



# **Konformationsanalyse von Zuckernucleotiden und Betrachtung ihrer Aktivität in der Galactosyltransferasereaktion**

Dem Fachbereich Chemie der Universität Oldenburg  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der  
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) angenommene Dissertation

von  
**Andreas Willecke**  
aus Delmenhorst

Oldenburg 2002

Erstreferentin: Prof. Dr. Sabine Köpper

Korreferent: Prof. Dr. Peter Köll

Tag der Disputation: 17.12.2002

Frau Prof. Dr. Sabine Köpper danke ich für die sehr interessante Themenstellung, ihre gute Betreuung und Diskussionsbereitschaft, sowie ihre Unterstützung bei der Verwirklichung neuer Ideen.

Herrn Prof. Dr. Peter Köll danke ich nicht nur für die freundliche Übernahme des Korreferats, sondern nicht weniger für die Schaffung einer Arbeitsumgebung, ohne die ich diese Arbeit nicht hätte realisieren können.

In diesem Zusammenhang möchte ich auch Frau Prof. Dr. K. Al-Shamery und Herrn Prof. Dr. G. Wittstock danken, die mir freundlicher Weise die Räumlichkeiten für die Durchführung dieser Arbeit zur Verfügung stellten.

Darüber hinaus gilt mein besonderer Dank

Herrn Dr. Marco Eissen, Herrn Dipl.-Chem. Harm Töpken, Frau Petra Kraus und Frau Katrin Epheser für anregende Diskussionen, die Hilfe und Freundschaft, Herrn Dr. Rainer Koch für die Unterstützung bei computergestützten Anwendungen, Herrn Dr. Arne Lützen für die gute Kooperation hinsichtlich der NMR-Spektroskopie, Herrn Dipl.-Chem. Jörg Dardemann für seine Zusammenarbeit und allen Kollegen für das angenehme Arbeitsklima,

der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Universität Oldenburg für ihre finanziellen Zuwendungen und der Universität Hannover für die Nutzung des Vektorrechners,

Frau Lih-Fang Kuo für ihre moralische Unterstützung und die wundervolle Zeit,

meinen Eltern, die mir insbesondere in schwierigen Zeiten immer beistanden.



---

## Inhaltsverzeichnis

|                                                                                    |    |
|------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Einleitung.....                                                                 | 1  |
| 1.1. $\beta$ -1,4-Galactosyltransferase (GalT).....                                | 2  |
| 1.2. Zuckernucleotide.....                                                         | 5  |
| 1.3. Nucleoside.....                                                               | 6  |
| 2. Problemstellung .....                                                           | 7  |
| 3. Methoden .....                                                                  | 8  |
| 3.1. Einführung.....                                                               | 8  |
| 3.2. NMR-Spektroskopie .....                                                       | 9  |
| 3.2.1. Skalare Kopplung.....                                                       | 9  |
| 3.2.2. Dipolare Kopplung .....                                                     | 10 |
| 3.2.3. C,H-Fernkopplungen .....                                                    | 12 |
| 3.3. Rechenmethoden .....                                                          | 14 |
| 3.3.1. Ab initio Rechnungen .....                                                  | 14 |
| 3.3.2. Semiempirische Rechnungen.....                                              | 16 |
| 3.3.3. RESP-Partialladungen .....                                                  | 17 |
| 3.3.4. Moleküldynamische (MD) Simulationen .....                                   | 17 |
| 3.3.5. Das AMBER-Kraftfeld .....                                                   | 19 |
| 3.3.6. Zeitlich gemittelte Randbedingungen .....                                   | 22 |
| 3.3.7. Quantenmechanische/molekülmechanische Rechnungen (QM/MM).....               | 24 |
| 3.3.8. Karplus-Beziehungen.....                                                    | 26 |
| 3.3.9. NOE-Aufbaukurven.....                                                       | 27 |
| 3.4. Konformationsbeschreibung cyclischer Systeme.....                             | 28 |
| 4. Entwicklung neuer Kraftfeldparameter für das Pyrophosphat.....                  | 30 |
| 4.1. Berechnungen mit existierenden AMBER-Kraftfeldern.....                        | 30 |
| 4.2. Kristallstrukturen.....                                                       | 31 |
| 4.3. Quantenmechanische Untersuchung von Dimethyldiphosphat (DMDP) .....           | 33 |
| 4.4. Quantenmechanische Untersuchung von Diphosphorsäurediisopropylester (DPP) ... | 38 |
| 4.5. Neue AMBER-Parameter für pyrophosphathaltige Verbindungen .....               | 40 |
| 4.6. Test der neuen Parameter .....                                                | 40 |
| 4.7. Ladungen.....                                                                 | 43 |
| 5. Konformation modifizierter Nucleoside .....                                     | 45 |
| 5.1. 3'-Desoxyuridin (3dU) .....                                                   | 52 |
| 5.1.1. Ergebnisse einer MD-Simulation.....                                         | 52 |
| 5.1.2. Vergleich theoretischer und experimenteller NMR-Daten.....                  | 55 |
| 5.2. 2',3'-Didesoxyuridin (ddU).....                                               | 59 |
| 5.2.1. Ergebnisse einer MD-Simulation.....                                         | 59 |
| 5.2.2. Vergleich theoretischer und experimenteller NMR-Daten.....                  | 63 |

## Inhalt

---

|        |                                                                                  |     |
|--------|----------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 5.3.   | 2'-Desoxy-2'-fluorouridin (2fU) .....                                            | 66  |
| 5.3.1. | Ergebnisse einer MD-Simulation .....                                             | 66  |
| 5.3.2. | Vergleich theoretischer und experimenteller NMR-Daten .....                      | 69  |
| 5.4.   | Zusammenfassung und Diskussion stereoelektronischer Effekte in Nucleosiden ..... | 73  |
| 6.     | Konformation von Zuckernucleotiden .....                                         | 78  |
| 6.1.   | Uridin-5'-O-diphosphor- $\alpha$ -glucose (UDP-Glc) .....                        | 82  |
| 6.1.1. | Ergebnisse einer MD-Simulation .....                                             | 82  |
| 6.1.2. | Vergleich theoretischer und experimenteller NMR-Daten .....                      | 90  |
| 6.2.   | Uridin-5'-O-diphosphor- $\alpha$ -galactose (UDP-Gal) .....                      | 96  |
| 6.2.1. | Ergebnisse einer MD-Simulation .....                                             | 96  |
| 6.2.2. | Vergleich theoretischer und experimenteller NMR-Daten .....                      | 99  |
| 6.3.   | 5,6-Dihydrouridin-5'-O-diphosphor- $\alpha$ -galactose (56dihydroUDP-Gal) .....  | 103 |
| 6.3.1. | Ergebnisse .....                                                                 | 103 |
| 6.3.2. | Vergleich theoretischer und experimenteller NMR-Daten .....                      | 108 |
| 6.4.   | 2'-Desoxyuridin-5'-O-diphosphor- $\alpha$ -galactose (2dUDP-Gal) .....           | 111 |
| 6.4.1. | Ergebnisse einer MD-Simulation .....                                             | 111 |
| 6.4.2. | Vergleich theoretischer und experimenteller NMR-Daten .....                      | 115 |
| 6.5.   | 3'-Desoxyuridin-5'-O-diphosphor- $\alpha$ -galactose (3dUDP-Gal) .....           | 118 |
| 6.5.1. | Ergebnisse .....                                                                 | 118 |
| 6.5.2. | Vergleich theoretischer und experimenteller NMR-Daten .....                      | 122 |
| 6.6.   | Diskussion und stereoelektronische Effekte in Zuckernucleotiden .....            | 126 |
| 7.     | Aktivitäten von Zuckernucleotiden in der GalT-Reaktion .....                     | 131 |
| 7.1.   | Korrelation zwischen Konformation und Aktivitäten der Substrate .....            | 136 |
| 7.2.   | Enthalpische Aspekte der Galactosyltransferasereaktion .....                     | 140 |
| 7.2.1. | Enthalpieberechnung .....                                                        | 143 |
| 7.2.2. | Konformation des Enzym-Substrat-Komplexes .....                                  | 143 |
| 7.2.3. | Dissoziationsenthalpien und Aktivitäten .....                                    | 144 |
| 7.2.4. | Vorhersagen über fluoridierte Zuckernucleotide .....                             | 147 |
| 8.     | Zusammenfassung .....                                                            | 149 |
| 9.     | Experimenteller Teil .....                                                       | 151 |
| 10.    | Anhang .....                                                                     | 178 |
| 10.1.  | KARPLUS.cpp .....                                                                | 178 |
| 10.2.  | CLUSTER.cpp .....                                                                | 196 |
| 10.3.  | C-P.c .....                                                                      | 205 |
| 10.4.  | Experimentelle und theoretisch ermittelte NOE-Aufbaukurven .....                 | 212 |
| 11.    | Literaturverzeichnis .....                                                       | 217 |

