ab Initio Theoretical Study on the Effects of the Oxyanion Hole. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 6423-6431.
- [178] Pitarch, J.; Pascal-Ahuir, J.-L.; Silla, E.; Tunón, I. & Moliner, V. Analysis of a concerted mechanism in β -lactam enzymatic hydrolysis. A quantum mechanics/molecular mechanics study. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1999**, 1351-1356.
- [179] Pitarch, J.; Pascal-Ahuir, J.-L.; Silla, E. & Tunón, I. A quantum mechanics/molecular mechanics study of the acylation reaction of TEM1 β -lactamase and penicillinate. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **2000**, 761-767.

A Abkürzungen und Einheiten

Abkürzungen

bzw.	beziehungsweise
DFT	Dichtefunktionaltheorie
EC	<i>enzyme class</i>
et al.	<i>et alii</i>
evtl.	eventuell
HF	Hartree-Fock
i.d.R.	in der Regel
IC	<i>internal coordinates</i>
MD	Moleküldynamik
NMR	„ <i>nuclear magnetic resonance</i> “; Kernresonanzspektroskopie
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Hydroxoniumionen-Konzentration
pK _S	negativer dekadischer Logarithmus der Säurekonstante
QM/MM	quantenmechanisch/molekularmechanisch
RHF	<i>restricted</i> Hartree-Fock
RMS	<i>root mean square</i>
RMSD	<i>root mean square deviation</i>
s.	siehe
s.o.	siehe oben
u.a.	unter anderem
vdW	van der Waals
vgl.	vergleiche
z.B.	zum Beispiel

Einheiten

Å	Ångström, 10 ⁻¹⁰ m
K	Kelvin (0 K = -273,15 °C)
kcal	Kilokalorie (1 kcal = 4,186 kJ)
fs	Femtosekunde (1 fs = 10 ⁻¹⁵ s)
ps	Picosekunde (1 ps = 10 ⁻¹² s)
Hartree	1 Hartree = 627,5095 kcal mol ⁻¹

B Hardware

Silicon Graphics Workstations:

IRIS INDIGO² R10000

IRIS O2 R12000

Silicon Graphics Origin 2000

mit 38 R10000 Prozessoren

(am Rechenzentrum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf)

Linux Beowulf Cluster

a) mit 92 Intel-Prozessoren zwischen 500 und 2800 MHz

b) mit 96 Intel Xeon P4 2 GHz Prozessoren

(beide in der Fakultät für Theoretische Chemie der Universität Bristol)

C Software

CHARMM	Sehr umfangreiches Molecular-Modelling-Paket der Universität Harvard, das neben reinen Kraftfeldanwendungen auch eine Schnittstelle zum Programm MOPAC beinhaltet und so für QM/MM-Rechnungen zugänglich ist (Chemistry at Harvard Molecular Mechanics; http://yuri.harvard.edu/)
GRID	Programm zur Berechnung von Wechselwirkungsenergien von kleineren Molekülen mit Sonden, die funktionelle Gruppen repräsentieren
INSIGHT2000	Grafikmodul des Programmpakets INSIGHTII der Firma Accelrys zum Strukturaufbau und zur Visualisierung
JAGUAR	DFT/ <i>ab initio</i> – Programm der Firma SCHRÖDINGER, das sich als besonders schnell bei Anwendungen der Dichtefunktionaltheorie erwiesen hat
MOPAC	semiempirisches Rechenprogramm der Firma SCHRÖDINGER
MS-OFFICE	Microsoft - Excel, - Powerpoint und - Word
SYBYL	Molecular-Modelling-Paket der Firma TRIPOS mit Schnittstellen u.a. zu dem Programm MOPAC
VMD	Visualisierungsprogramm der Universität Illinois (Visual Molecular Dynamics; http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/)

D Aminosäuren: Ein- und Dreibuchstabencode

Aminosäure	Dreibuchstabencode	Einbuchstabencode
Alanin	Ala	A
Cystein	Cys	C
Asparaginsäure	Asp	D
Glutaminsäure	Glu	E
Phenylalanin	Phe	F
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Lysin	Lys	K
Leucin	Leu	L
Methionin	Met	M
Asparagin	Asn	N
Prolin	Pro	P
Glutamin	Gln	Q
Arginin	Arg	R
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Valin	Val	V
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y

E Energie-Terme des CHARMM-Kraffteldes

Die Gesamtenergie E_{ges} eines Moleküls ergibt sich im CHARMM-Kraffteld aus den Standardenergietermen:

$$E_{ges} = E_B + E_W + E_T + E_{oop} + E_{vdW} + E_{ele}$$

Dabei werden die einzelnen Terme wie folgt definiert:

Bindungslängen-energie E_B	$E_B = \sum k_d (d - d_0)^2$	k_d	Bindungslängen-Kraftkonstante (kcal mol ⁻¹ Å ⁻²)
		d	aktuelle Bindungslänge (Å)
		d_0	Referenz-Bindungslänge (Å)
Bindungswinkel-energie E_W	$E_W = k_\theta (\theta - \theta_0)^2$	k_θ	Bindungswinkel-Kraftkonstante (kcal mol ⁻¹ rad ⁻²)
		θ	aktueller Bindungswinkel (Grad)
		θ_0	Referenz-Bindungswinkel (Grad)
Torsionswinkel-energie E_T	$E_T = \sum k_T [1 + \cos(n\varphi - \varphi_0)]$	k_T	halbe Torsionsbarriere (kcal mol ⁻¹)
		n	Periodizität
		φ	aktueller Torsionswinkel (Grad)
		φ_0	Referenz-Torsionswinkel (0° oder 180°)
Out-of-plane-Energie E_{oop} (Improper Diederwinkelenergie)	$E_{oop} = \sum k_{oop} \chi^2$	k_{oop}	Kraftkonstante der out-of-plane-Energie
		χ	aktueller fiktiver Torsionswinkel
	$E_{oop} = k_{oop} [1 + \cos(n\chi - \chi_0)]$	χ_0	fiktiver Referenztorsionswinkel
		n	Periodizität
van-der-Waals-Energie E_{vdW}	$E_{vdW} = \sum \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6}$	A_{ij}	Konstante im repulsiven Term (kcal mol ⁻¹ Å ¹²)
		B_{ij}	Konstante im attraktiven Term (kcal mol ⁻¹ Å ⁶)
		r_{ij}	Abstand zwischen den Atomen i und j (Å)
Elektrostatische Energie E_{ele} (Coulomb-Potenzial)	$E_{ele} = \sum \frac{q_i q_j}{r_{ij} \epsilon}$	q_i, q_j	Ladungen der Atome i, j
		r_{ij}	Abstand zwischen den Atomen i und j (Å)
		ϵ	Dielektrizitätskonstante

