

Design eines steuerbaren molekularen Protonenkanals**

Wei Gu, Bo Zhou, Tihamér Geyer, Michael Hutter, Haiping Fang* und Volkhard Helms*

Die Erzeugung eines elektrochemischen pH-Gradienten über eine biologische Membran unter Einsatz von Energie aus Photosynthese und Atmung ist die universelle Triebkraft zur Herstellung von Adenosintri-phosphat (ATP), der Energie-einheit des Lebens, in Zellen.^[1] Erforderlich für den Aufbau eines solchen elektrochemischen Potentials ist der Transport von Protonen gegen einen thermodynamischen Gradienten. Biologische Protonenpumpen setzen daher chemische Energie ein, um während eines katalytischen Zyklus ihre Konformation zu ändern, wobei jeweils ein oder mehrere Protonen gegen einen Protonengradienten durch die Membran gepumpt werden. Es gibt aber auch andere Membrankanäle, die einen kontinuierlichen Teilchenaustausch vermitteln und zwischen offenen und geschlossenen Zuständen geschaltet werden können.^[2–7] Solche Nanokanäle mit ähnlichen Funktionen entwickeln zu können, wäre von großer Bedeutung für die Konzeption neuartiger molekularer Funktionseinheiten. Denkbar ist eine Vielzahl von Anwendungen wie molekulare Motoren,^[8–11] Brennstoffzellen,^[12] aufladbare Nanobatterien, die Energie an andere Nanomaschinen liefern,^[13] oder die Erzeugung von örtlich und zeitlich gesteuerten pH-Sprüngen auf Mikrofluidikchips.

Trotz seiner Bedeutung stellt ein kontrollierter Stofftransport immer noch eine große Herausforderung dar.^[14–17] Osmose-getriebener Transport tritt in vielen Systemen auf und bietet die einfachste Lösung für den passiven Transport von Substraten.^[2] Um ein elektrochemisches Potential aufzubauen und den Rückfluss zu verhindern, werden jedoch Steuerungselemente benötigt, da ein nichtgesteuerter Kanal

kein chemisches Potential aufrecht erhalten kann. In vielen biologischen Nanomaschinen, die wie Cytochrom-c-Oxidase oder der Na⁺/H⁺-Antiporter Stoffe effizient und selektiv transportieren können, werden die Eigenschaften der Steuerung durch Konformationsänderungen des Kanals infolge der Bindung und Abgabe des Substrats bestimmt^[2–7] (siehe genaue Erklärung in den Hintergrundinformationen).

Hier stellen wir das Design eines gesteuerten molekularen Protonenkanals vor, der Protonen beim Angelegen eines elektrischen Felds effizient entgegen einem Konzentrationsgradienten transportieren kann. Dieser Transport ist schaltbar, und der Rückfluss kann kinetisch verhindert werden, sogar wenn die externe Energiequelle ausgeschaltet ist. Wie analoge biologische Systeme^[2,3] verwendet der Entwurf das externe elektrische Feld als Energiequelle und eine an die Innenwand einer Nanopore angebrachte rotierbare funktionelle Gruppe als Steuerungselement. Aufnahme und Abgabe eines Protons führen im elektrischen Feld zum Öffnen und Schließen des Steuerungselements (Rotation der funktionellen Gruppe) und kontrollieren daher die Protonenleitung. Anders als in biologischen ligandengesteuerten Kanälen ist hier der Ligand, der die Öffnung des Kanals bewirkt, mit dem transportierten Substrat identisch.

