

direkte Nachweis von Radikalen in einer Coenzym-B₁₂-abhängigen Umlagerung eines Kohlenstoffgerüsts.

Eingegangen am 23. August 1991 [Z 4885]

CAS-Registry-Nummern:

Methylmalonyl-CoA-Mutase, 9023-90-9; Coenzym B₁₂, 13870-90-1.

- [1] Übersicht: J. Rétey in *Vitamin B₁₂*, Vol. 2 (Hrsg.: D. Dolphin), Wiley, New York 1982, S. 357–379.
- [2] S. Wollowitz, J. Halpern, *J. Am. Chem. Soc.* 1984, 106, 8319–8321; *ibid.* 1988, 110, 3112–3120.
- [3] G. Choi, S.-C. Choi, A. Galan, B. Wilk, P. Dowd, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990, 87, 3174–3176.
- [4] B. M. Babior, T. H. Moss, D. C. Gould, *J. Biol. Chem.* 1972, 247, 4389–4392.
- [5] B. M. Babior, T. H. Moss, W. H. Orme-Johnson, H. Beinert, *J. Biol. Chem.* 1974, 249, 4537–4544.
- [6] S. A. Cockle, H. A. O. Hill, R. J. P. Williams, S. P. Davies, M. A. Foster, *J. Am. Chem. Soc.* 1972, 94, 275–277.
- [7] T. H. Finlay, J. Valinsky, A. S. Mildvan, R. H. Abeles, *J. Biol. Chem.* 1973, 248, 1285–1290.
- [8] K. L. Schepler, W. R. Dunham, R. H. Sauds, J. A. Fee, R. H. Abeles, *Biochim. Biophys. Acta* 1975, 397, 510–518.
- [9] W. H. Orme-Johnson, H. Beinert, R. L. Blakley, *J. Biol. Chem.* 1974, 249, 2338–2343.
- [10] J. D. Brodie, A. D. Woodams, B. M. Babior, *Fed. Proc.* 1972, 31, 1578.
- [11] Die ESR-Spektren wurden mit einem ESP 300 E 10/12 ESR-Spektrometer der Firma Bruker Analytische Meßtechnik bei einer Mikrowellenfrequenz von 9.5 GHz und einer Mikrowellenleistung von 5 mW gemessen. Zur Magnetsfeldkalibrierung wurde ein NMR-Gaußmeter und ein Frequenzzähler (Modell HP 5350B) verwendet. Als Probenkopf diente ein zylindrischer TM-Resonator. Die ESR-Spektren wurden bei einer Temperatur von 77 K aufgenommen.
- [12] J. R. Pilbrow in *Vitamin B₁₂* (Hrsg.: B. Zagalak, W. Friedrich), de Gruyter, Berlin, 1979, S. 505–510.
- [13] J. Rétey, P. Such, Y. Zhao, unveröffentlicht.

Moleküldynamikrechnungen für Peptide in Dimethylsulfoxid: Eliminierung von Vakuumeffekten **

Von Michael Kurz, Dale F. Mierke und Horst Kessler*

Moderne NMR-Techniken zur Bestimmung strukturrelevanter Parameter^[1] und anschließende Moleküldynamik-(MD)-Simulation^[2] sind die wichtigsten Hilfsmittel bei der Konformationsbestimmung in Lösung. Bis vor kurzem wurden die meisten MD-Simulationen im Vakuum durchgeführt. Derartige Simulationen ergeben bei vielen Peptiden interne Wasserstoffbrücken, für die es keine experimentellen Belege gibt. Ein Beispiel dafür ist das häufige Auftreten von γ -Schleifen in cyclischen Hexapeptiden. Normalerweise würde man hier lediglich zwei β -Schleifen erwarten. Die zusätzlichen γ -Schleifen bilden sich entlang der „Längsseite“ des Peptids und führen zu einem starken Abknicken des gesamten Moleküls. Bei Röntgenstrukturanalysen wurde dies jedoch nie festgestellt^[3]. Wir zeigen am Beispiel der C_2 -symmetrischen Modellverbindung *cyclo*-(D-Ala¹-Ala²-Ala³-D-Ala⁴-Ala⁵-Ala⁶), daß es sich bei diesen γ -Schleifen um reine Vakuumeffekte handelt, die man durch eine MD-Simulation unter Berücksichtigung des Lösungsmittels leicht eliminieren kann.