F CHARMM-Eingabedateien

F1 Input-Files zur Generierung des QM/MM – Systems

F1.1 Bau des Systems bis zur Minimierung der Wasserstoffatome

```

* Charmm Input for Generating TEM1
* Protonated Lys73
*

bomlevel -2

READ RTF CARD NAME "~/PARAFILES/top_all22_prot.inp"
READ RTF CARD APPE NAME "~/PARAFILES/A_MECH_P_PAR/qmmm.rtf"
READ PARA CARD NAME "~/PARAFILES/par_all22_prot.inp"
READ PARA CARD APPE NAME "~/PARAFILES/A_MECH_P_PAR/qmmm.prm"

READ SEQU COOR RESID NAME "./TEM1.crd"
GENE TEM1 SETUP FIRST NONE LAST NONE

READ SEQU COOR RESID NAME "./QMMM.crd"
GENE QMMM SETUP

PATCH CONA TEM1 70 QMMM 523 SETUP
PATCH CONB TEM1 73 QMMM 523 SETUP
PATCH CONC TEM1 130 QMMM 523 SETUP
PATCH COND TEM1 166 QMMM 523 SETUP
PATCH DISU TEM1 77 TEM1 123 SETUP
PATCH ASPP TEM1 214 SETUP
!Building neutral terminal residues
!PATCH NTUN TEM1 26 SETUP
!PATCH CTUN TEM1 288 SETUP
!Building neutral terminal residues
PATCH NTER TEM1 26 SETUP
PATCH CTER TEM1 288 SETUP

AUTOGEN ANGLES DIHEDRALS

READ SEQU COOR RESID NAME "./CRWT.crd"
GENE CRWT SETUP NOANGLE NODIHEDRAL

READ COOR RESI CARD NAME "./TEM1.crd"
READ COOR RESI CARD NAME "./QMMM.crd"
READ COOR RESI CARD NAME "./CRWT.crd"

!Internal Coordinates for E166 from the natural enzyme 1BTL
READ COOR COMP PDB NAME "./tem1_btl_comp.pdb"
COOR INIT COMP SELE .NOT. ATOM TEM1 166 * END

IC FILL PRESERVE
IC PARAMETER
IC BUILD
HBUILD

COOR ORIEN MASS NORO SELE ATOM QMMM 523 OS11 END
WRITE COOR PDB NAME construct.pdb
OPEN WRITE UNIT 25 CARD NAME "construct.psf"