Als Modellsystem verwendeten wir offene einwandige Kohlenstoffnanoröhren (uncapped armchair single-walled carbon nanotubes). Obwohl der Protonentransfer durch Nanokanäle wie Kohlenstoffröhren sehr effizient sein kann,^[18] ist es schwierig, den Fluss durch reine Kohlenstoffröhren ohne schaltbare Gatter zu steuern, da sie Protonen in beide Richtungen leiten. Um einen molekularen Schalter zu erzeugen, der von außen bedient werden kann, wurde ein Essigsäuremolekül chemisch mit der inneren Wand des Nanokanals verbunden. Jüngste experimentelle Fortschritte ermöglichen die Dekoration der Innenwände von Kohlenstoffröhren.^[19] Essigsäure ist ein Analogon von Asparaginsäure, die in vielen biologischen Kanälen als molekularer Schalter wirkt.^[2,3,6,20] Vor kurzem wurden das Protonierungsverhalten der Asparaginsäure und seine Rolle für den Transport von biologischen Substraten aufgeklärt.^[2,21,22] In vielen Fällen ändert sich der Protonierungszustand der Asparaginsäure infolge der Bindung von Substraten, was zu einer Konformationsänderung des Kanals führt. Dadurch öffnet sich der Kanal, um die entsprechenden Substrate zu transportieren. Nachdem die Substrate abgegeben wurden, werden der Protonierungszustand der Asparaginsäure und die Konformation des Kanals auf den Ausgangspunkt, den ungebundenen Zustand, zurückgesetzt, um für den nächsten Transportzyklus bereit zu sein, und um den Kanal zu verschließen und so einen Rücktransport zu verhindern.

In unserem Design wurde eine Graphitschicht an ein Ende des Nanokanals platziert, um das Simulationssystem in zwei Teile zu unterteilen und jegliche Austausche, bis auf jene

[*] Dr. W. Gu, Dr. T. Geyer, Dr. M. Hutter, Prof. Dr. V. Helms
Zentrum für Bioinformatik, Universität des Saarlandes
66041 Saarbrücken (Deutschland)
Fax: (+49) 681-302-64180
E-Mail: volkhard.helms@bioinformatik.uni-saarland.de

B. Zhou, Prof. Dr. H. Fang
Shanghai Institute of Applied Physics, Chinese Academy of Sciences
PO Box 800-204, Shanghai 201800 (China)
E-Mail: fanghaiping@sinap.ac.cn

Dr. W. Gu
Center of Computational Biology, College of Life Sciences
Nankai University, Tianjin 300071 (China)

B. Zhou
Graduate School of the Chinese Academy of Sciences
Beijing 100080 (China)

[**] Diese Arbeiten wurden durch die DFG (He3875/9-1), das PNNL (Projekt EMSL GC 20896), das BMBF (CHN08/028), NNSFC (10825520) und NBRPC (2007CB936000) gefördert. NWchem Version 4.7, entwickelt und vertrieben durch das Pacific Northwest National Laboratory (PNNL), Richland, Washington (USA), und durch das U.S. Department of Energy gefördert, wurde für einige der Rechnungen eingesetzt.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201002564> zu finden.

durch den Nanokanal, zwischen dem oberen und unteren Teil zu verhindern. Weiterhin wurden entlang der Röhrenachse elektrische Felder mit verschiedener Stärke angelegt (Richtung: von oben nach unten). Zu Beginn wird ein Hydronium zufällig in den oberen Teil des Systems platziert. Aufgrund der periodischen Randbedingungen treten Moleküle, die das System auf einer Seite verlassen, gleichzeitig auf der entgegengesetzten Seite wieder ein. Die Abbildungen 1a und 1b zeigen den Aufbau im Detail.