## Abkürzungsverzeichnis

|               |                                                    |
|---------------|----------------------------------------------------|
| 1D, 2D        | : ein-, zweidimensional                            |
| 2dU           | : 2'-Desoxyuridin                                  |
| 2fU           | : 2'-Desoxy-2'-fluorouridin                        |
| 3dU           | : 3'-Desoxyuridin                                  |
| 3fU           | : 3'-Desoxy-3'-fluorouridin                        |
| 5,6dihydroU   | : 5,6-Dihydrouridin                                |
| AM1           | : Austin Model 1                                   |
| AMBER         | : Assisted Model Building with Energy Refinement   |
| <i>ap, sc</i> | : <i>anti-periplanar, syn-clinal</i>               |
| ddU           | : 2',3'-Didesoxyuridin                             |
| dfU           | : 2',3'-Didesoxy-2',3'-difluorouridin              |
| DMDP          | : Diphosphorsäuredimethylester                     |
| DPP           | : Diphosphorsäurediisopropylester                  |
| Gal           | : Galactose                                        |
| GalP          | : Galactose-1-phosphat                             |
| GalT          | : Galactosyltransferase                            |
| gg, gt, tg    | : <i>gauche-gauche, gauche-trans, trans-gauche</i> |
| Glc           | : Glucose                                          |
| GT            | : Glycosyltransferase                              |
| HF            | : Hartree-Fock                                     |
| HMBC          | : Heteronuclear Multiple Bond Coherence            |
| HSQC          | : Heteronuclear Single Quantum Correlation         |
| MD            | : Moleküldynamik                                   |
| MM            | : Molekülmechanik                                  |
| MP            | : Møller-Plesset                                   |
| NOE           | : Nuclear Overhauser Enhancement                   |
| NOESY         | : Nuclear Overhauser and Exchange Spectroscopy     |
| PM3           | : Parametric Model 3                               |
| QM            | : Quantenmechanik                                  |
| RESP          | : Restraint Electrostatic Potential                |
| $t_1$         | : inkrementierbare Wartezeit eines NMR-Spektrums   |
| $\tau_C$      | : Korrelationszeit                                 |
| $\tau_m$      | : Mischzeit eines NOE-Experiments                  |
| U             | : Uridin                                           |
| UDP           | : Uridindiphosphat                                 |
| UMP           | : Uridinmonophosphat                               |





## 1. Einleitung

"Carbohydrates, as everybody knows, form a comprehensive group of naturally occurring substances, which include innumerable sugars and sugar derivatives, as well as high-molecular carbohydrates (polysaccharides) like starch and cellulose in plants and glycogen in animals. A polysaccharide molecule is composed of a large number of sugar or sugar-like units. Carbohydrates are of great importance in biology. The unique reaction, which makes life possible on Earth, namely the assimilation of the green plants, produces sugar, from which originate, not only all carbohydrates but, indirectly, also all other components of living organisms."<sup>1</sup>

Dieser Auszug aus einer Rede von K. Myrbäck spricht Stärke und Glycogen als Energiespeicher im Organismus und Zellulose als Stützgerüst in der pflanzlichen Zelle an, die durch ihre biochemische Funktion als Voraussetzung des Lebens auf der Erde angesehen werden können. Über 90% aller Proteine besitzen oligosaccharidische Bestandteile und werden von diesen in ihrer Löslichkeit, in ihren Transportwegen und in ihrer Stabilität beeinflusst. Auch in Zellerkennungsprozessen spielen Kohlenhydratkomponenten eine wichtige Rolle.

Monosaccharide können zu hochmolekularen Einheiten aufgebaut werden. Dabei wird eine große Anzahl von Enzymen benötigt, die zur Klasse der Glycosyltransferasen (GT) gehören. Bei diesen enzymatisch katalysierten Glycosylierungen werden aktivierte Monosaccharide auf einen Akzeptor übertragen, der entweder ein Saccharid, Oligosaccharid, eine Aminosäure, ein Peptid, Protein oder Lipid ist. Allgemein werden Glycosyltransferasen in Leloir-Weg- und Nicht-Leloir-Weg-Enzyme eingeteilt. Bei den Enzymen der ersten, größeren Gruppe dienen Monosaccharide, die über eine Pyrophosphatgruppe an ein Nucleosid verknüpft sind, als Substrate.

Uridindiphosphoglucose (UDP-Glc) wurde 1949 von L. F. Leloir als erstes Substrat einer solchen Glycosyltransferasereaktion identifiziert und der Substanzklasse der Zuckernucleotide zugeordnet. Im Jahr 1970 erhielt Leloir für seine Arbeiten an diesen Zuckernucleotiden den Nobelpreis. Inzwischen wird vermutet, dass ein paar hundert verschiedene Glycosyltransferasen und ihre entsprechenden Gene für die Synthese von Glykokonjugaten bei den Säugetieren verantwortlich sind.

## 1. Einleitung

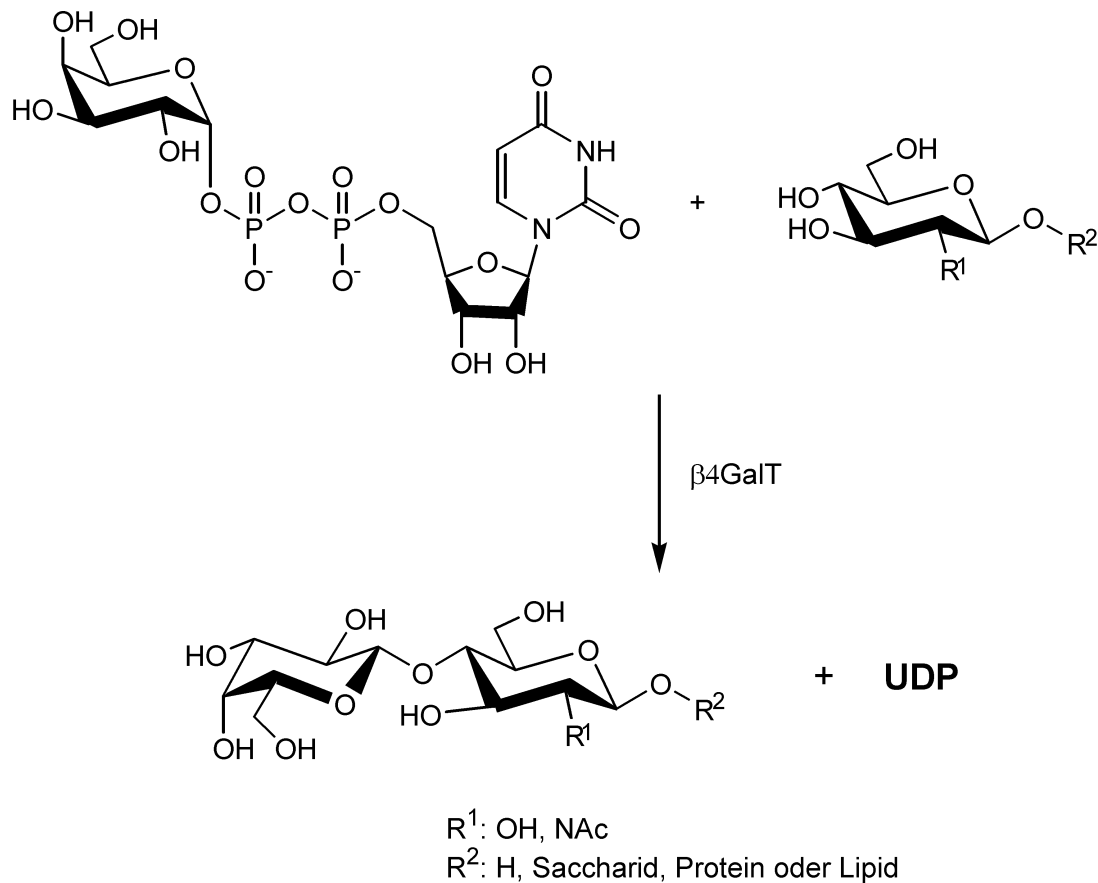
Mit der Entdeckung ihres großen pharmakologischen Potenzials werden Oligosaccharide verstärkt *in vitro* synthetisiert. Da sie jedoch in größeren Mengen auf rein chemischem Weg kaum zugänglich sind, finden GTs auch im Labor vermehrt ihre Anwendung.<sup>2</sup> Inzwischen sind über 30 verschiedene GTs kloniert und klassifiziert.<sup>3,4</sup> Die erste geklonte GT ist UDP-Galactose:N-acetyl-D-Glucosamin- $\beta$ -1,4-Galactosyltransferase-T1 ( $\beta$ 4Gal-T1),<sup>5</sup> die inzwischen eines der am besten charakterisierten Enzyme darstellt. Da sich diese Arbeit in wesentlichen Aspekten mit der  $\beta$ 4GalT beschäftigt, soll im Folgenden kurz auf ihr Vorkommen, auf Strukturmerkmale und ihre biologische Bedeutung eingegangen werden. In Kapitel 7 werden die Enzym-Substrat-Wechselwirkung und der Katalysemechanismus detaillierter beschrieben.

### **1.1. $\beta$ -1,4-Galactosyltransferase (GalT)**

GTs treten in praktisch allen Organismen auf, angefangen bei Bakterien und Pilzen über Pflanzen bis hin zu allen übrigen Tieren. Der menschliche Organismus besitzt praktisch in jeder Körperzelle GTs, die jedoch nicht frei löslich, sondern membrangebunden vorliegen. Die GTs bilden Cluster, die in bestimmten Organellen der eukaryotischen Zelle lokalisiert sind: Im endoplasmatischen Reticulum und im Golgi-Komplex. Das endoplasmatische Reticulum ist ein netzförmiges System aus Kanälen und Säckchen, die von einer Membran umhüllt sind, und steht mit dem Zellkern in Verbindung. Es dient dem Transport von Stoffen und der Synthese von Lipiden. Der Golgi-Komplex besteht aus flachen Stapeln und Bläschen. Dort werden die Oligosaccharide aufgebaut und Proteine zur späteren Ausscheidung angereichert. Die Bläschen bringen Stoffe an die Zelloberfläche und bilden gleichzeitig neue Zellmembranen.