```

WRITE PSF UNIT 25 CARD

! Position of Active Water 290 has to be optimized after N166E Re-
mutation

CONS FIX SELE .NOT. ((ATOM QMMM 523 OH1) .OR. (ATOM QMMM 523 HW*)) END

MINI SD NSTE 2000 NPRI 500 TOLG 0.01 ATOM FSHIFT CDIE VDW VSHIFT -
CUTNB 13.0 CTOFNB 12.0 CTONNB 8.0 WMIN 0.8 EPS 1.0

MINI ABNR NSTE 2000 NPRI 500 TOLG 0.01 ATOM FSHIFT CDIE VDW VSHIFT -
CUTNB 13.0 CTOFNB 12.0 CTONNB 8.0 WMIN 0.8 EPS 1.0

COORD RMS SELE ((ATOM QMMM 523 OH1) .OR. (ATOM QMMM 523 HW*)) END

COORD RMS SELE TYPE N .OR. TYPE CA .OR. TYPE C .OR. TYPE O END

CONS FIX SELE NONE END

WRITE COOR PDB NAME d_water290mini.pdb

!Minimization of all water hydrogens

CONS FIX SELE .NOT. ((RESN TIP3 .AND. TYPE H*) .OR. (ATOM QMMM 523
OH1) .OR. (ATOM QMMM 523 HW*)) END

MINI SD NSTE 2000 NPRI 100 TOLG 0.01 ATOM FSHIFT CDIE VDW VSHIFT -
CUTNB 10.0 CTOFNB 9.0 CTONNB 8.0 WMIN 0.8 EPS 1.0

MINI ABNR NSTE 2000 NPRI 100 TOLG 0.01 ATOM FSHIFT CDIE VDW VSHIFT -
CUTNB 10.0 CTOFNB 9.0 CTONNB 8.0 WMIN 0.8 EPS 1.0

COORD RMS SELE .NOT. TYPE H* END

COORD RMS SELE (RESN TIP3 .AND. TYPE H*) END

COORD RMS SELE ((ATOM QMMM 523 OH1) .OR. (ATOM QMMM 523 HW*)) END

CONS FIX SELE NONE END

WRITE COOR PDB NAME e_crwt_water_H_mini.pdb

!Minimization of Hydrogens

CONS FIX SELE .NOT. TYPE H* END

COORD COPY COMP

!Quantum mechanical treated atoms

QUANTUM SELE SEGID QMMM END -

REMO AM1 ITRM 1000 CHARGE -1.0 EXGR

MINI SD NSTE 2000 NPRI 100 TOLG 0.01 ATOM FSHIFT CDIE VDW VSHIFT -
CUTNB 10.0 CTOFNB 9.0 CTONNB 8.0 WMIN 0.8 EPS 1.0

MINI ABNR NSTE 2000 NPRI 100 TOLG 0.01 ATOM FSHIFT CDIE VDW VSHIFT -
CUTNB 10.0 CTOFNB 9.0 CTONNB 8.0 WMIN 0.8 EPS 1.0

WRITE COOR PDB NAME f_h_mini.pdb

WRITE COOR CARD NAME f_h_mini.crd

STOP

F1.2 Hydratisierung, Equilibrierung und Formung des Systems

```
* Charmm file for Hydratisation of TEM1
* 2nd round
*

bomlevel -2

READ RTF CARD NAME "~/PARAFILES/top_all22_prot.inp"
READ RTF CARD APPE NAME "~/PARAFILES/A_MECH_P_PAR/qmmm.rtf"
READ PARA CARD NAME "~/PARAFILES/par_all22_prot.inp"
READ PARA CARD APPE NAME "~/PARAFILES/A_MECH_P_PAR/qmmm.prm"

! H-minimized and solvated enzyme
READ PSF CARD NAME "equi_solv_1_4mini.psf"
READ COOR CARD NAME "equi_solv_1_4mini.crd"

!Adding solvent waters
READ SEQU TIP3 2742
GENE SOL1 SETUP NOANG NODI
READ COOR CARD RESI NAME "~/PARAFILES/watbox26.crd"

! Centering the waterbox
COOR AXIS SELE SEGID SOLV END SELE ATOM QMMM 523 OS11 END
COOR TRANS AXIS DIST ?RAXI FACT 1.0 SELE SEGID SOLV END
WRITE COOR PDB NAME x_aqua_add_1.pdb

!Deletion of residues further away than 18A
delete atom sele .not. .byres. ( ATOM QMMM 523 OS11 .AROUND. 18.0 ) END
WRITE COOR PDB NAME x_aqua_add_2_el_res.pdb

!Deleting Overlapping Waters
DELETE ATOM SELE .BYRES. (SEGID SOL* .AND. TYPE OH2 .AND. -
  ((.NOT. SEGID SOL* .AND. .NOT. HYDROGEN) -
  .AROUND. 2.6)) END
WRITE COOR PDB NAME x_aqua_add_3_el_solv.pdb

!Deleting waters further away than 6.5A from heavy atoms
DELETE ATOM SELE .BYRES. (SEGID SOL* .AND. TYPE OH2 .AND. .NOT. -
  ((.NOT. SEGID SOL* .AND. .NOT. HYDROGEN) -
  .AROUND. 6.5)) END
WRITE COOR PDB NAME x_aqua_add_4_del.pdb
WRITE COOR CARD NAME x_aqua_add_4_del.crd

CONS FIX SELE .not. SEGID SOL* END

!Minimization of solvent water molecules
MINI SD NSTE 20000 NPRI 1000 TOLG 0.01 ATOM FSHIFT CDIE VDW VSHIFT -
  CUTNB 13.0 CTONNB 8.0 CTOFNB 12.0 WMIN 0.8 EPS 1.0
MINI ABNR NSTE 8000 NPRI 500 TOLG 0.01 ATOM FSHIFT CDIE VDW VSHIFT -
  CUTNB 13.0 CTONNB 8.0 CTOFNB 12.0 WMIN 0.8 EPS 1.0

WRITE COOR PDB NAME x_mini_1_solv.pdb
WRITE COOR CARD NAME x_mini_1_solv.crd

CONS FIX SELE NONE END
```

!Minimization of Hydrogens

COOR COPY COMP

CONS FIX SELE .not. Type H* end

MINI SD NSTE 2000 NPRI 500 TOLG 0.01 ATOM FSHIFT CDIE VDW VSHIFT -
CUTNB 10.0 CTOFNB 9.0 CTONNB 8.0 WMIN 0.8 EPS 1.0

MINI ABNR NSTE 2000 NPRI 500 TOLG 0.01 ATOM FSHIFT CDIE VDW VSHIFT -
CUTNB 10.0 CTOFNB 9.0 CTONNB 8.0 WMIN 0.8 EPS 1.0

COOR RMS SELE .NOT. TYPE H* END

COOR RMS SELE TYPE H* END

CONS FIX SELE NONE END

WRITE COOR PDB NAME x_mini_2_h.pdb

WRITE COOR CARD NAME x_mini_2_h.crd

OPEN WRITE UNIT 25 CARD NAME "x_mini2_h.psf"

WRITE PSF UNIT 25 CARD

!MD-RUN for waters

!