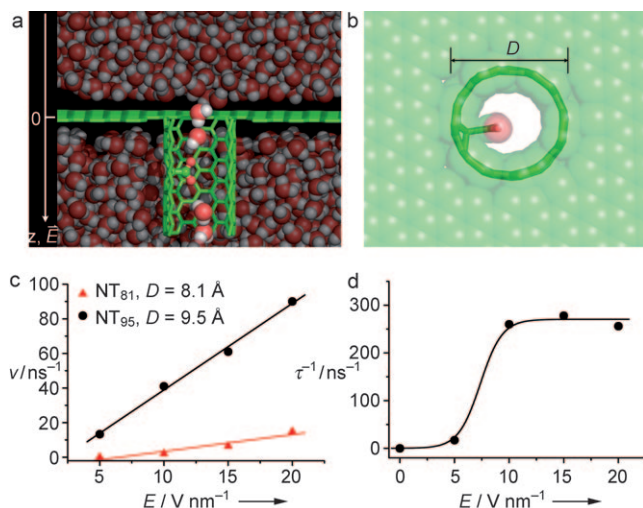


Abbildung 1. a) Seitenansicht des simulierten Systems. Graphitschicht und Kohlenstoffröhren sind als Stabmodell dargestellt, und die Essigsäuregruppe ist als Kugel-Stab-Modell gezeigt (Grün: Kohlenstoffatome und Bindungen, rot: Sauerstoffatome). Wassermoleküle sind als Kalottenmodell dargestellt (rote Kugeln: Sauerstoffatome, weiße Kugeln: Wasserstoffatome). Der weiße Pfeil kennzeichnet die z-Achse und die Richtung des elektrischen Felds. 0 markiert die Position $z=0$. b) Aufsicht des Systems (Wassermoleküle nicht gezeigt). c) Protonentransferrate ν in Simulationen für zwei unterschiedliche Porendurchmesser D bei vier verschiedenen elektrischen Feldern E . d) Intrinsische Protonentransferrate τ^{-1} in Simulationen für NT_{95} bei verschiedenen elektrischen Feldern E . In (c) und (d) geben Kreise und Dreiecke die Datenpunkte an und die durchgezogenen Kurven zeigen Näherungen durch Geraden (in c) bzw. eine sigmoidale Funktion (in d).

Wir führten eine erste Reihe von Moleküldynamik(MD)-Simulationen für Kohlenstoffröhren mit einer rotierbaren Essigsäuregruppe und mit zwei unterschiedlichen Durchmessern in verschiedenen elektrischen Feldern durch. Im Unterschied zum Ionentransport, der mit klassischen MD-Simulationen untersucht werden kann,^[23,24] verwendeten wir hier die Q-HOP^[25]-Methode, um Protonentransfer in den Simulationen zu betrachten. Abbildung 1c zeigt die Protonentransferraten (definiert als die Zahl an Protonen, die pro Nanosekunde durch den Nanokanal transportiert wurden). Diese Transferraten reichen von einigen wenigen Protonen pro ns bis zu fast 100 Protonen pro ns für unterschiedliche Anordnungen. Dies zeigt, dass Protonen in moderaten elektrischen Feldern mit sehr hohen Transferraten geleitet werden. Erkennbar ist ein klarer Trend, dass der weitere Nanokanal ($D = 9.5 \text{ \AA}$, im Folgenden als NT_{95} bezeichnet) Protonen schneller leitet. Die Transferrate für NT_{95} ist etwa eine Größenordnung höher als die des engeren Nanokanals

($D = 8.1 \text{ \AA}$, im Folgenden als NT_{81} bezeichnet). Stärkere elektrische Felder resultieren ebenfalls in höheren Transferaten. Bei Verstärkung des elektrischen Felds von 5 auf 20 V nm^{-1} nimmt die Transferrate sowohl im NT_{95} - als auch im NT_{81} -System fast linear zu.