$\beta$ 1,4-Galactosyltransferase (EC 2.4.1.38/90) überträgt Galactose, die als Uridindiphosphor-galactose aktiviert ist, auf einen Glucosebaustein. Das Enzym ist identisch mit dem A Protein von Lactosesynthase (EC 2.4.1.22), das neben der  $\beta$ 4GalT noch das Coenzym  $\alpha$ -Lactalbumin benötigt. Dieses Coenzym verändert die Affinität zum Akzeptor. Während das freie Enzym bevorzugt N-Acetyllactosaminstrukturen bildet, wird in Anwesenheit des Coenzym Lactose synthetisiert. Diese Affinitätsänderung des Enzyms wird vor allem bei Säugtieren während der Schwangerschaft beobachtet. Im Gegensatz zur  $\alpha$ -1,4-Galactosyl-

transferasereaktion läuft die Reaktion von  $\beta 4\text{GalT}$  unter Inversion am anomeren Zentrum der Galactose ab. Die Galactose wird dabei hoch selektiv an die 4-Position des Glucosebausteins geknüpft (Abbildung 1-1).



**Abbildung 1-1:** Übertragung von Galactose auf einen Glucosebaustein in der  $\beta$ -1,4-Galactosyltransferasereaktion.

Durch bioinformatische Methoden wurden große Unterschiede in der Primärstruktur verschiedener GTs aufgedeckt. Dennoch besitzen sie einige gemeinsame charakteristische Strukturmerkmale von Typ II membrangebundenen Enzymen: Ein kurzes Stück des N-terminalen Endes ist im Cytoplasma lokalisiert, gefolgt von einem einzelnen transmembranen Segment. Es schließt sich eine Stammregion unterschiedlicher Länge an, durch die sich das Enzym wie an einem Arm bewegen kann. Das große C-terminale Ende stellt das katalytische Zentrum dar.<sup>6</sup> Bei  $\beta 4\text{GalT}$  bilden die ersten 129 Aminosäuren des N-terminalen Endes diesen beweglichen Arm, die für die Aktivität des Enzyms nicht entscheidend sind. Jedoch ist ein Verlust der Transferaseaktivität zu beobachten, wenn weitere 13 Aminosäuren fehlen.<sup>7</sup> Die Stammregion der  $\beta 4\text{GalT}$  ist proteasesensitiv, wodurch es zu einer Abspaltung des En-

## 1. Einleitung

---

zyms von der Membran kommen kann. Das hieraus resultierende lösliche Enzym ist für die Galactosyltransferaseaktivität verantwortlich, die in Milch, im Blutserum oder im Speichel beobachtet wird.<sup>8</sup>

Bis zum Zeitpunkt des Schreibens dieser Arbeit waren sieben unterschiedliche menschliche Gene identifiziert, die verschiedene, aktive Proteine mit unterschiedlichen Affinitäten zum Akzeptor codieren und zur  $\beta$ 4GalT Familie gehören.<sup>9,10,11,12,13,14</sup> Einige  $\beta$ 4GalT-Gene, wie beispielsweise  $\beta$ 4GalT1, kommen praktisch in allen menschlichen Geweben vor und sind sowohl für N-Acetyllactosaminstrukturen in Glycokonjugaten als auch für die Lactosebildung verantwortlich, während andere eine eher untergeordnete Rolle spielen.<sup>10,15</sup> Die GalTs T1 - T4 übertragen Gal auf GlcNAc in verschiedenen Glycokonjugaten,<sup>5,9,11</sup> T5 und T6 hingegen verwenden Glc in Glucosylceramiden als Akzeptor.<sup>13,12</sup> Wie schon erwähnt, weisen GTs sehr starke Unterschiede in der Primärstruktur auf und selbst  $\beta$ 4GalT-Gensequenzen unterscheiden sich deutlich. In den eukaryotischen Zellen wurden jedoch vier kurze invariante Peptidsequenzen identifiziert, von denen das DxD (Asp x Asp) Motiv mit einer Ausnahme in allen Gensequenzen gefunden wurde.<sup>4</sup> Wie sich später herausstellte, spielt mindestens eine Aminosäure eine wesentliche Rolle bei der Komplexierung eines zweiwertigen Kations am katalytischen Zentrum.<sup>16</sup>

Geklonte cDNA, die membrangebundene  $\beta$ 4GalT des Rinds codiert, enthält 402 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 44876 Da. Aus Rindermilch gewonnene GalT besitzt zwei unterschiedliche Molekulargewichte von 51 kDa und 42 kDa. Da die Proteinsequenzanalyse der isolierten GalT aus Rindermilch mit der Gensequenz des Klons übereinstimmt, ist die Differenz im Molekulargewicht vermutlich auf unterschiedliche Glycosylierungen zurückzuführen. Zwei Aminosäurereste (Asp90 und Asp117) könnten hierbei mit Oligosacchariden verknüpft sein.<sup>17</sup>

Neben der Funktion des Enzyms, Saccharide und Proteine etc. zu glycosylieren, wird bei Mäusen auf der Oberfläche von Spermazellen eine Rezeptorwirkung der  $\beta$ 4GalT beobachtet, die bei der Befruchtung der Eizelle eine Rolle spielt.<sup>18,19</sup> Darüber hinaus wurden durch Ausschaltung des  $\beta$ 4GalT Gens die pathologischen Effekte eines  $\beta$ 4GalT-Mangels untersucht. Mäuse ohne GalT werden zwar normal geboren, zeigen jedoch Wachstumsverzug, hohe Sterblichkeit, Wucherungen auf den Epithelzellen der Haut, eine Erweiterung des Dünndarms, spärlichen Haarwuchs, schlecht entwickelte Lungen und Dehydrierung.<sup>20,21</sup> Außer-

dem spielen Galactosyltransferaseenzyme eine Schlüsselrolle bei der Schleimbildung im menschlichen Organismus. Die Menge der menschlichen Magenschleimhaut korreliert direkt mit der Galactosyltransferaseaktivität.<sup>22</sup> Jedoch wird bei Säugetieren erst nach der Geburt eine Galactosyltransferaseaktivität beobachtet.<sup>23</sup>

Veränderte Galactosyltransferaseaktivitäten werden auch mit einigen Krankheiten in Verbindung gebracht. Bei bestimmten Krebsformen tritt eine veränderte, häufig unkontrollierte Glycosylierung auf.<sup>24</sup> Rheumatoide Arthritis wird ebenfalls mit einem Defekt der Galactosyltransferaseaktivität in Verbindung gebracht, da eine Oligosaccharidkette des Glycoproteins Immunglobulin IgG nicht mehr galactosyliert ist.<sup>25</sup>

## 1.2. Zuckernucleotide

Acht natürliche Donorsubstrate UDP-Glc, UDP-Gal, UDP-GlcNAc, UDP-GalNAc, GDP-Man, GDP-Fuc, UDP-GlcUA, CMP-NeuAc werden von den Leloir-Weg-Glycosyltransferasen verwendet. Auf Grund des Diphosphats sind sie energiereiche Verbindungen<sup>26</sup> und besitzen somit gute Eigenschaften als Donorsubstrate, da das Gleichgewicht auf Seiten der Produkte liegt. Aus den hohen Energien resultieren aber auch thermische Instabilität und Hydrolyseempfindlichkeit.<sup>27</sup> Auf Grund der synthetischen Bedeutung der Zuckernucleotide sind ihre Konformationen in Lösung von großem Interesse. Jedoch war zu Beginn dieser Arbeit nur sehr wenig über ihre dreidimensionale Struktur bekannt.<sup>28,29</sup> Aus konformativer Sicht können Zuckernucleotide sinnvoller Weise in die drei Untereinheiten Nucleotid, Diphosphat und Pyranose aufgegliedert werden. Die Kristallstruktur zeigte die räumliche Struktur von UDP-Glc,<sup>28</sup> ließ jedoch nur wenige Rückschlüsse auf die Konformation in Lösung zu. Mit Hilfe NMR-spektroskopischer Methoden wurde die Konformation von Zuckernucleotiden in Lösung näher untersucht.<sup>29</sup> Allerdings war die Datenmenge nicht ausreichend um ein vollständiges Bild zu erhalten. Während über die Pyranose und das Nucleotid genauere Aussagen getroffen werden konnten, herrschte beim Diphosphat größere Unsicherheit.<sup>29</sup>

### 1.3. Nucleoside

Der Nucleosidteil der Zuckernucleotide ist per se ebenfalls von großem Interesse. Nucleoside besitzen nicht nur große Bedeutung als Speicher genetischer Information. Das Augenmerk richtet sich verstärkt auf ihre antiviralen und antitumoren Eigenschaften.<sup>30,31</sup> Speziell gegen den menschlichen Immunschwäche Virus Typ 1 (HIV-1) waren bis Anfang des Jahres 2001 sechs Nucleosid Reverstranskriptase Inhibitoren (NRTIs), vier Protease Inhibitoren und nur drei weitere nicht Nucleosid Reverstranskriptase Inhibitoren bei der FDA als Therapeutikum gemeldet. Und auch für die zukünftige Entwicklung werden den NRTIs die besten Chancen eingeräumt.<sup>32</sup> Als erste Behandlungskur gegen AIDS wird zurzeit häufig ein Kombipräparat mit drei aktiven Bestandteilen eingesetzt,<sup>33</sup> das aus den Nucleosiden AZT (3'-Azido-3'-desoxythymidin)<sup>34</sup>, 3TC ( $\beta$ -L-2',3'-Didesoxy-3'-thiacytidin)<sup>35</sup> und einem Protease Inhibitor besteht. Besonderes Interesse gilt ihrer Konformation<sup>36</sup> in Lösung, da eine Korrelation zwischen den antiviralen Eigenschaften der Nucleoside und ihrer räumlichen Struktur eindeutig nachgewiesen wurde.<sup>30,37</sup> Ihre Wechselwirkungen mit der Reverstranskriptase des HIV wurden kürzlich in einer Molecular-Modeling-Untersuchung aufgeklärt.<sup>38</sup>