!Definition of reaction and buffer regions

DEFI BUFFER SELE .NOT. (POINT 0.0 0.0 0.0 CUT 14.0 .or. RESN TIP3)
END

DEFI BUF1 SELE BUFFER .AND. POINT 0.0 0.0 0.0 CUT 15.0 END

DEFI BUF2 SELE BUFFER .AND. POINT 0.0 0.0 0.0 CUT 16.0 -
.AND. .NOT. BUF1 END

DEFI BUF3 SELE BUFFER .AND. POINT 0.0 0.0 0.0 CUT 17.0 -
.AND. .NOT. BUF1 .AND. .NOT. BUF2 END

DEFI BUF4 SELE BUFFER .AND. .NOT. (BUF1 .OR. BUF2 .OR. BUF3) END

DEFINE MAIN SELE TYPE N .OR. TYPE CA .OR. TYPE C .OR. TYPE O END

DEFINE BETA SELE TYPE CB .AND. .NOT. SEGID QMMM END

DEFINE GAMMA SELE TYPE CG .OR. TYPE OG .OR. TYPE SG END

DEFINE REST SELE .NOT. (MAIN .OR. BETA .OR. GAMMA .OR. RESN TIP3 -
.OR. TYPE H*) END

CONS HARM SELE BUF1 .AND. MAIN END FORCE 0.27

CONS HARM SELE BUF1 .AND. BETA END FORCE 0.24

CONS HARM SELE BUF1 .AND. GAMMA END FORCE 0.23

CONS HARM SELE BUF1 .AND. REST END FORCE 0.22

CONS HARM SELE BUF2 .AND. MAIN END FORCE 0.85

CONS HARM SELE BUF2 .AND. BETA END FORCE 0.78

CONS HARM SELE BUF2 .AND. GAMMA END FORCE 0.73

CONS HARM SELE BUF2 .AND. REST END FORCE 0.69

CONS HARM SELE BUF3 .AND. MAIN END FORCE 1.44

CONS HARM SELE BUF3 .AND. BETA END FORCE 1.31

CONS HARM SELE BUF3 .AND. GAMMA END FORCE 1.22

CONS HARM SELE BUF3 .AND. REST END FORCE 1.18

CONS HARM SELE BUF4 .AND. MAIN END FORCE 1.70

CONS HARM SELE BUF4 .AND. BETA END FORCE 1.55

CONS HARM SELE BUF4 .AND. GAMMA END FORCE 1.45

CONS HARM SELE BUF4 .AND. REST END FORCE 1.40

!Quantum mechanical treated atoms

QUANTUM SELE SEGID QMMM END -

REMO AM1 ITRM 1000 CHARGE -1.0 EXGR

```
CONS FIX SELE .not. SEGID SOL* END

SHAKE BONH
!Friction coefficients
SCALAR FBETA SET 62 SELE RESN TIP3 .AND. TYPE OH2 END

COOR AXIS select ATOM QMMM 523 OS11 END

!Read in deformable boundary potential for waters.
OPEN READ UNIT 4 CARD NAME "~/PARAFILES/wat18.pot"
SBOUND READ UNIT 4

!Apply boundary potential
sboundary set xref ?XAXI yref ?YAXI zref ?ZAXI -
  assign 1 selection segid SOL* .and. -
  rename TIP3 - .and. type O* end

OPEN WRITE UNIT 31 CARD NAME "x_solv_equi_1.rst"
OPEN WRITE UNIT 32 FILE NAME "x_solv_equi_1.dcd"
OPEN WRITE UNIT 33 FILE NAME "x_solv_equi_1.dvl"
OPEN WRITE UNIT 34 CARD NAME "x_solv_equi_1.ene"

!Equilibration of the System
DYNA LEAP LANGEVIN STRT NSTEP 10000 TIMESTP 0.001 -
  IPRFRQ 1 IHTFRQ 0 IEQFRQ 0 NTRFRQ 0 -
  IUNREA 0 IUNWRI 31 IUNCRD 32 IUNVEL 33 KUNIT 34 -
  NPRINT 500 NSAVC 500 NSAVV 500 IHBFRQ 0 INBFRQ -1 -
  ISVFRQ 5000 ILBFRQ 50 RBUFFER 0.0 TBATH 310.0 TSTRUC 0 -
  ATOM FSHIFT VDW VSHIFT WMIN 0.002 CDIE EPS 1.0 -
  CUTNB 13.0 CTONNB 8.0 CTOFNB 12.0 -
  FIRSST 310.0 FINALT 310.0 ECHECK 8000.0 -
  IASORS 0 IASVEL 1 ISCVEL 0 ICHECW 1 TWINDH 10.0 TWINDL -10.0

CONS FIX SELE NONE END
CONS HARM CLEAR

WRITE COOR PDB NAME x_solv_equi_1.pdb
WRITE COOR CARD NAME x_solv_equi_1.crd
WRITE PSF CARD NAME test.psf
OPEN WRITE UNIT 25 CARD NAME "x_solv_equi_1.psf"
WRITE PSF UNIT 25 CARD

STOP
```

F2 Beispiel zur Berechnung einer Achse für eine Potenzialhyperfläche definiert durch zusammengesetzten Reaktionskoordinaten

```

* Charmm file for calculating a PES for
* Lactam-ring Cleavage; protonation of lactam-nitrogen and Ser130
*

bomlevel -2

READ RTF CARD NAME "~/PARAFILES/top_all122_prot.inp"
READ RTF CARD APPE NAME "~/PARAFILES/A_MECH_P_PAR/qmmm.rtf"
READ PARA CARD NAME "~/PARAFILES/par_all122_prot.inp"
READ PARA CARD APPE NAME "~/PARAFILES/A_MECH_P_PAR/qmmm.prm"

READ PSF CARD NAME "../qm_relaxation-.psf"
READ COOR CARD NAME "../qm_relaxation.crd"

DEFI BUFFER SELE .NOT. (POINT 0.11662 -0.01190 -0.12699 CUT 14.0 .or.
RESN TIP3 ) END
DEFI BUF1 SELE BUFFER .AND. POINT 0.11662 -0.01190 -0.12699 CUT 15.0
END
DEFI BUF2 SELE BUFFER .AND. POINT 0.11662 -0.01190 -0.12699 CUT 16.0 -
.AND. .NOT. BUF1 END
DEFI BUF3 SELE BUFFER .AND. POINT 0.11662 -0.01190 -0.12699 CUT 17.0 -
.AND. .NOT. BUF1 .AND. .NOT. BUF2 END
DEFI BUF4 SELE BUFFER .AND. .NOT. (BUF1 .OR. BUF2 .OR. BUF3) END
DEFINE MAIN SELE TYPE N .OR. TYPE CA .OR. TYPE C .OR. TYPE O END
DEFINE BETA SELE TYPE CB .AND. .NOT. SEGID QMMM END
DEFINE GAMMA SELE TYPE CG .OR. TYPE OG .OR. TYPE SG END
DEFINE REST SELE .NOT. (MAIN .OR. BETA .OR. GAMMA .OR. RESN TIP3 -
.OR. TYPE H*) END

CONS HARM SELE BUF1 .AND. MAIN END FORCE 0.27
CONS HARM SELE BUF1 .AND. BETA END FORCE 0.24
CONS HARM SELE BUF1 .AND. GAMMA END FORCE 0.23
CONS HARM SELE BUF1 .AND. REST END FORCE 0.22
CONS HARM SELE BUF2 .AND. MAIN END FORCE 0.85
CONS HARM SELE BUF2 .AND. BETA END FORCE 0.78
CONS HARM SELE BUF2 .AND. GAMMA END FORCE 0.73
CONS HARM SELE BUF2 .AND. REST END FORCE 0.69
CONS HARM SELE BUF3 .AND. MAIN END FORCE 1.44
CONS HARM SELE BUF3 .AND. BETA END FORCE 1.31
CONS HARM SELE BUF3 .AND. GAMMA END FORCE 1.22
CONS HARM SELE BUF3 .AND. REST END FORCE 1.18
CONS HARM SELE BUF4 .AND. MAIN END FORCE 1.70
CONS HARM SELE BUF4 .AND. BETA END FORCE 1.55
CONS HARM SELE BUF4 .AND. GAMMA END FORCE 1.45
CONS HARM SELE BUF4 .AND. REST END FORCE 1.40

! Definition of sp2-hybridized Nitrogen of Peptide-bond
CONS DIHEdral SELE ATOM QMMM 523 C6 .OR. ATOM QMMM 523 N14 .OR. -
ATOM QMMM 523 C15 .OR. ATOM QMMM 523 C17 END -
FORCE 30.0 MIN 180.0 PERIoD 2
CONS DIHEdral SELE ATOM QMMM 523 N14 .or. ATOM QMMM 523 C6 -
.or. ATOM QMMM 523 HN14 .OR. ATOM QMMM 523 C15 END -
FORCE 50.0 MIN 0.0 PERIoD 0