Wir weisen darauf hin, dass die absoluten Werte der Leitfähigkeiten zum Teil davon abhängen, wie lange das Proton braucht, um zum Eingang der Röhre zu diffundieren und in die Röhre einzudringen. Diese Zeit variiert mit den Abmessungen des Systems. Deshalb charakterisierten wir wie folgt die „reinen“ Leitfähigkeiten der entworfenen Kanäle. Eine intrinsische Transferrate wurde als Kehrwert der mittleren Durchtrittszeit τ definiert (wobei als Durchtrittszeit die Zeit zwischen dem Eintritt des Protons in den Kanal bis zum Zeitpunkt, an dem es aus dem unteren Kanalende austritt, bezeichnet wurde). τ wurde erhalten, indem die Zahl der Transferprozesse mit verschiedenen Durchtrittszeiten mit einer Exponentialfunktion angenähert wurde (siehe die Hintergrundinformationen). Abbildung 1d zeigt die intrinsische Transferraten für NT_{95} unter verschiedenen elektrischen Feldern. Wenn man einbezieht, dass die Rate ohne elektrisches Feld gleich null sein sollte, können die Datenpunkte sehr gut durch eine sigmoidale Funktion angenähert werden. Die Transferrate steigt langsam an, solange das elektrische Feld kleiner als 5 V nm^{-1} ist, gefolgt von einem raschen Anstieg zwischen 5 und 10 V nm^{-1} und einer Sättigung für Felder über 10 V nm^{-1} . Dieser Verlauf weist auf ein deutliches „Umschalt“-Verhalten des Kanals für unterschiedliche elektrische Felder hin. Im Fall von NT_{81} konnte die intrinsische Transferrate nur für die Simulation mit dem stärksten elektrischen Feld (20 V nm^{-1}) zuverlässig angenähert werden. Die Rate (86.2 ns^{-1}) beträgt etwa ein Drittel derjenigen für NT_{95} bei dem gleichen Feld. In den anderen Simulationen für NT_{81} bei schwächeren Feldern war die Zahl an Transfervorgängen für diese Art der Auswertung zu klein.

Um ein Verständnis der entwickelten Nanokanäle auf atomarer Ebene zu vermitteln, zeigt Abbildung 2 einen detaillierten Protonenleitungsmechanismus, der auf Schnappschüssen eines kompletten Leitungsvorgangs beruht. In Schritt 0 (in Abbildung 2 nicht gezeigt) diffundiert das Proton unter Einbeziehung mehrerer Wassermoleküle zum oberen Eingang des Kanals und tritt in den Nanokanal ein. In Schritt 1 wird das Proton auf die Essigsäuregruppe transferiert. In Schritt 2 bewirkt die eine asymmetrische Ladungsverteilung erzeugende Protonierung in elektrischen Feldern ausreichender Stärke eine Drehung der Essigsäuregruppe um die C-C-Bindung um etwa 90 bis 180 Grad. In Schritt 3 erreicht das Proton eine günstige Stellung für den Transfer zu einem weiteren Wassermolekül auf der anderen Seite der Essigsäuregruppe und geht auf dieses über. In Schritt 4 kehrt die deprotonierte Essigsäuregruppe nach der Abgabe des Protons aufgrund ihrer nun wieder symmetrischen Ladungsverteilung in ihre Ruhestellung zurück, wobei sie entsprechend dem in Schritt 2 erreichten Rotationswinkel, unabhängig von dem elektrischen Feld, entweder rückwärts oder vorwärts rotiert.

Wir berechneten außerdem die mittlere „Eintrittszeit“ τ (siehe die Hintergrundinformationen). Die Eintrittszeit wurde definiert als das Zeitintervall zwischen dem Moment,