### **2. Problemstellung**

In praktisch allen lebenden Organismen spielen Galactosyltransferasereaktionen eine zentrale Rolle und bekommen auch *in vitro* eine immer stärkere Bedeutung. Für das Verständnis von Galactosyltransferasereaktionen sind die Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und seinem Donorsubstrat entscheidend. Da ihr Zusammenwirken bisher nur unzureichend verstanden wird, soll in dieser Arbeit die Konformation des natürlichen Donorsubstrats UDP-Gal und einiger modifizierter aktiver Vertreter in Lösung mit NMR- und Molecular-Modeling-Methoden untersucht und mit ihrer Aktivität am Enzym korreliert werden. Um darüber hinaus Vorhersagen über die Aktivität modifizierter Donorsubstrate zu ermöglichen, wird der Enzym-Substrat-Komplex in die Betrachtung mit einbezogen.

Die Konformationsanalyse von Zuckernucleotiden in Lösung ist eine komplexe Aufgabenstellung, die in mehrere Teilprobleme zerlegt werden soll. Zunächst soll der Nucleosidteil eingehender untersucht werden, da einige Aspekte im konformativen Verhalten nicht eindeutig geklärt sind. Der Diphosphatteil kann mit NMR-Methoden nicht ausreichend analysiert werden. Daher sollen rechnerische Parameter entwickelt werden, um das Methodenarsenal zu vervollständigen und um schließlich ein komplettes Bild von der Konformation und dem flexiblen Verhalten der Zuckernucleotide zu erhalten.

### 3. Methoden

#### 3.1. Einführung

Zur Konformationsanalyse von Nucleosiden und Zuckernucleotiden stehen prinzipiell eine Reihe von Methoden zur Verfügung. Für gelöste Substanzen erlangte in den letzten Jahren die NMR-Spektroskopie besondere Bedeutung. Über die räumliche Struktur und das dynamische Verhalten von Molekülen liefert sie im Wesentlichen Informationen durch die skalaren Kopplungen von Atomkernen und durch NOE-Effekte. Eine eindeutige Konformationszuordnung aus diesen NMR-Daten erweist sich bei flexiblen Systemen, die in mehr als einem Zustand vorliegen, aus mehreren Gründen als schwierig. Die NMR-Daten spiegeln lediglich Mittelwerte über einen ganzen Konformationsraum wieder, aus denen nicht ohne Weiteres einzelne Zustände erhalten werden können. NOEs sind nicht immer proportional zu den Kernabständen und aus Kopplungskonstanten lassen sich auf Grund der Natur der Karplus-Beziehung meist keine eindeutigen Torsionswinkel berechnen. Schließlich ist die Quantität der NMR-Daten oft einfach nicht ausreichend, so dass das System häufig unterbestimmt ist.

Mit Hilfe von moleküldynamischen (MD) Simulationen lässt sich ein vollständiges Ensemble aller Konformationen in Lösung generieren, das in der Lage ist, makroskopische Eigenschaften zu beschreiben. Da solche MD-Rechnungen auf Grund der momentanen Rechengeschwindigkeit zurzeit nur mit Kraftfeldmethoden, allenfalls mit semiempirischen Methoden möglich sind und viele Näherungen enthalten, ist es zweckmäßig, aus den MD-Simulationen makroskopische Daten, wie z.B. NMR-Daten, zu berechnen und diese mit den experimentell ermittelten zu vergleichen. Schon im Vorfeld offenbarte eine Diskrepanz zwischen Theorie und Experiment Fehler bei den MD-Simulationen,<sup>39</sup> so dass aus den NMR-Experimenten Randbedingungen erstellt wurden, die den MD-Simulationen auferlegt wurden.



### 3.2. NMR-Spektroskopie

Für die Konformationsanalyse der hier untersuchten Moleküle wurde neben eindimensionalen (1D) NMR-Experimenten auf Grund von Signalüberlagerungen auch zweidimensionale (2D) Techniken verwendet, wie gs-DQF-H,H-COSY-, TOCSY-, gs-HSQC- und gs-HMBC-Experimente. Allerdings bilden einige hier untersuchte Moleküle trotz hoher Magnetfeldstärken Spinsysteme höherer Ordnung, die erst mit Hilfe des Computerprogramms LAOCOON5<sup>40</sup> interpretiert werden konnten. Um weitere wichtige konformative Parameter zu erhalten, wurden NOESY-Experimente bei verschiedenen Mischzeiten und Experimente zur Ermittlung von C,H-long-range Kopplungen durchgeführt. Durch Auswertung der NMR-Experimente wurden für die Konformationsanalyse vicinale Kopplungskonstanten und NOE-Aufbaukurven erhalten, die Informationen über die Orientierung bestimmter Torsionswinkel und über Kernabstände einzelner Protonen geben. Die wichtigsten hier verwendeten Experimente sollen nur kurz erörtert werden, da sie anderweitig detailliert beschrieben sind.<sup>41</sup>

#### 3.2.1. Skalare Kopplung

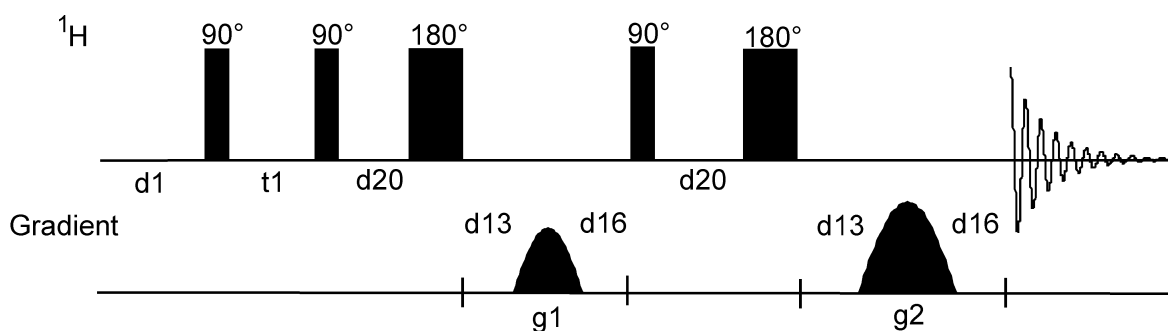
Die Spins von Atomkernen können über Elektronen meist entlang von Bindungen skalar miteinander gekoppelt sein und erzeugen so die Feinstruktur von NMR-Signalen. Besondere Bedeutung für die Konformationsanalyse erlangten  $^3J$ -Kopplungen, da sie von den Torsionswinkeln der beteiligten Atomkerne abhängig sind (vgl. Kapitel 3.3.8). Bei größeren Molekülen kann eine Signalüberlagerung die Zuordnung der Resonanzen und den dazugehörigen Kopplungen erschweren. Eine Reihe 2D Techniken ermöglicht trotz Signalüberlagerung die Zuordnung von Protonen, wie z.B. das H,H-COSY-<sup>42</sup>, das J-aufgelöste  $^1H$ -<sup>43</sup>, das E.COSY-<sup>44</sup> oder das P.E.COSY-Experiment<sup>45</sup>.

Während sich das normale H,H-COSY Experiment lediglich zur Zuordnung der Signale eignet, lassen sich bei 2D J-aufgelösten Spektren die Kopplungskonstanten bestimmen. Allerdings sind die 2D J-NMR-Spektren in  $t_1$  phasenmoduliert und daher nicht zu reinen Phasen korrigierbar. Die gemischten Phasen führen zu verfälschten Linienabständen, so dass die Bestimmung von Kopplungskonstanten unzuverlässig wird.<sup>41</sup> Geeigneter sind E.COSY- und

### 3. Methoden

P.E.COSY-Experimente, die eine Präzisionsbestimmung von Kopplungskonstanten zulassen. Ihre Auswertung ist jedoch vergleichsweise schwierig.<sup>41</sup>

In dieser Arbeit wurde das gradientenselektierte doppelquantengefilterte H<sub>2</sub>H-COSY-Experiment<sup>46</sup> sowohl zur Zuordnung der Signale als auch zur Bestimmung der Kopplungskonstanten gewählt, falls eine Überlagerung von Signalen dieses erforderte. Der Doppelquantenfilter wird durch zwei 180° Pulse und die z-Gradienten verwirklicht und sorgt für kleine Diagonalsignale. Außerdem kann das FID, im Gegensatz zum normalen H<sub>2</sub>H-COSY, quadratisch detektiert werden, so dass nach phasensensitiver Fourier-Transformation die aktive Kopplung in Antiphase und alle anderen Kopplungen in-Phase erscheinen. Bei ausreichend guter Auflösung in  $t_2$  können die Kopplungskonstanten direkt aus den Kreuzsignalen erhalten oder nach inverser Fourier-Transformation einer Spur des 2D Spektrums, anschließendem Zero-Filling und Retransformation aus dem 1D Spektrum gewonnen werden.