```

```
!Quantum mechanical treated atoms
QUANTUM SELE SEGID QMMM END -
  REMO AM1 ITRM 1000 CHARGE -1.0 EXGR

!Lactam Ring Cleavage (Q)
SET Q 7
CALC CQ 1.53+(0.1*@Q)

!Ser130 -> Beta Lactam N (S) !OS21HN4 (0.98) - N4HN4 (1.98)
!K73 -> Ser130 (T) !HK14NK11 (1.03) - HK14OS21 (2.14)
SET ST 1
SET CST -1.7 !-2.11

! Coordinates
READ COOR CARD NAME "qlg2_q@Q_st0.crd"

!S1 SRDs HN4-OS21 - HN4-N4
!OS21-HN4
COOR STAT SELE ATOM QMMM 523 OS21 END
set x1 ?XAVE
set y1 ?YAVE
set z1 ?ZAVE
COOR STAT SELE ATOM QMMM 523 HN4 END
set x2 ?XAVE
set y2 ?YAVE
set z2 ?ZAVE
CALC distancequad1 (@x2-@x1)*(@x2-@x1)
CALC distancequad2 (@y2-@y1)*(@y2-@y1)
CALC distancequad3 (@z2-@z1)*(@z2-@z1)
CALC distancequad (@distancequad1 + @distancequad2)
CALC OS21HN4 SQRT (@distancequad + @distancequad3)
!N4-HN4
COOR STAT SELE ATOM QMMM 523 N4 END
set x1 ?XAVE
set y1 ?YAVE
set z1 ?ZAVE
COOR STAT SELE ATOM QMMM 523 HN4 END
set x2 ?XAVE
set y2 ?YAVE
set z2 ?ZAVE
CALC distancequad1 (@x2-@x1)*(@x2-@x1)
CALC distancequad2 (@y2-@y1)*(@y2-@y1)
CALC distancequad3 (@z2-@z1)*(@z2-@z1)
CALC distancequad (@distancequad1 + @distancequad2)
CALC N4HN4 SQRT (@distancequad + @distancequad3)
!S2 SRDs HK14-NK11 - HK14-OS21
!HK14-NK11
COOR STAT SELE ATOM QMMM 523 NK11 END
set x1 ?XAVE
set y1 ?YAVE
set z1 ?ZAVE
COOR STAT SELE ATOM QMMM 523 HK14 END
set x2 ?XAVE
set y2 ?YAVE
set z2 ?ZAVE
CALC distancequad1 (@x2-@x1)*(@x2-@x1)
CALC distancequad2 (@y2-@y1)*(@y2-@y1)
CALC distancequad3 (@z2-@z1)*(@z2-@z1)
CALC distancequad (@distancequad1 + @distancequad2)
```

```

CALC HK14NK11 SQRT (@distancequad + @distancequad3)
!HK14-OS21
COOR STAT SELE ATOM QMMM 523 OS21 END
set x1 ?XAVE
set y1 ?YAVE
set z1 ?ZAVE
COOR STAT SELE ATOM QMMM 523 HK14 END
set x2 ?XAVE
set y2 ?YAVE
set z2 ?ZAVE
CALC distancequad1 (@x2-@x1)*(@x2-@x1)
CALC distancequad2 (@y2-@y1)*(@y2-@y1)
CALC distancequad3 (@z2-@z1)*(@z2-@z1)
CALC distancequad (@distancequad1 + @distancequad2)
CALC HK14OS21 SQRT (@distancequad + @distancequad3)
!Q
!C7-N4
COOR STAT SELE ATOM QMMM 523 C7 END
set x1 ?XAVE
set y1 ?YAVE
set z1 ?ZAVE
COOR STAT SELE ATOM QMMM 523 N4 END
set x2 ?XAVE
set y2 ?YAVE
set z2 ?ZAVE
CALC distancequad1 (@x2-@x1)*(@x2-@x1)
CALC distancequad2 (@y2-@y1)*(@y2-@y1)
CALC distancequad3 (@z2-@z1)*(@z2-@z1)
CALC distancequad (@distancequad1 + @distancequad2)
CALC C7N4 SQRT (@distancequad + @distancequad3)

SKIP RESD HARM CDIH
ENERGY ATOM FSHIFT CDIE VDW VSHIFT -
      CUTNB 13.0 CTOFNB 12.0 CTONNB 8.0 WMIN 0.8 EPS 1.0
OPEN WRITE CARD UNIT 26 NAME qlg2_q@Q_energy.txt
WRITE TITLE UNIT 26
*00 @Q 0 @CQ -2.11 ?ENER ?QMEL @OS21HN4 @N4HN4 @HK14NK11 @HK14OS21
*

OPEN WRITE UNIT 11 FILE NAME qlg2_q@Q.dcd
TRAJ IWRITE 11 NFILE 99
SET F 0

LABEL LOOP
SKIP EXCL RESD HARM CDIH

CALC 1N4HN4 @N4HN4 - 0.001
CALC 1OS21HN4 @OS21HN4 + 0.001
CALC 1HK14NK11 @HK14NK11 + 0.001
CALC 1HK14OS21 @HK14OS21 - 0.001

!Q
RESDISTANCE RESET KVAL 5000.0 RVAL @CQ -
      1.0 QMMM 523 C7 QMMM 523 N4
!ST
RESDISTANCE KVAL 5000.0 RVAL @CST -
      1.0 QMMM 523 HN4 QMMM 523 OS21 -1.0 QMMM 523 N4 QMMM 523 HN4 -
      1.0 QMMM 523 HK14 QMMM 523 NK11 -1.0 QMMM 523 HK14 QMMM 523
OS21 -