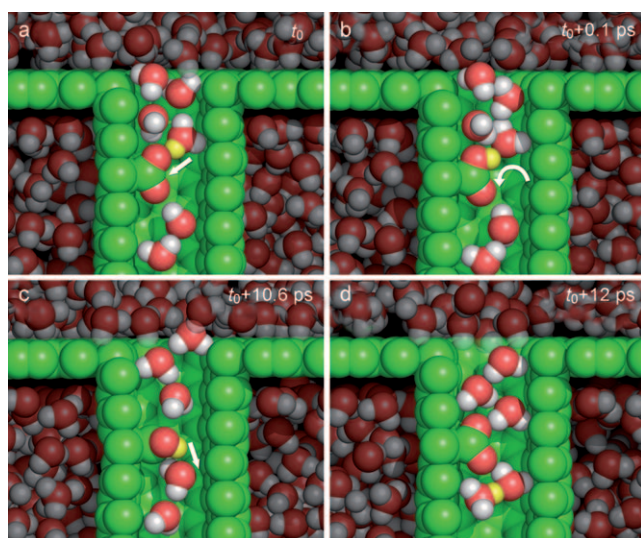


Abbildung 2. Der Mechanismus der gesteuerten Protonenleitung in dem entworfenen Protonenkanal wird anhand von Schnappschüssen für einen kompletten Leitungsvorgang vorgestellt (Kalottenmodell: Sauerstoffatome rot, Kohlenstoffatome grün, Wasserstoffatome weiß). Das in den verschiedenen Schritten transferierte Proton ist gelb hervorgehoben. a) Schritt 1: Das Proton wird zur Essigsäuregruppe transferiert. b) Schritt 2: Die protonierte Essigsäuregruppe rotiert unter dem Einfluss des elektrischen Felds um die C-C-Bindung. c) Schritt 3: Das Proton wird auf ein Wassermolekül auf der anderen Seite der Essigsäuregruppe transferiert. d) Schritt 4: Nach Abgabe des Protons kehrt die Essigsäuregruppe in ihre Ruhestellung zurück (wie in Schritt 1).

in dem das Proton den Nanokanal an der unteren Öffnung verlässt und dem Moment, in dem es oben wieder in den Nanokanal eintritt. τ' gibt die mittlere Dauer von Schritt 0 wieder und τ die für die Schritte 1–3. Für breitere Kanäle in stärkeren elektrischen Feldern, d. h. NT_{95} in Feldern von 10, 15 und 20 $V\,nm^{-1}$, war τ' (7.5, 5.8 bzw. 4.0 ps) länger als τ (3.8, 3.6 bzw. 3.9 ps). Für engere Kanäle in schwächeren Feldern hingegen, d. h. NT_{81} in einem Feld von 20 $V\,nm^{-1}$ und NT_{95} in einem Feld von 5 $V\,nm^{-1}$, war τ' (2.7 bzw. 4.8 ps) kürzer als τ (11.6 bzw. 58.4 ps). Diese Ergebnisse zeigen, dass, wie erwartet, Schritt 0 der geschwindigkeitsbeschränkende Schritt für weite Kanäle unter stärkeren elektrischen Feldern ist, wohingegen die Schritte 1–3 in den anderen Fällen geschwindigkeitsbeschränkend sind (insbesondere die Schritte 2 und 3). In Schritt 2 muss die Essigsäuregruppe die sterischen Überlappungen mit der Innenwand überwinden. In Schritt 3 muss zur Abgabe des Protons der höhere pK_s -Wert der Essigsäuregruppe gegenüber Wasser überwunden werden. Dichteverteilungen der Protonen entlang der Röhrenachse zeigen, dass die Schritte 2 und 3 für schwächere Felder und/oder engere Röhren schwieriger sind (und folglich länger dauern, siehe die Hintergrundinformationen).

In thermodynamischer Hinsicht bestimmt die Nernst-Gleichung den pH-Gradienten, der sich aufgrund eines elektrochemischen Potentials über eine Grenzschicht aufbaut. Im vorliegenden Fall beeinflusst das elektrische Potential ebenfalls die Beweglichkeit der rotierbaren Gruppe, des Steuerelements. Die Stärke des elektrischen Felds, das erforderlich ist, um das Gatter zu öffnen (d. h. die Barrieren der

Schritte 1 und 2 zu überwinden), drückt ebenfalls die Fähigkeit des gesteuerten Kanals aus, kinetisch den unerwünschten Rückfluss zu blockieren. Anders ausgedrückt gibt es den maximalen pH-Gradienten an, den ein bestimmter Kanal aufrecht erhalten kann. Wir haben Kanäle mit verschiedenen Steuerelementen getestet: 1) mit einer längeren rotierbaren Gruppe und/oder einem größeren Kanaldurchmesser, um die Rotationsbarriere zu verringern, sowie 2) mit einer rotierbaren Gruppe mit einem geringeren pK_s -Wert (Details in den Hintergrundinformationen). In allen Fällen ist der Durchtritt von Protonen bei geringeren elektrischen Feldern als zuvor möglich. Wie in Abbildung 3 gezeigt, ermöglicht daher die Konzeption des Steuerelements, das für die Protonenleitung benötigte elektrische Feld einzustellen. Durch Auswahl geeigneter Steuerelemente, die kinetisch einen bestimmten maximalen pH-Gradienten aufrecht erhalten können, wird es daher möglich, gezielt bestimmte pH-Gradienten zu erzeugen.