Für alle MD-Simulationen wurde das GROMOS-Programmpaket verwendet^[4]. Die Parameter für Dimethylsulfoxid (DMSO) wurden aus einer Röntgenstrukturanalyse^[5] und einer mikrowellenspektroskopischen Studie^[6]

übernommen. Die Details sind in Lit.^[7] beschrieben. Mit diesen Parametern ergeben sich bei den MD-Simulationen Wasserstoffbrücken zwischen DMSO und Peptid, die mit den Daten der Röntgenstrukturanalyse eines cyclischen Peptids von Karle et al.^[8] gut übereinstimmen.

Für das Modellpeptid *cyclo*-(D-Ala¹-Ala²-Ala³-D-Ala⁴-Ala⁵-Ala⁶) wurde zunächst eine Restrained-MD-Simulation über 100 ps im Vakuum durchgeführt. Dabei wurden 30 Abstände, die aus einem 500 MHz-ROESY-NMR-Spektrum (150 ms Mischzeit) erhalten wurden, verwendet. Für die Analyse der MD-Resultate wurden nur die letzten 60 ps herangezogen. Wie zu erwarten war, ergab sich eine C_2 -symmetrische Konformation mit zwei β II'-Schleifen, wobei die D-Aminosäuren jeweils die Position i + 1 einnahmen (Abb. 1 a). Zusätzlich waren auch zwei γ -Schleifen mit Wasserstoffbrücken zwischen D-Ala¹-NH und Ala⁵-O sowie D-Ala⁴-NH und Ala²-O populiert, die zu dem erwähnten Abknicken führen (Tabelle 1).

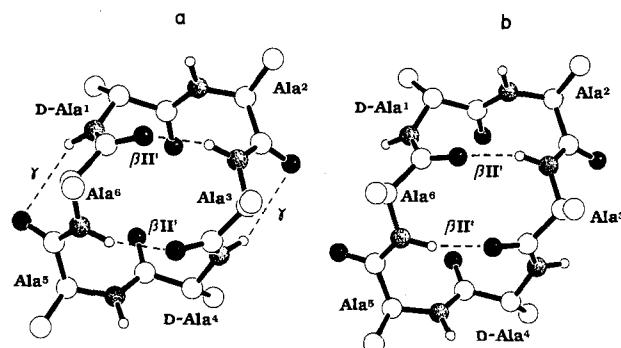


Abb. 1. Struktur von *cyclo*-(D-Ala¹-Ala²-Ala³-D-Ala⁴-Ala⁵-Ala⁶) nach 100 ps MD-Simulation a) im Vakuum, b) in DMSO.

Tabelle 1. Intramolekulare Wasserstoffbrücken während der MD-Simulationen im Vakuum und in DMSO[a].

| H-Brücke zwischen | Schleife | Distanz [b] | Winkel | Population [%] |
|------------------------|---------------------|-------------|--------|----------------|
| und | | [pm] | [°] | |
| <i>Vakuum</i> | | | | |
| Ala ³ -NH | Ala ⁶ -O | β II' | 303 | 153 |
| Ala ⁶ -NH | Ala ³ -O | β II' | 303 | 153 |
| D-Ala ¹ -NH | Ala ⁵ -O | γ | 335 | 135 |
| D-Ala ⁴ -NH | Ala ² -O | γ | 335 | 135 |
| <i>DMSO</i> | | | | |
| Ala ³ -NH | Ala ⁶ -O | β II' | 291 | 165 |
| Ala ⁶ -NH | Ala ³ -O | β II' | 297 | 160 |

[a] Die Kriterien für das Vorliegen einer Wasserstoffbrücke sind ein Donor-Acceptor-Abstand < 350 pm und ein Winkel N-H-O > 120°. [b] Abstand N-O.

Mit der so erhaltenen Struktur wurde nun eine Restrained-MD-Simulation in DMSO durchgeführt. Dazu wurde das Molekül in die Mitte eines Lösungsmittelkäfigs, bestehend aus 116 DMSO-Molekülen, gesetzt. Dies entspricht einer Konzentration von 100 mmol L⁻¹, die den experimentellen Meßbedingungen (ca. 50 mmol L⁻¹) sehr ähnlich ist. Wie im Vakuum erfolgte die MD-Simulation unter Verwendung des SHAKE-Algorithmus mit einer Schrittweite von 2 fs. Zunächst rechnete man 10 ps bei 300 K mit einer Kraftkonstante für die „restraints“ von 2500 kJ mol⁻¹ nm⁻² und einer starken Kopplung ans Wärmebad (die Temperaturrelaxationszeit betrug 0.01 ps). Anschließend wurde bei derselben Kraftkonstante und einer schwachen Anbindung an das Wärmebad (Temperaturrelaxationszeit 0.1 ps) 40 ps weiter simuliert. Für die Analyse schließlich wurden die Kraftkonstante auf 1000 kJ mol⁻¹ nm⁻² herabgesetzt und nochmals 50 ps gerechnet.