**Abbildung 3-1:** Pulsschema des gradientenselektierten, phasensensitiven, doppelquantengefilterten H<sub>2</sub>H-COSY Experiments.

#### 3.2.2. Dipolare Kopplung

Die dipolare Kopplung spielt eine völlig andere Rolle als die skalare, da sie ein Relaxationsphänomen ist. Sie beruht auf der Wechselwirkung der magnetischen Momente zweier Spins durch den Raum. Die schnelle Umorientierung der Moleküle in Lösung, die durch die Korrelationszeit  $\tau_c$  definiert ist, erzeugt an den Orten der Spins magnetische Wechselfelder, die zu einer gegenseitigen Beeinflussung und schließlich zur Relaxation der Kerne führen. Allerdings relaxieren die Spins nicht unabhängig voneinander. Vielmehr wird bei diesem Prozess Magnetisierung von einem Kern auf den anderen übertragen. Der Austausch von Magnetisierung der Kerne kommt durch die Polarisierung in z-Richtung  $I_z$  zu Stande. Diese Übertragung der z-Magnetisierung wird als NOE-Effekt bezeichnet und allgemein als Ände-

lung der Intensität eines Signals I bezeichnet, die durch die Änderung des Besetzungsverhältnis eines zweiten Spins S erfolgt (Gleichung 3-2).<sup>47</sup>

Prinzipiell relaxieren die Kerne nach der Anregung wieder in den Grundzustand. Entscheidend für den NOE sind die Übergangswahrscheinlichkeiten der Nullquanten- ( $W_0$ ) und der Doppelquantenübergänge ( $W_2$ ). Ob vorwiegend  $W_0$  oder  $W_2$  wirkt, ist von der Korrelationszeit  $\tau_c$  und somit von der Molekülgröße abhängig. Wenn die Korrelationszeit größer als die reziproke Spektrometerfrequenz  $\omega_0$  ist, die Umorientierung also vergleichsweise langsam stattfindet, finden vorwiegend die niederfrequenten Nullquantenübergänge  $W_0$  statt. Der NOE wird negativ und kann bis zu 100% der ursprünglichen Signalintensität  $I_0$  betragen. Bei kleinen Molekülen und schneller Umorientierung herrschen die hochfrequenten Doppelquantenübergänge  $W_2$  vor. Der NOE ist positiv und besitzt maximal 50% der Ausgangssignalintensität.

Die Solomongleichung formuliert die Intensitätsänderung einer Resonanz I durch Störung einer anderen Resonanz S (NOE) in Abhängigkeit der Übergangswahrscheinlichkeiten, wobei die Intensitäten I und S proportional zu den longitudinalen Operatoren  $I_z$  und  $S_z$  sind,

$$\frac{dI_z}{dt} = -(I_z - I_z^0)(W_0 + 2W_{1I} + W_2) + (S_z - S_z^0)(W_0 + W_2) \quad \text{Gleichung 3-1}$$

Wobei der Term  $W_0 + W_{1I} + W_2$  die longitudinale Relaxationsrate  $\rho_{IS}$  und  $W_0 + W_2$  die Kreuzrelaxationsrate  $\sigma_{IS}$  ist. Bei Sättigung des Kerns S ist die Intensitätsänderung des Kerns I eine einfache Funktion der Relaxationsraten,

$$f_I(S) = \frac{\gamma_S \sigma_{IS}}{\gamma_I \rho_{IS}} \quad \text{Gleichung 3-2}$$

wobei  $\gamma$  das gyromagnetische Verhältnis des Kerns darstellt. Der Quotient  $\gamma_S/\gamma_I$  ist bei homonuclearen Experimenten naturgemäß eins. In einem Multi-Spin-System verliert der NOE seine direkte Abhängigkeit zu einem einzelnen Kern. Vielmehr wechselwirkt er mit einer Vielzahl von anderen Kernen (

Gleichung 3-3) – ein Effekt, der vor allem bei längeren Mischzeiten auftritt. Diese Spindiffusion hat Einfluss auf die Signalintensität eines betrachteten Kerns, weshalb die Gleichung 3-2 erweitert werden muss:

$$f_I(S) = \eta_{\max} \frac{r_{IS}^{-6} - \sum_X f_X(S) r_{IX}^{-6}}{r_{IS}^{-6} + \sum_X r_{IX}^{-6}} \quad \text{Gleichung 3-3}$$

$$\eta_{\max} = \frac{5 + \omega^2 \tau_c^2 - 4\omega^4 \tau_c^4}{10 + 23\omega^2 \tau_c^2 + 4\omega^4 \tau_c^4} \quad \text{Gleichung 3-4}$$

$\eta_{\max}$  beschreibt die maximale NOE-Verstärkung. Aus einer derartigen Gleichung lassen sich nicht ohne weiteres Kernabstände bestimmen. Andererseits können aber bei Kenntnis aller Kernabstände Signalintensitäten berechnet werden, die als Vergleich zwischen Experiment und Theorie dienen (vgl. Kapitel 3.3.9).

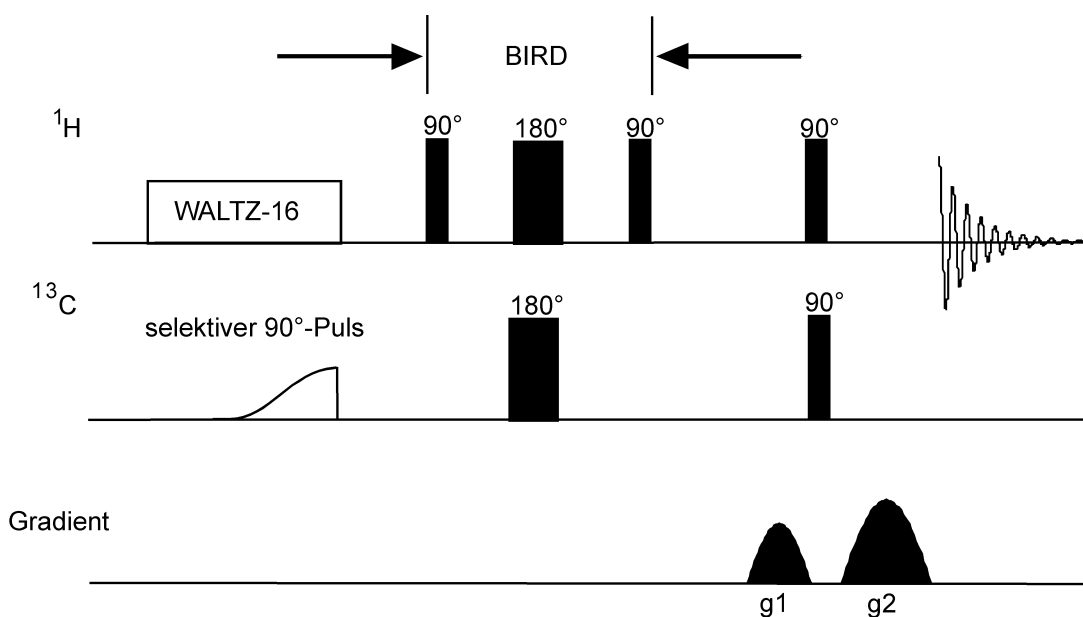
1D<sup>48</sup> oder 2D<sup>49</sup> NOESY-Experimente können unter Verwendung kürzerer Mischzeiten durchgeführt werden, wobei näherungsweise Gleichung 3-2 gilt. Da allerdings der NOE ein Relaxationsprozess ist, baut er sich exponentiell mit der Zeit auf, so dass bei längeren Mischzeiten größere NOEs zu erwarten sind. Die eindimensionale Variante besitzt naturgemäß eine gute Auflösung und ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis. Um jedoch alle relevanten Kerne zu erfassen, müssen vergleichsweise viele Experimente durchgeführt werden, was mit langen Messzeiten verbunden ist. Vorteilhafter sind 2D NOESY-Experimente, die zeitgleich alle relevanten NOEs erfassen und die in dieser Arbeit zur Konformationsanalyse von Nucleosiden und Zuckernucleotiden durchgeführt wurden.

#### 3.2.3. C,H-Fernkopplungen

Wie in Kapitel 5 noch genauer erläutert werden wird, beschränkt sich die Konformationsanalyse von Nucleosidstrukturen auf drei Parameter, wobei H,H-Kopplungskonstanten lediglich über  $\gamma$  und  $\phi$  Aufschluss geben können. Zur Analyse der Orientierung der Base hingegen können heteronucleare Kopplungen zwischen Kohlenstoffatomen und Wasserstoffatomen herangezogen werden. Diese C,H-Kopplungen sind prinzipiell aus einfachen 1D gekoppelten <sup>13</sup>C-Experimenten erhältlich. Große Nachteile bestehen jedoch neben der Unempfindlichkeit der <sup>13</sup>C-Experimente in der starken Aufspaltung der <sup>13</sup>C-Signale, wodurch eine Interpretation der Spektren selten möglich ist und sich die Intensität nochmals verringert. Selektive Anregung bestimmter <sup>13</sup>C-Resonanzen vereinfachen die Interpretation erheblich.

In jüngerer Zeit wurden deshalb 1D gradientenselektierte HMBC-<sup>50</sup> und HSQC-Experimente<sup>51</sup> für die Bestimmung von C,H-Fernkopplungen entwickelt.