```

```
!S1 SRs
!Secure Restraint S1_I N4-HN4 should decrease
RESD KVAL 50000.0 RVAL @1N4HN4 POSITIVE -
      1.0 QMMM 523 N4 QMMM 523 HN4
!Secure Restraint S1_II OS21-HN4 should increase
RESD KVAL 50000.0 RVAL @1OS21HN4 NEGATIVE -
      1.0 QMMM 523 OS21 QMMM 523 HN4

!S2 SRs
!Secure Restraint S2_I HK14-OS21 should decrease
RESD KVAL 50000.0 RVAL @1HK14OS21 POSITIVE -
      1.0 QMMM 523 HK14 QMMM 523 OS21
!Secure Restraint YII HK14-NK11 should increase
RESD KVAL 50000.0 RVAL @1HK14NK11 NEGATIVE -
      1.0 QMMM 523 HK14 QMMM 523 NK11

PRINT RESDISTANCES

MINI ABNR NSTE 8000 NPRI 50 TOLG 0.01 ATOM FSHIFT CDIE VDW VSHIFT -
      CUTNB 13.0 CTOFNB 12.0 CTONNB 8.0 WMIN 0.8 EPS 1.0

PRINT RESDISTANCES

TRAJ WRITE

!Distances
!S1 SRDs HN4-OS21 - HN4-N4
!OS21-HN4
COOR STAT SELE ATOM QMMM 523 OS21 END
set x1 ?XAVE
set y1 ?YAVE
set z1 ?ZAVE
COOR STAT SELE ATOM QMMM 523 HN4 END
set x2 ?XAVE
set y2 ?YAVE
set z2 ?ZAVE
CALC distancequad1 (@x2-@x1)*(@x2-@x1)
CALC distancequad2 (@y2-@y1)*(@y2-@y1)
CALC distancequad3 (@z2-@z1)*(@z2-@z1)
CALC distancequad (@distancequad1 + @distancequad2)
CALC OS21HN4 SQRT (@distancequad + @distancequad3)
!N4-HN4
COOR STAT SELE ATOM QMMM 523 N4 END
set x1 ?XAVE
set y1 ?YAVE
set z1 ?ZAVE
COOR STAT SELE ATOM QMMM 523 HN4 END
set x2 ?XAVE
set y2 ?YAVE
set z2 ?ZAVE
CALC distancequad1 (@x2-@x1)*(@x2-@x1)
CALC distancequad2 (@y2-@y1)*(@y2-@y1)
CALC distancequad3 (@z2-@z1)*(@z2-@z1)
CALC distancequad (@distancequad1 + @distancequad2)
CALC N4HN4 SQRT (@distancequad + @distancequad3)
!S2 SRDs HK14-NK11 - HK14-OS21
!HK14-NK11
COOR STAT SELE ATOM QMMM 523 NK11 END
set x1 ?XAVE
```

```
set y1 ?YAVE
set z1 ?ZAVE
COOR STAT SELE ATOM QMMM 523 HK14 END
set x2 ?XAVE
set y2 ?YAVE
set z2 ?ZAVE
CALC distancequad1 (@x2-@x1)*(@x2-@x1)
CALC distancequad2 (@y2-@y1)*(@y2-@y1)
CALC distancequad3 (@z2-@z1)*(@z2-@z1)
CALC distancequad (@distancequad1 + @distancequad2)
CALC HK14NK11 SQRT (@distancequad + @distancequad3)
!HK14-OS21
COOR STAT SELE ATOM QMMM 523 OS21 END
set x1 ?XAVE
set y1 ?YAVE
set z1 ?ZAVE
COOR STAT SELE ATOM QMMM 523 HK14 END
set x2 ?XAVE
set y2 ?YAVE
set z2 ?ZAVE
CALC distancequad1 (@x2-@x1)*(@x2-@x1)
CALC distancequad2 (@y2-@y1)*(@y2-@y1)
CALC distancequad3 (@z2-@z1)*(@z2-@z1)
CALC distancequad (@distancequad1 + @distancequad2)
CALC HK14OS21 SQRT (@distancequad + @distancequad3)
!Q SRDs
!C7-N4
COOR STAT SELE ATOM QMMM 523 C7 END
set x1 ?XAVE
set y1 ?YAVE
set z1 ?ZAVE
COOR STAT SELE ATOM QMMM 523 N4 END
set x2 ?XAVE
set y2 ?YAVE
set z2 ?ZAVE
CALC distancequad1 (@x2-@x1)*(@x2-@x1)
CALC distancequad2 (@y2-@y1)*(@y2-@y1)
CALC distancequad3 (@z2-@z1)*(@z2-@z1)
CALC distancequad (@distancequad1 + @distancequad2)
CALC C7N4 SQRT (@distancequad + @distancequad3)

SKIP RESD HARM CDIH
ENERGY
OPEN APPEND CARD UNIT 26 NAME qlg2_q@Q_energy.txt
WRITE TITLE UNIT 26
*@F @Q @ST @CQ @CST ?ENER ?QMEL @OS21HN4 @N4HN4 @HK14NK11 @HK14OS21
*
CLOSE UNIT 26

!WRITE COOR CARD NAME qlg2_q@Q_st@ST.crd

INCR F by 1
INCR ST by 1
INCR CST by 0.4
IF CST LT 3 GOTO LOOP

STOP
```

F3 Python-Skripte

F3.1 alle2grid.py

Das Skript alle2grid.py schreibt sämtliche durch CHARMM berechnete Energien (s. Anhang F2) in eine Matrix die man mit MS-Excel einlesen kann, um Potenzialflächen zu visualisieren und auszuwerten.

```
#!/usr/freeware/bin/python2

import string
import os

os.system('cat filename_variable*.txt > all_energy.txt')

ausgabefile = open('matrix_real.txt', 'w')
ausgabefile2 = open('matrix_rel.txt', 'w')
y_s, y_e = 0, 18
z_s, z_e = 0, 19
yzaehler = z_s
mmc_energy = -6299.25212

ausgabefile.write("%12s" % ("x"+str(y_s)))
ausgabefile.close()
ausgabefile = open('matrix_real.txt', 'a')
ausgabefile2.write("%12s" % ("x"+str(y_s)))
ausgabefile2.close()
ausgabefile2 = open('matrix_rel.txt', 'a')

for y in range(y_s+1, y_e+1):
    ausgabefile.write("%9s" % ("x"+str(y)))

for y in range(y_s+1, y_e+1):
    ausgabefile2.write("%9s" % ("x"+str(y)))

while yzaehler <= z_e:
    ausgabefile.write("\n%-3s" % ("yz"+str(yzaehler)))
    ausgabefile2.write("\n%-3s" % ("yz"+str(yzaehler)))
    xzaehler = y_s
    while xzaehler <= y_e:
        energyfile = open('all_energy.txt', 'r')
        vorhanden = 0
        for line in energyfile.readlines():
            spalten = string.split(line)
            if spalten[1] == str(xzaehler) and spalten[2] ==
str(yzaehler):
                if string.find(spalten[5], '.') != -1:
                    value = string.replace(spalten[5], '.', ',')
                else:
                    value = spalten[5] + ',0'
                ausgabefile.write("%9s" % value)
                value_real = float(spalten[5]) - mmc_energy
                valuepoint = ("%4.2f" %value_real)
                if string.find(str(valuepoint), '.') != -1:
                    value = string.replace(str(valuepoint), '.', ',')
                else:
                    value = str(valuepoint) + ',0'
```

```
        ausgabefile2.write("%9s" % value)
        vorhanden = 1
    energyfile.close()
    if vorhanden == 0:
        ausgabefile.write("%9s" % " ")
        ausgabefile2.write("%9s" % " ")
        print str(xzaehler)+'_'+str(yzaehler)+'fehlt!'
        xzaehler =xzaehler+1
        yzaehler =yzaehler+1

ausgabefile.write("\n")
ausgabefile.close()
ausgabefile2.write("\n")
ausgabefile2.close()
```