[*] Prof. Dr. H. Kessler, Dipl.-Chem. M. Kurz, Dr. D. F. Mierke
Organisch-chemisches Institut der Technischen Universität München
Lichtenbergstraße 4, W-8046 Garching

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie gefördert.

Während der Simulation in DMSO kam es zum Aufbrechen der beiden γ -Schleifen (siehe Tabelle 1) und zu einer weitgehenden Abflachung des Moleküls (Abb. 1 b und Abb. 2). Die intermolekularen Wasserstoffbrücken, die während der MD-Simulation zwischen Peptid und Lösungsmittel auftraten, sind in Tabelle 2 wiedergegeben.

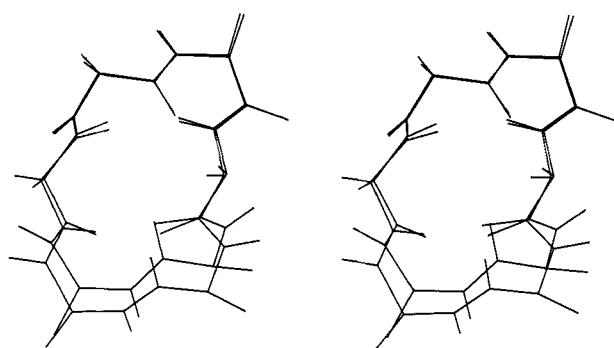


Abb. 2. Stereobild der übereinander projizierten Strukturen des Cyclohexapeptids im Vakuum und in DMSO. Die beiden Strukturen sind so übereinander gezeichnet, daß die Aminosäuren 1 und 2 zur Deckung kommen.

Tabelle 2. Intermolekulare Wasserstoffbrücken zwischen Peptid und DMSO (Solv) während der MD-Simulation in DMSO [a].

| H-Brücke zwischen | | Distanz [pm] | Winkel [°] | Population [%] |
|------------------------|-----------------------|--------------|------------|----------------|
| d-Ala ¹ -NH | Solv ⁵⁵ -O | 288 | 152 | 72 |
| d-Ala ⁴ -NH | Solv ³ -O | 282 | 169 | 86 |
| Ala ² -NH | Solv ²⁶ -O | 281 | 168 | 85 |
| Ala ⁵ -NH | Solv ⁴⁵ -O | 284 | 169 | 86 |

[a] Die Kriterien für das Vorliegen einer Wasserstoffbrücke sind ein Donor-Acceptor-Abstand <350 pm und ein Winkel N-H-O >120°.

Die MD-Simulation im Lösungsmittel wurde ohne restraints über weitere 50 ps fortgesetzt. Dabei änderte sich die Konformation nicht mehr, so daß sie als stabil angesehen werden kann. Abschließend wurde zur Absicherung die Struktur in DMSO nochmals einer Restrained-MD-Simulation im Vakuum unterzogen, wobei die γ -Schleifen wiederum auftraten.

Sowohl die Struktur im Vakuum als auch die in DMSO stimmen mit den Abständen aus dem ROESY-Spektrum gut überein. Die Temperaturkoeffizienten der Amidprotonen deuten aber nur auf zwei intramolekulare Wasserstoffbrücken hin (Ala³-NH/Ala⁶-NH: $\Delta\delta/\Delta T = -1.3 \times 10^{-9} \text{ K}^{-1}$, d-Ala¹-NH/d-Ala⁴-NH: $\Delta\delta/\Delta T = -8.7 \times 10^{-9} \text{ K}^{-1}$, Ala²-NH/Ala⁵-NH: $\Delta\delta/\Delta T = -8.0 \times 10^{-9} \text{ K}^{-1}$). Demnach sind die Amidprotonen der beiden D-Aminosäuren, die in der Struktur im Vakuum an einer γ -Schleife beteiligt sind, zum Lösungsmittel hin orientiert, was in der Struktur in DMSO wesentlich besser wiedergegeben wird.

Denselben Effekt stellten wir auch bei zahlreichen anderen cyclischen Hexapeptiden fest. Die Unterschiede zwischen den Strukturen im Vakuum und in DMSO sind dabei um so größer, je kleiner die Seitenketten der Aminosäuren in der Position i sind. Offensichtlich können größere Reste die Ladungen der polaren Gruppen besser abschirmen.