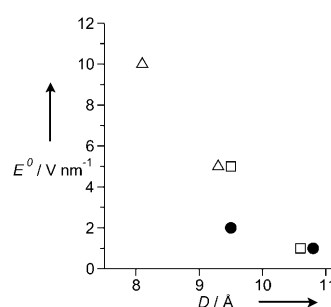


Abbildung 3. Stärke des elektrischen Felds E^0 , das erforderlich ist, um mit unterschiedlichen rotierbaren Gruppen im Kanal während einer Simulationsdauer von 1 ns Protonendurchtritte zu beobachten. (D : Durchmesser der Kanäle). Δ = COO^- , \square = CH_2COO^- , \bullet = CF_2COO^- .

Zusammenfassend haben wir Nanokanäle entworfen, die Protonen auf sehr effiziente Weise leiten können, wenn ein geeignetes elektrisches Feld angelegt wird. Die Untersuchung der intrinsischen Transferrate belegt, dass diese Bauteile ebenfalls schaltbar sind. Zum Öffnen des Schalters sind ein starkes elektrisches Feld und die Bindung eines Protons erforderlich. Wenn das elektrische Feld klein ist oder ausgeschaltet ist, wird die Protonenleitung aufgrund der sterischen Überlappung zwischen der Essigsäuregruppe und der Innenwand der Röhre und aufgrund ihres höheren pK_s -Werts ausgeschaltet. „Anschalten“ in stärkeren Feldern und „Aus-schalten“ in schwächeren Feldern (oder ganz ohne Feld) verleihen dem entworfenen Kanal die Fähigkeit, die Leitungsrichtung zu steuern. Er kann dadurch ein chemisches Potential zwischen den beiden Seiten des Bauteils erzeugen und kinetisch aufrecht erhalten. Die Stärke des Potentials kann über die chemischen Eigenschaften der rotierbaren Gruppe und den Durchmesser des Kanals eingestellt werden.

Methoden

Die entworfenen Kanäle wurden in quaderförmigen Kästen ($x = 4.5\,nm$, $y = 4.5\,nm$, $z = 3.8\,nm$) mit SPC/E-Wassermolekülen^[26] sol-

vatisiert. Die Röhrenachse verlief parallel zur z-Achse. Q-HOP-MD-Simulationen^[25] wurden für jedes System für verschiedene von z₋-nach z₊-Richtung angelegte elektrische Felder durchgeführt. Insgesamt wurden 25 Simulationen mit 1.0 bis 1.5 ns Dauer durchgeführt. Die Gesamtdauer betrug 26.8 ns. Alle Simulationen wurden mit einer modifizierten Version des Programms NWChem 4.7^[21,27] mit dem AMBER99-Kraftfeld^[28] durchgeführt. Alle Wassermoleküle sowie die Essigsäuregruppe wurden als mögliche Donoren/Akzeptoren betrachtet. Alle Protonen der Wassermoleküle waren transferierbar. Die Positionen der Graphitschicht und der Kohlenstoffatome am Eingang und Ausgang der Röhre wurden festgehalten. Alle 10 Schritte wurden mögliche Protonentransferprozesse getestet. Schnappschüsse wurden ebenfalls alle 10 Schritte abgespeichert, um alle „Hopping“-Prozesse aufzuzeichnen.