Das Experiment, das in dieser Arbeit verwendet wurde, wurde 1994 von *Freeman et al.*<sup>52</sup> vorgeschlagen und 1996 von *Nishida et al.*<sup>53</sup> durch den Einsatz von z-Gradienten verbessert. Es verwendet selektive Pulse zu Beginn der Pulssequenz. Durch den WALTZ-16-Entkoppler werden alle Protonenresonanzen gesättigt und die gewünschte <sup>13</sup>C-Resonanz durch einen Halb-Gauss-Puls selektiv angeregt. In der nachfolgenden Zeit entwickeln sich nur die Kopplungen und chemischen Verschiebungen der Protonenresonanzen, die mit dem selektiv angeregten <sup>13</sup>C-Signal koppeln, und werden anschließend auf dem <sup>1</sup>H-Kanal detektiert. Der BIRD-Filter auf dem <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-Kanal dient zur Unterdrückung unerwünschter Signale von an <sup>12</sup>C-gebundenen Protonen. Die z-Gradienten eliminieren das Lösungsmittelsignal, so dass nach Hadamard-Transformation artefaktfreie 1D Spektren resultieren. Die aktive C,H-Kopplung erscheint als Antiphase-Signal, während alle übrigen H,H-Kopplungen in-Phase sind. Die Pulsfolge ähnelt einem einfachen COSY-Experiments mit Ausnahme des BIRD-Filters, der sich jedoch nur auf an <sup>12</sup>C-gebundene Protonen auswirkt.



**Abbildung 3-2:** Pulssequenz eines gradientenselektierten Hadamard-Experiments zur Bestimmung von C,H-Fernkopplungen.

### 3.3. Rechenmethoden

#### 3.3.1. Ab initio Rechnungen

Sämtliche quantenmechanische Rechnungen basieren auf der Schrödinger-Gleichung. Auf Grund der Beobachtung, dass sich Elektronen sowohl wie Teilchen als auch wie Wellen verhalten, wurde die Schrödinger-Gleichung aus dem Welle-Teilchen-Dualismus von de Broglie und der Beschreibung einer Welle aus der Physik hergeleitet. Die zeitunabhängige Formulierung dieser Gleichung findet Lösungen zur Beschreibung der Energien  $E$  von Systemen in Abhängigkeit einer Wellenfunktion  $\Psi$ , wobei  $\hat{H}$  den Hamilton-Operator darstellt:

$$\hat{H}\Psi = E\Psi$$

**Gleichung 3-5**

Die konkreten Lösungen dieser Gleichung hängen von den jeweiligen Randbedingungen des betreffenden Problems ab. Für ein Einelektronensystem kann die Schrödinger-Gleichung durch den Separationsansatz der drei Raumkoordinaten exakt gelöst werden und führt für das Wasserstoffatom zu den s-, p-, d- und f-Atomorbitalen der unterschiedlichen Perioden. Dieser Separationsansatz, der für ein einzelnes Elektron exakt möglich ist, kann bei Mehr-elektronenproblemen nicht mehr durchgeführt werden. Insofern bedient man sich eines Verfahrens nach der Hartree-Fock-Theorie (HF). Die Wellenfunktion für das erste Elektron wird vom Wasserstoff übernommen. Damit wird die Funktion eines zweiten Elektrons berechenbar. Die Lösung wird für das zweite Elektron vorgegeben und damit wieder das erste Elektron berechnet. Diese Prozedur wird solange durchgeführt (Iteration) bis die Wellenfunktionen in vorgegebenen Grenzen konstant bleiben (SCF-Verfahren, self consistent field). Nachteil dieser Methode ist, dass die Elektronen wie ein statisches Feld aufgefasst werden und nicht berücksichtigt wird, dass sich die gleichgeladenen beweglichen Elektronen ausweichen werden. Die nach der HF Methode berechneten Energien liegen also immer höher als die tatsächlichen. Neuere Ansätze tragen dieser Problematik Rechnung und können die Wechselwirkung der Elektronen untereinander besser berücksichtigen (CI, configuration interaction; MP2, MP4, usw., Møller-Plesset-Störungstheorie). Die so erhaltenen Atomorbitale werden für weitere Rechnungen durch mathematische Funktionen (Basissätze) ausgedrückt. Die heutzutage gebräuchlichsten Basissätze sind split-valence Basissätze und werden durch Gaussfunktionen beschrieben wie beispielsweise 6-31G<sup>54</sup>. In dieser Arbeit wurde meist der 6-31G\*-Basissatz<sup>55</sup> verwendet, in dem die Rumpforbitale der Atome durch sechs Gaussfunktionen und die Valenzorbitale durch einen 3/1-Split von Gaussfunktionen angenä-

hert sind. Zusätzlich beinhaltet dieser Basissatz noch d-Orbitale (Polarisationsfunktionen). Eine korrekte Berechnung der zweifach negativ geladenen Diphosphate schließt auch einen Satz von diffusen Funktionen (6-31+G\*) mit ein, wodurch hypervalente Verbindungen besser berechnet werden können. Auf Grund der zur Verfügung stehenden Rechenkapazitäten konnte dieser Basissatz allerdings nur teilweise verwendet werden.

Zur Berechnung von Wellenfunktionen eines Moleküls aus den Atomorbitalen werden nach der MO-LCAO-Theorie (molecular orbitals-linear combination of atomic orbitals) die Basisätze der Atome linearkombiniert. Linearkombination bedeutet hier eine Addition der einzelnen Wellenfunktionen der Atome mit geeigneten Koeffizienten unter Berücksichtigung des Pauli-Prinzips, welches besagt, dass jedes Orbital (Molekül- oder Atomorbital) mit zwei Elektronen besetzt sein kann, diese jedoch einen unterschiedlichen Spin besitzen müssen (antisymmetrische Wellenfunktionen).

Die Linearkombination der Atomorbitale nach der MO-LCAO-Theorie ergibt schließlich dieselbe Anzahl von Molekülorbitalen. Es müssen noch geeignete Koeffizienten für die Wellenfunktionen gefunden werden. Hierzu bedient man sich des Variationstheorems, welches postuliert, dass die Wellenfunktion  $\Psi$ , die zur geringsten Energie führt, den Grundzustand darstellt. Die Koeffizienten werden so angepasst, dass die ersten Ableitungen der Wellenfunktionen Null werden. Bei der Suche der Nullstellen treten viele Integrale auf. Sie werden in Coulomb-, Austausch- und Überlappungsintegrale unterteilt. In der Behandlung dieser Integrale liegt der Unterschied zwischen ab initio und semiempirischen Methoden (vgl. Kapitel 3.3.2). Während ab initio Methoden diese Integrale berechnen, werden sie in semiempirischen Methoden nur teilweise rechnerisch gelöst, andernfalls experimentelle Daten bzw. zuvor berechnete Parameter zur Lösung dieser Integrale verwendet oder teilweise gar nicht berücksichtigt. Wie bei den Atomorbitalen schwerer Elemente tritt bei Molekülorbitalen ebenfalls das Problem der Wechselwirkung der Elektronen untereinander auf. Auch in der MO-LCAO Theorie bedient man sich des Hartree-Fock-Ansatzes (HF), der CI- oder Møller-Plesset-Methode zur Berechnung der Wechselwirkung der Elektronen untereinander.

#### 3.3.2. Semiempirische Rechnungen

Berechnungen mit ab initio Methoden können mittlerweile sehr genaue Aussagen über Bildungsenthalpien, Ionisationspotentiale, Dipolmomente, chemische Verschiebungen in NMR-Spektren und Geometrien von Molekülen wiedergeben. Auf Grund der Komplexität dieser Rechnung besitzen sie jedoch den Nachteil, dass sie sogar heutzutage bei hohen Rechenleistungen auf vergleichsweise kleine Systeme beschränkt sind. In der historischen Entwicklung waren ohnehin aufwendige ab initio Rechnungen zunächst nicht praktikabel. Somit wurde nach Lösungen gesucht, dennoch Zustandsenergien, Bildungsenthalpien, Dipolmomente, etc. von chemischen Verbindungen vorhersagen zu können. Hieraus resultierte der Ansatz von semiempirischen Rechnungen, die auch heute noch bei größeren Systemen oder komplexeren Fragestellungen ihre Anwendung finden.

Wie unter Kapitel 3.3.1 bereits erwähnt, basieren die semiempirischen Rechnungen ebenso wie ab initio Methoden auf der Schrödinger-Gleichung. Beim Lösen dieser Gleichung für Moleküle nach dem MO-LCAO Modell treten eine Vielzahl von Integralen auf. Semiempirische Methoden unterscheiden sich in der Behandlung dieser Integrale. Während sich zu Beginn der Entwicklung die Molekülorbital-Theorie von Hückel auf die Berechnung des  $\pi$ -Systems von aromatischen Verbindungen konzentrierte und die Integrale der  $\sigma$ -Bindungen einfach auf Null setzte, werden in der CNDO-Methode<sup>56</sup> (complete neglect of differential overlap) nur die Coulombintegrale gelöst. Die auch heute noch verbreitete MNDO-Methode<sup>57</sup> (modified neglect of diatomic overlap) verbesserte den CNDO-Ansatz. Überlappungsintegrale werden jedoch auch weiterhin bei keiner semiempirischen Methode berücksichtigt. Die heute gängigsten Methoden sind AM1<sup>58</sup> (Austin Model 1) und PM3<sup>59</sup> (Parametric Model 3). Sie verwenden einen minimalen Basissatz von einem s- und drei p-Orbitalen pro Atom. Die bei der Berechnung der Wellenfunktion auftretenden Integrale werden dabei teilweise durch Parametersätze gelöst, die aus empirischen Daten gewonnen wurden (AM1) oder rein mathematischer Natur sind (PM3). Letztere schien zur Berechnung des Diphosphats am besten geeignet, da sie eine höhere Genauigkeit bei hypervalenten Verbindungen und  $\pi$ -Systemen besitzt als AM1 oder MNDO. Jedoch treten unter anderem Fehler in der Berechnung von Fünfringen und der amidischen Bindungen auf. Auch Nitro- und phosphorhaltige Verbindungen sind problematisch. Ihre Aussagen sind also kritisch zu betrachten und können in ihrer Qualität nicht an ab initio Methoden heranreichen. Auch Kraftfeldmethoden sind in vielen Fällen deutlich besser geeignet.