Nach unseren Erfahrungen ist es vorteilhaft, folgendes generelles Vorgehen bei der Bestimmung der bevorzugten Konformation in Lösung zu wählen:

1. Man führt eine Restrained-MD-Simulation im Vakuum als erste Näherung durch. Um einen größeren Konformationsraum abzusuchen, empfiehlt es sich, von mehreren Startstrukturen auszugehen und auch bei höheren Tempera-

turen sowie mit verschiedenen Kraftkonstanten für die restraints zu rechnen. MD-Simulationen im Vakuum ohne Verwendung von restraints liefern nach unseren Erfahrungen Strukturen, die mit den experimentellen Befunden nicht übereinstimmen. Bei Peptiden ist es zusätzlich sinnvoll, Vakuumeffekte durch Reduktion der Ladung für Amidprotonen, die zum Solvens orientiert sind (Information aus den Temperaturgradienten der Amidprotonen), und durch Fixierung der Seitenketten in dominierenden Rotamerenpopulationen (Information aus homo- und heteronucleären Kopplungskonstanten) zu verringern^[19].

2. Mit der so erhaltenen Struktur wird eine Restrained-MD-Simulation im Lösungsmittel durchgeführt. Das Solvens sollte nicht nur durch ein hypothetisches Dielektrikum wiedergegeben werden, sondern explizit in die Dynamik einzbezogen werden.

3. Zusätzlich kann noch eine MD-Simulation im Lösungsmittel ohne restraints angeschlossen werden. Dabei zeigt sich, ob die Struktur stabil ist oder sich von der durch experimentelle restraints vorgegebenen Konformation entfernt.

Bei all diesen Rechnungen muß man sich immer wieder vor Augen führen, daß statische Bilder wie in Abbildung 1 nur einen begrenzten Aussagewert haben, da sie durch Mitteilung über eine sich zeitlich ändernde Konformation (Trajektorie) entstehen. Im hier besprochenen Fall sind die beobachteten Vakuumeffekte über die gesamte Trajektorie signifikant. MD-Simulationen für kleinere und polare Moleküle sollten daher immer im Lösungsmittel durchgeführt werden.

Eingegangen am 5. September 1991 [Z 4899]

- [1] H. Kessler, M. Gehrke, C. Griesinger, *Angew. Chem.* **1988**, *100*, 507–554; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 490–536.
- [2] W. F. van Gunsteren, H. J. C. Berendsen, *Angew. Chem.* **1990**, *102*, 1020–1055; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, *29*, 992–1023.
- [3] G. D. Rose, L. G. Giersch, J. A. Smith, *Adv. Protein Chem.* **1985**, *37*, 1–109, zit. Lit.
- [4] W. F. van Gunsteren, H. J. C. Berendsen, *Groningen Molecular Simulation (GROMOS) Library Manual*, Biomas B. V., Nijenborgh 16, NL 9747 AG Groningen, S. 1–229.
- [5] S. Itoh, H. Ohtaki, *Z. Naturforsch. A* **1987**, *42*, 858–862.
- [6] W. Feder, H. Creizler, H. D. Rudolf, V. Typke, *Z. Naturforsch. A* **1969**, *24*, 266–272.
- [7] D. F. Mierke, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.*, im Druck; Rechnungen für Moleküle in DMSO sind bereits erschienen: B. G. Rao, U. C. Singh, *ibid.* **1990**, *112*, 3803–3811.
- [8] I. L. Karle, J. L. Flippen-Anderson, R. Kishore, P. Balaram, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1989**, *34*, 37–41.
- [9] H. Kessler, J. W. Bats, C. Griesinger, S. Koll, M. Will, K. Wagner, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 1033–1049.

Mikrokalorimetrie an den Spinübergangssystemen $[\text{Fe}(\text{bts})_2(\text{NCS})_2]$ und $[\text{Fe}(2\text{-pic})_3]\text{Cl}_2 \cdot \text{EtOH}$ im Bereich $15 \text{ K} < T < 300 \text{ K}^{**}$

Von Ralf Jakobi, Harald Romstedt, Hartmut Spiering und Philipp Gütlich*

Professor Joseph Grobe zum 60. Geburtstag gewidmet

Thermodynamische Untersuchungen an Phasenübergängen jeglicher Art im Festkörper setzen exakte Messungen der Wärmekapazität als Funktion der Temperatur voraus. Bei

[*] Prof. Dr. P. Gütlich, R. Jakobi, H. Romstedt, H. Spiering
Institut für Anorganische und Analytische Chemie der Universität
Staudinger Weg 9, D-6500 Mainz

[**] bts = 2,2'-Bis(4,5-dihydro-5-methyl-1,3-thiazol), 2-pic = 2-Picolyamin.