F3.2 convert_crd2jag.py

Mit dem Skript `convert_crd2jag.py` können aus CRD-Files Jaguar-Input-Files für Einzelpunktrechnungen generiert werden.

```
#!/usr/freeware/bin/python2

import string

Y = 0
Z = 0
while Z <= 20:
    while Y <= 18:
        try:
            crdfile = open('x'+str(Y)+'_yz'+str(Z)+'_mini.crd', 'r')
            jaginpfiler = open('x'+str(Y)+'_yz'+str(Z)+'.in', 'w')
            jaginpfiler.write("Python-generiertes Jaguar
Inputfile\n&gen\nidft=22111\nnigeopt=0\nnmolchg=-1\nnbasis=6-
31G*+\nip6=2\nip11=2\nip17=2\nip24=2\n&\n&zmat\n")
            for line in crdfile.readlines():
                spalte = string.split(line)
                try:
                    if spalte[1] != '1':
                        pass
                    else:
                        jaginpfiler.write("%2s%18s%16s%16s\n" %
(spalte[3][0], spalte[4], spalte[5], spalte[6]))
                except IndexError:
                    pass
            jaginpfiler.write("&\n")
        except IOError:
            print 'x'+str(Y)+'_yz'+str(Z)+' fehlt!!!'
        Y +=1
    Y = 0
    Z +=1
```

F3.3 grid_corr.py

Das Skript grid_corr.py extrahiert aus allen Jaguar-Output-Files die Energie (dort angegeben in Hartrees) rechnet diese in kcal mol⁻¹ um, und erstellt nach der Korrektur der im übergeordneten Ordner enthaltenen AM1-Energien eine neue Matrix für MS-Excel

```
#!/usr/freeware/bin/python2

import string

y_s, y_e = 0, 28
z_s, z_e = 0, 15
yzaehler = z_s

global mmc_b3lyp_energy
global mmc_qmmm_energy
global mmc_am1_energy
global mmc_energy
global qmmm_energy
global b3lyp_energy
global am1_energy

# Berechnung der MMC Energy (y0_z0)
mmc_energy = -1154494.0074376634

ausgabefile = open('matrix_rel_corr.txt', 'w')
ausgabefile.write("%12s" % ("p"+str(y_s)))
ausgabefile.close()
ausgabefile = open('matrix_rel_corr.txt', 'a')

ausgabefile2 = open('mpatrix_rel_corr.txt', 'w')
ausgabefile2.write("%12s" % ("p"+str(y_s)))
ausgabefile2.close()
ausgabefile2 = open('mpatrix_rel_corr.txt', 'a')

ausgabefile3 = open('mkatrix_rel_corr.txt', 'w')
ausgabefile3.write("%12s" % ("p"+str(y_s)))
ausgabefile3.close()
ausgabefile3 = open('mkatrix_rel_corr.txt', 'a')

for y in range(y_s+1, y_e+1):
    ausgabefile.write("%9s" % ("p"+str(y)))
    ausgabefile2.write("%9s" % ("p"+str(y)))
    ausgabefile3.write("%9s" % ("p"+str(y)))

while yzaehler <= z_e:
    ausgabefile.write("\n%-3s" % ("r"+str(yzaehler)))
    ausgabefile2.write("\n%-3s" % ("r"+str(yzaehler)))
    ausgabefile3.write("\n%-3s" % ("r"+str(yzaehler)))
    xzaehler = y_s
    while xzaehler <= y_e:
        energyfile = open('../all_energy.txt', 'r')
        vorhanden = 0
        for line in energyfile.readlines():
            spalten = string.split(line)
            if spalten[1] == str(xzaehler) and spalten[2] ==
str(yzaehler):
```

```
        qmmm_energy = float(spalten[5])
    else:
        pass
    energyfile.close()
    try:
        jagoutfile =
open('p'+str(xzaehler)+'_r'+str(yzaehler)+'.out')
        for line in jagoutfile.readlines():
            spalte = string.split(line)
            try:
                if spalte[0] != 'SCFE:':
                    pass
                else:
                    b3lyp_energy = float(spalte[4])*627.5095
                    vorhanden = 1
            except IndexError:
                pass
        jagoutfile.close()
    except IOError:
        print 'p'+str(xzaehler)+'_r'+str(yzaehler)+'.out fehlt!!!'
    aml_energyfile = open('aml_energy.txt', 'r')
    for line in aml_energyfile.readlines():
        spalten = string.split(line)
        if spalten[0] == str(xzaehler) and spalten[1] ==
str(yzaehler):
            aml_energy = float(spalten[2])
    aml_energyfile.close()
    if vorhanden == 1:
        corr_energy = qmmm_energy - aml_energy + b3lyp_energy -
mmc_energy
    elif vorhanden == 0:
        corr_energy = 0.0
    valuepoint = ("%4.2f" %corr_energy)
    value = string.replace(str(valuepoint), '.', ',')
    ausgabefile.write("%9s" % value)
    ausgabefile2.write("%9s" % valuepoint)
    ausgabefile3.write("%9s" % vorhanden)
    xzaehler +=1
    yzaehler +=1

ausgabefile.write("\n")
ausgabefile2.write("\n")
ausgabefile3.write("\n")
ausgabefile.close()
ausgabefile2.close()
ausgabefile3.close()
```


I feel very privileged to have worked with Adrian Mulholland and Lars Ridder. To both of them I owe a great debt of gratitude for their patience, inspiration and geniality. Adrian accepted me in his group at the school of chemistry at the University of Bristol/UK and gave me every thinkable support during my two visits, which were great times for me. Lars guided me through the first steps of QM/MM-modeling and the CHARMM-software particularly. Throughout the last three years Adrian and Lars were always willing to share their experiences with me and to discuss any problem of high or even of low impact on my work. At least Adrian showed me that it is not important who really wins a football match, but who has deserved to win it.

Ich möchte mich bei all jenen bedanken, die zu der Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben. Besonders gilt mein Dank den Mitgliedern des Arbeitskreises für das Verständnis für meinen gigantischen Rechenbedarf, der sicherlich nur schwer ohne Murren zu ertragen gewesen sein muss (s. rechts).