### 3.3.3. RESP-Partialladungen

Das Konzept von Partialladungen an Atomen ist hilfreich für die Beschreibung von Reaktivitäten und physikalischen Eigenschaften. Auch molekülmechanische und -dynamische Rechnungen benötigen Partialladungen. Die Exaktheit, mit der solche Simulationen physikalische Eigenschaften berechnen, ist stark von der Qualität dieser Ladungen abhängig. Auf Grund der Natur der Dichteverteilung der Elektronen am Kern existieren leider keine "wahren" Ladungen, so dass Atomladungen nach gegebenen Erfordernissen konstruiert werden müssen. Das führt zu einer Reihe von verschiedenen Modellen. Für molekülmechanische und -dynamische Rechnungen haben sich Ladungen etabliert, die ab initio auf dem 6-31G\*-Niveau berechnet werden. Aus den Wellenfunktionen wird das Elektrostatische Potential (ESP) für eine große Anzahl an Netzpunkten, die um das Molekül angeordnet sind, nach der Methode von Singh und Kollman<sup>60</sup> kalkuliert. Diese Methode reproduziert das quantenmechanische Multipolmoment recht gut und somit intermolekulare Wechselwirkungen. Damit sind ESP-Ladungen natürlich basissatzabhängig, jedoch längst nicht so stark wie die Mulliken Populationsanalyse.

Der 6-31G\*-Basissatz überbewertet die Polarität und somit auch die Dipolmomente der Moleküle. In dem hier verwendeten RESP-Modell<sup>61</sup> (restraint electrostatic potential) werden aus diesem Grund den quantenmechanischen ESP-Ladungen Randbedingungen in Form einer hyperbolischen Funktion speziell für die weniger polaren Molekülteile auferlegt. Die polaren Gruppen bleiben weitgehend unbeeinflusst. Dieses Modell führt zu Ladungen, die die experimentelle freie Lösungsenthalpie und intermolekulare Wechselwirkungen gut wiedergeben. Für molekülmechanische Berechnungen müssen zudem notwendige Symmetriefunktionen eingeführt werden, die beispielsweise die Ladungen von Wasserstoffatomen an frei drehbaren Methylgruppen mitteln. Die Ladungen können von einer Konformation evaluiert werden oder Mittelwerte von mehreren Konformationen darstellen.

### 3.3.4. Moleküldynamische (MD) Simulationen

Bei dem Ziel, das Verhalten von Molekülen in Lösung mit theoretischen Modellen zu beschreiben oder sogar vorherzusagen, stellen sich prinzipiell zwei Probleme. Erstens wird ein Modell benötigt, welches die Energie des Systems in Abhängigkeit von seinen Freiheitsgraden exakt beschreibt. Zweitens muss eine Simulation den Konformationsraum eines Systems

### 3. Methoden

---

vollständig absuchen und die Mikrozustände richtig gewichten, um makroskopische Eigenschaften zu evaluieren. Für dieses Absuchen des Konformationsraums haben sich zwei verschiedenen Algorithmen durchgesetzt. Der MMC-Algorithmus (Metropolis Monte Carlo) erzeugt ein Ensemble von Gleichgewichtszuständen nach der Boltzmannstatistik. Er ist in der Lage, große Änderungen in der Topologie des Moleküls schnell zu generieren, hat aber keine zeitliche Korrelation.

In dieser Arbeit wird der Konformationsraum der Moleküle mit dem MD-Algorithmus<sup>62</sup> (Moleküldynamik) durchsucht. Durch Integration der Newtonschen Bewegungsgleichung aller Atome des Systems generiert er ein Ensemble von Mikrozuständen, welches das Verhalten eines Moleküls in Lösung vollständig reflektiert. Das Prinzip ist folgendes:

Auf jedes einzelne Atom mit der Masse  $m_i$  des zu betrachtenden Moleküls mit einer definierten Startkonformation wirkt eine Kraft ( $F_i$ ), die von einer Startgeschwindigkeit und somit der kinetischen Energie des Gesamtsystems abhängig ist und zunächst frei gewählt werden kann. Durch diese Kraft werden die Atome im Molekül beschleunigt:

$$F_i = -\vec{\nabla}_i E = m_i \frac{d^2 \vec{x}_i}{dt^2} \quad \text{Gleichung 3-6}$$

mit der Masse  $m_i$  des Atoms  $i$  und dem Gradienten  $\vec{\nabla}_i$  bezüglich des Ortsvektors  $\vec{x}_i$ . Aus der resultierenden Geschwindigkeit der Atome  $v_i(t)$  können die neuen Positionen der Atome  $\vec{x}_i(t + dt)$  bei Kenntnis der alten Position berechnet werden  $\vec{x}_i(t)$ :

$$\vec{x}_i(t + dt) = \int v_i(t^*) dt - \vec{x}_i(t) \quad \text{Gleichung 3-7}$$

$t^*$  stellt das zeitliche Mittel zwischen  $t$  und  $t+dt$  dar. Die neue Geschwindigkeit  $\vec{v}_i(t + dt)$  wird aus der alten Geschwindigkeit und der Beschleunigung  $\vec{a}_i$  erhalten:

$$\vec{v}_i(t + dt) = \vec{v}_i(t) + \int \vec{a}_i dt \quad \text{Gleichung 3-8}$$

Die Beschleunigung ist nach Gleichung 3-6 ein Gradient der Energie, die durch ab initio, semiempirischen oder Kraftfeldmethoden berechnet wird. Der neue Ort wird erneut nach Gleichung 3-7 ermittelt und daraus wieder die neue Geschwindigkeit nach Gleichung 3-8 erhalten. Der MD-Algorithmus bewegt sich also immer zwischen Gleichung 3-7 und

Gleichung 3-8 hin und her. Die kinetische Energie und damit die Temperatur des Systems resultiert aus den Geschwindigkeiten der Atome. Mit Hilfe des Berendsen Algorithmus<sup>62</sup> wird die Geschwindigkeit in definierten Zeitintervallen angepasst, um die Temperatur konstant zu halten. Im Gegensatz zu MMC-Rechnungen sind MD-Simulationen streng deterministisch. Bei gegebener Geometrie und Anfangsgeschwindigkeit führen sie stets zum gleichen Ergebnis. Es resultiert ein Ensemble von Mikrozuständen, das die thermodynamischen Eigenschaften des Systems vollständig beschreiben kann. Die freie Enthalpie wird dadurch berechenbar:

$$\Delta G = -RT \ln K$$

**Gleichung 3-9**

### 3.3.5. Das AMBER-Kraftfeld

Für größere Systeme und komplexere Fragestellungen wie solvatisierte Proteine oder das Verhalten von flexiblen Molekülen in Lösung ist es unumgänglich, ein Modell zu entwickeln, welches die Zustände eines Systems schnell und dabei möglichst genau beschreibt. Da der Aufwand quantenmechanischer Rechnungen in der dritten Potenz mit der Anzahl von Atomen steigt, müssen für eine akzeptable Rechengeschwindigkeit viele Näherungen und Vereinfachungen eingeführt werden, wobei die gewünschten Eigenschaften trotzdem recht exakt beschrieben werden sollten. Im Bereich der Organischen Chemie wurde ein Modell entwickelt, das Moleküle als ein System von Massepunkten in einem Potenzialfeld beschreibt. In diesem Modell unterliegen die Atome den Gesetzen der klassischen Mechanik. Das Potenzialfeld wird als Kraftfeld bezeichnet. Das am meisten verbreitete Kraftfeld MM2<sup>63</sup> wurde bereits in den siebziger Jahren entwickelt und später durch MM3<sup>64</sup> verbessert. Die Idee, die sich hinter einem Kraftfeld verbirgt, ist die Möglichkeit der Separation in einem Molekül. Dabei wird angenommen, ein Molekül sei aus Einzelteilen aufgebaut, die sich stets in einer bestimmten Art und Weise verhalten bzw. immer die gleiche Wirkung ausüben. Unter dieser Annahme können diese Einzelteile mit bestimmten Parametern beschrieben werden, die auch dann gleich bleiben, wenn die Teile anders aneinander gesetzt werden. Diese Parameter sind z.B. Gleichgewichtsbindungsängen, Torsionspotenziale für bestimmte Diederwinkel, van-der-Waals-Radien, Partialladungen etc.. Sie wurden früher aus experimentellen Daten, heute vermehrt aus quantenmechanischen Rechnungen gewonnen. Dabei

### 3. Methoden

bleiben die Parameter meist auf die Molekülsorte beschränkt, für die sie entwickelt wurden. Für neuartige Probleme werden wieder neue Parameter benötigt.