Eingegangen am 29. April 2010,
veränderte Fassung am 7. Oktober 2010
Online veröffentlicht am 17. Dezember 2010

Stichwörter: Aktiver Transport · Kohlenstoffnanoröhren · Moleküldynamiksimulationen · Protonenkanäle · Protonentransfer

- [1] P. Mitchell, *Nature* **1961**, 191, 144.
- [2] I. T. Arkin, H. F. Xu, M. O. Jensen, E. Arbely, E. R. Bennett, K. J. Bowers, E. Chow, R. O. Dror, M. P. Eastwood, R. Flitman-Tene, B. A. Gregersen, J. L. Klepeis, I. Kolossvary, Y. B. Shan, D. E. Shaw, *Science* **2007**, 317, 799.
- [3] H. Michel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 12819.
- [4] H. Luecke, B. Schobert, H. T. Richter, J. P. Cartailler, J. K. Lanyi, *Science* **1999**, 286, 255.
- [5] S. Iwata, C. Ostermeier, B. Ludwig, H. Michel, *Nature* **1995**, 376, 660.
- [6] C. Hunte, E. Screpanti, M. Venturi, A. Rimón, E. Padan, H. Michel, *Nature* **2005**, 435, 1197.
- [7] C. Olesen, M. Picard, A.-M. L. Winther, C. Gyrup, J. P. Morth, C. Oxvig, J. V. Møller, P. Nissen, *Nature* **2007**, 450, 1036.
- [8] R. K. Soong, G. D. Bachand, H. P. Neves, A. G. Olkhovets, H. G. Craighead, C. D. Montemagno, *Science* **2000**, 290, 1555.
- [9] M. Schliwa, G. Woehlke, *Nature* **2003**, 422, 759.
- [10] M. G. L. van den Heuvel, C. Dekker, *Science* **2007**, 317, 333.
- [11] F. Xia, W. Guo, Y. Mao, X. Hou, J. Xue, H. Xia, L. Wang, Y. Song, H. Ji, Q. Ouyang, Y. Wang, L. Jiang, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 8345.
- [12] K. D. Kreuer, S. J. Paddison, E. Spohr, M. Schuster, *Chem. Rev.* **2004**, 104, 4637.
- [13] R. Ballardini, V. Balzani, A. Credi, M. T. Gandolfi, M. Venturi, *Acc. Chem. Res.* **2001**, 34, 445.
- [14] I. M. Bennett, H. M. V. Farfano, F. Bogani, A. Primak, P. A. Liddell, L. Otero, L. Sereno, J. J. Silber, A. L. Moore, T. A. Moore, D. Gust, *Nature* **2002**, 420, 398.
- [15] S. Joseph, R. J. Mashl, E. Jakobsson, N. R. Aluru, *Nano Lett.* **2003**, 3, 1399.
- [16] M. Majumder, X. Zhan, R. Andrews, B. J. Hinds, *Langmuir* **2007**, 23, 8624.
- [17] C. A. Wraight, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **2006**, 1757, 886.
- [18] C. Dellago, M. M. Naor, G. Hummer, *Phys. Rev. Lett.* **2003**, 90, 105902.
- [19] T. Kyotani, S. Nakazaki, W.-H. Xu, A. Tomita, *Carbon* **2001**, 39, 782.
- [20] J. C. Xu, G. A. Voth, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, 102, 6795.
- [21] W. Gu, T. Frigato, T. P. Straatsma, V. Helms, *Angew. Chem.* **2007**, 119, 2997; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 2939.
- [22] W. Gu, V. Helms, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 2080.
- [23] W. Im, B. Roux, *J. Mol. Biol.* **2002**, 322, 851.
- [24] A. Aksimentiev, K. Schulten, *Biophys. J.* **2005**, 88, 3745.
- [25] M. A. Lill, V. Helms, *J. Chem. Phys.* **2001**, 115, 7993.
- [26] H. J. C. Berendsen, J. R. Grigera, T. P. Straatsma, *J. Phys. Chem.* **1987**, 91, 6269.
- [27] T. P. Straatsma, M. Philippopoulos, J. A. McCammon, *Comput. Phys. Commun.* **2000**, 128, 377.
- [28] W. D. Cornell, P. Cieplak, C. I. Bayly, I. R. Gould, K. M. Merz, D. M. Ferguson, D. C. Spellmeyer, T. Fox, J. W. Caldwell, P. A. Kollman, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 5179.