Bei Stefanie Bendels, meiner ersten Büropartnerin, möchte ich

mich für ihre Hilfe bei meinen ersten und auch späteren *in silico* Gehversuchen, sowie für ihren Rat und ihre Diskussionsbereitschaft für Fragen der unterschiedlichsten Lebenslagen bedanken. Außerdem hat sie entscheidenden Einfluss gehabt den Kampf gegen verschiedene Produkte von Bill Gates in Bezug auf diese Dissertation teilweise siegreich zu gestalten.

Christian Hensen, ihr Nachfolger im Büro, war immer bereit über verschiedenste Dinge ausgiebig zu diskutieren, egal ob sie mit QM/MM, Charmm, Python oder auch mal gar nichts mit der täglichen Arbeit zu tun hatten. Er war mir außerdem eine Riesenhilfe indem er den Job des kritischen Korrekturlesers dieser Arbeit trotz des Zeitdrucks sehr gut gemeistert hat. Bemerkenswert war unsere nahezu 100%ige Trefferquote beim Annehmen von Telefongesprächen für den jeweils Anderen.

```
#####          #####          06/12/01 - 14:40
##### alberich01 #####          21/08/03 - 17:09
##### alberich02 #####          21/08/03 - 17:09
##### alberich03 #####          21/08/03 - 17:09
##### alberich04 #####          21/08/03 - 17:09
##### alberich05 #####          21/08/03 - 17:09
##### erda #####          21/08/03 - 17:09
##### fafner01 #####          21/08/03 - 17:09
hermann 171548      25:18 WL charmm
##### fafner02 #####          21/08/03 - 17:09
hermann 144554      1:53:13 WL charmm
##### fafner03 #####          21/08/03 - 17:09
hermann 141435      7:24 20 scf
##### fafner04 #####          21/08/03 - 17:09
hermann 35672      30:34 WL charmm
##### fafner05 #####          21/08/03 - 17:09
hermann 156089      30:23 WL charmm
##### fafner06 #####          21/08/03 - 17:09
hermann 147057      1:47:12 WL charmm
##### fafner07 #####          21/08/03 - 17:09
hermann 144481      1:45:48 WL charmm
##### fafner08 #####          21/08/03 - 17:09
hermann 159507      29:41 WL charmm
##### fasolt #####          21/08/03 - 17:09
##### freya #####          21/08/03 - 17:09
##### froh01 #####          21/08/03 - 17:09
hermann 144204      1:54:33 WL charmm
##### froh02 #####          21/08/03 - 17:09
hermann 159533      1:49:27 WL charmm
##### hagen #####          21/08/03 - 17:09
##### loge #####          21/08/03 - 17:09
##### mime06 #####          21/08/03 - 17:09
##### wotan #####          21/08/03 - 17:09
[Johannes@froh01] (~):
```

Bei Friederike Stoll, Gunther Stahl, Kirstin Jöhren und Britta Bröer möchte ich mich für die hervorragende Zusammenarbeit bei der Betreuung des 8.Semesters bedanken. Es war – egal in welcher Besetzung - nie langweilig und ich werde die Trockenschrank-Pizza sehr vermissen. Mit Kirstin hatte ich darüber hinaus eine Leidensgenossin in der Endphase der Promotion, was ja bekanntlich das Leid halbiert.

Peter Sippel, unserem System-Administrator, muss ich sehr für seine Unterstützung im Zusammenhang mit Hard- und auch Softwareproblemen danken, die nicht zwangsläufig immer „dienstlicher“ Natur waren. Darüber hinaus waren die all-montäglichen Analysen der Fussballergebnisse der verschiedenen deutschen und auch europäischen Ligen als Wochenstart unverzichtbar.

Meinem Berlin-Düsseldorf-Köln-Frankfurt-Freiburger Kreis danke ich für viele hilfreiche Diskussionen auf den unterschiedlichsten universitären und außeruniversitären Veranstaltungen sowie für die Hilfe bei der gelegentlichen Besinnung auf andere wesentliche Dinge des Lebens neben der Doktorarbeit.

Aynur danke ich für das Korrekturlesen, das Diskutieren unterschiedlichster pharmazeutischer Probleme sowie die Seelsorge an nicht ganz so sonnigen Tagen in der Endphase.

Meinem „großem“ Bruder Arnd danke ich für die nötige Motivationsarbeit nicht zuletzt durch sein ständiges Vorlegen nicht nur in der akademischen, sondern auch in der sportlichen Laufbahn.

Meiner „kleinen“ Schwester Verena bin ich sehr dankbar für ihre detaillierten Urlaubsberichte aus den verschiedensten Teilen dieses Planeten; besonders im letzten Jahr war ich darüber sehr erfreut und bin danach immer wieder liebend gerne an den Schreibtisch zurückgekehrt.

Meinem Großvater, danke ich sehr für seinen Rat, auf den ich mich schon meine gesamte Ausbildung verlassen konnte, sowie für seine Hilfe und sein immerwährendes Interesse an meiner Arbeit und meiner Entwicklung.

Meinen Eltern möchte ich sehr für ihre große Unterstützung und Anteilnahme während meiner Ausbildung und während meiner Promotion danken. Sie haben außerdem durch ausdauerndes Korrekturlesen entscheidend geholfen, über meine dichterischen Schwächen hinwegzutäuschen.

Name	Johannes Cornelius Hermann
Geburtstag/-ort	26.02.1974 in Frankfurt am Main
Familienstand	ledig
Schulbildung	
1980 – 1984	Peter-Petersen Grundschule / Frankfurt/M.
1984 – 1989	Ziehen-Gymnasium / Frankfurt/M.
1989 – 1993	Wöhler Gymnasium / Frankfurt/M.
1993	Abitur
Zivildienst	
Okt. 1993 – Okt. 1994	Johanniter-Unfallhilfe Frankfurt/M. Ausbildung zum Rettungshelfer
Studium	
Okt.1994 – Okt.1998	Studium der Pharmazie an der Albert-Ludwigs Universität Freiburg
Dezember 1999	Approbation als Apotheker
Praktisches Jahr	
Nov. 1998 – Jan. 1999	Bayer AG Pharmaforschungszentrum Wuppertal
Feb. 1999 – April 1999	Bayer AG Shiga Factory – Koka / Japan
Mai 1999 – Okt. 1999	Birken-Apotheke Köln
Promotion	
seit März 2000	Beginn der vorliegenden Dissertation am Institut für pharmazeutische Chemie der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H.-D. Höltje
Forschungsaufenthalte	
April 2001 und Juli – Aug. 2003	School of Chemistry, University of Bristol / England

"You only go around once, so you better go hard!"

Josh AlikeKalaunui Stone