Der erste Schritt bei der Berechnung von Molekülen mit molekülmechanischen oder -dynamischen Methoden muss also zunächst die Suche nach dem passenden Kraftfeld beinhalten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde nach einem Kraftfeld gesucht, das in der Lage ist, Zuckernucleotide, Nucleoside und ein Enzym zu berechnen.

Kollman *et al.* entwickelten 1984 ein Kraftfeld, das später AMBER91<sup>65</sup> genannt wurde. Es basiert auf MM2<sup>63</sup> und einem Kraftfeld speziell für Biopolymere.<sup>66</sup> Die MM2-Kraftfeldterme wurden stark vereinfacht, die Parameter für Furanosen optimiert und neue für Phosphate, Pyridine, Pyrimidine und alle natürlichen Aminosäuren hinzugefügt. Somit ist es speziell auf die Berechnung von Nucleotiden, Peptiden und Proteinen ausgelegt. In der neueren Version AMBER94<sup>67</sup> werden die Ladungen neu behandelt (RESP) und die Wasserstoffbrückenterme entfallen (vgl. Gleichung 3-10). AMBER94 behandelt Lösungsmittelmoleküle explizit. Deshalb müssen Simulationen in der Gasphasen oder mit implizitem Lösungsmittel weiterhin mit AMBER91 durchgeführt werden. Mit einem erweiterten Parametersatz für AMBER91 ist es inzwischen möglich auch Saccharide zu berechnen.<sup>68,69</sup> Insofern scheint AMBER für das Problem der Berechnung von Nucleosiden und der GalT gut geeignet zu sein.

Auch für das Diphosphat wurden Parameter für das AMBER91-Kraftfeld entwickelt.<sup>70</sup> Da diese jedoch auf semiempirischen Rechnungen beruhen, die bei phosphorylierten Verbindungen problematisch sind, wurden sie nach einem Test nicht weiter verwendet (vgl. Kapitel 4). Die mathematische Beschreibung für das AMBER-Kraftfeld lautet:

$$\begin{aligned} V = & \sum_{\text{Bindung}} K_r (r - r_0)^2 + \sum_{\text{Winkel}} K_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{\text{Torsion}} \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\phi - \gamma)] + \\ & \frac{1}{VDW_s} \sum_{j=1}^{\text{Atome}} \sum_{i>j}^{\text{Atome}} \epsilon_{ij}^* \left[ \left( \frac{R_{ij}^*}{r_{ij}} \right)^{12} - \left( \frac{R_{ij}^*}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \sum_{j=1}^{\text{H-Brücken}} \sum_{i>j}^{\text{H-Brücken}} \left( \frac{C_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{D_{ij}}{r_{ij}^{10}} \right) + \quad \text{Gleichung 3-10} \\ & \frac{1}{EEL_s} \sum_{i=1}^{\text{Atome}} \sum_{i>j}^{\text{Atome}} \frac{q_i q_j}{\epsilon r_{ij}} + \sum_{\text{Randbedineunen}} K(r - r_0)^2 \end{aligned}$$

mit

|                   |                                                                                              |
|-------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|
| $K_r$             | : Kraftkonstante der jeweiligen Bindung                                                      |
| $r_0$             | : Gleichgewichtsabstand                                                                      |
| $K_\theta$        | : Kraftkonstante des Bindungswinkels                                                         |
| $\theta_0$        | : Gleichgewichtsbindungswinkel                                                               |
| $V_n$             | : $V$ : Torsionspotenzial, $n$ : Anzahl der Torsionsmaxima                                   |
| $\gamma$          | : erstes Maximum des Torsionswinkels                                                         |
| $VDW_S$           | : Skalierfaktor für die van-der-Waals-Wechselwirkungen                                       |
| $\epsilon_{ij}^*$ | : Van-der-Waals-Parameter                                                                    |
| $R_{ij}^*$        | : Van-der-Waals-Radius                                                                       |
| $r_{ij}$          | : Abstand zwischen Atom $i$ und Atom $j$                                                     |
| $C_{ij}$          | : Koeffizient der abstoßenden Wechselwirkungen zwischen Wasserstoff<br>und Protonen-Akzeptor |
| $D_{ij}$          | : Koeffizient der anziehenden Wechselwirkungen                                               |
| $EEL_S$           | : Skalierfaktor für die Elektrostatischen Wechselwirkungen                                   |
| $q_i$             | : Ladung des Atoms $i$                                                                       |
| $\epsilon$        | : Dielektrizitätskonstante                                                                   |

Der Coulomb-Term der Kraftfeldgleichung macht oft die größten Schwierigkeiten, da die Wechselwirkungen proportional zu  $r^{-1}$  sind und somit sehr viele Atompaare berücksichtigt werden müssen. In der Praxis wird häufig ein Abbruchradius festgelegt, ab dem diese Wechselwirkungen nicht mehr berechnet werden. Vor der Entwicklung von AMBER94 wurde das Lösungsmittel implizit behandelt. Das bedeutet, dass in AMBER91 keine Lösungsmittelmoleküle formuliert werden,  $\epsilon$  bei Gasphasensimulationen jedoch so angepasst wird, dass das Dielektrikum dem Lösungsmittel angenähert wird. Dabei wurden Werte zwischen  $\epsilon = 4 - 80 \text{ C}^2/\text{Jm}^{71}$  verwendet. Auch eine distanzabhängige Dielektrizitätskonstante führte in vielen Fällen zu guten Resultaten und wurde in dieser Arbeit ebenfalls verwendet.

Mit Hilfe des letzten Terms können Randbedingungen im Kraftfeld definiert werden, die häufig durch eine quadratische Funktion ausgedrückt werden. In AMBER lässt sich auch eine hyperbolische Funktion definieren, die in Kapitel 3.3.6 noch näher beschrieben werden wird.

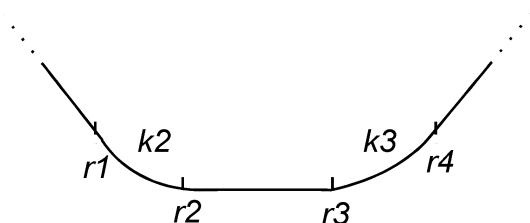
Die Beschreibung der Wechselwirkungen zwischen Lösungsmittel und gelöstem Stoff sind für eine korrekte Wiedergabe der Energie von wesentlicher Bedeutung. Jedoch werden Simulationen mit expliziten Lösungsmittelmolekülen sehr rechenintensiv, so dass sie für längere Simulationen ungeeignet sind. In dieser Arbeit wurden alle MD-Simulationen mit AMBER91 bzw. mit PM3/AMBER91 durchgeführt. Die Geometrie des Enzym-Substrat-

### 3. Methoden

Komplexes hingegen wurde in einem Kubus mit Wassermolekülen (TIP3) mit AMBER94/99 optimiert. Jedoch stellt auch die Berechnung eines isolierten Moleküls oder Enzyms in einer Lösungsumgebung eine Vereinfachung dar, da in der Realität eine Vielzahl von gelösten Substanzen vorliegen, die alle untereinander wechselwirken können. Den größten Einfluss haben dabei nichtbindende elektrostatische Wechselwirkungen. Die PME-Methode (Particle Mesh Ewald) berechnet die vollständigen elektrostatischen Wechselwirkungen der Einheitszellen untereinander, so dass ein makroskopisches Gesamtgitter aus einzelnen Würfeln simuliert wird. In dieser Arbeit wurde diese Methode bei Geometrieoptimierungen des Enzyms mit explizitem Lösungsmittel angewandt.

#### 3.3.6. Zeitlich gemittelte Randbedingungen

Eine der Stärken der NMR-Spektroskopie ist die Möglichkeit, dynamische Prozesse innerhalb flexibler Moleküle zu beschreiben.<sup>72</sup> Jedoch wurden mit den Ansätzen von DG-Methoden (Distance Geometry) und MD-Rechnungen mit Randbedingungen Techniken entwickelt, die eine einzige Struktur erzeugen sollen, die sämtliche experimentelle Daten korrekt beschreibt. In MD-Rechnungen mit Randbedingungen werden dem Molekül Strafterme in Form von hyperbolischen Funktionen auferlegt. Beispielsweise werden aus NOE-Daten Abstände ermittelt, die das Molekül nicht mehr verlassen darf. Eine realistischere Funktion sollte dem Molekül jedoch erlauben, zwischen zwei oder mehreren Zuständen hin und her zu springen und dabei lediglich einen zeitlich gemittelten Zustand nicht verlassen. Diese zeitlich gemittelten Randbedingungen wurden zunächst für Protonendistanzen entwickelt<sup>73</sup> und später auf zeitlich gemittelte Torsionswinkel bzw. Kopplungskonstanten übertragen.<sup>74</sup> Die potenzielle Energie der Randbedingung wird in AMBER durch einen Term ausgedrückt, der eine ebene Grundlinie hat, ab definierten Punkten  $r2$  und  $r3$  parabolisch und ab  $r1$  und  $r4$  linear verläuft. Die Kraftkonstanten  $k2$  und  $k3$  beschreiben die parabolische Funktion:



**Abbildung 3-3:** Form des Energieterms von Randbedingungen im AMBER-Kraftfeld.

$$\bar{r} = \left( \frac{1}{\tau} \int_0^t e^{-t'/\tau} r(t-t')^{-Exponent} dt' \right)^{-1/Exponent}$$

**Gleichung 3-11**

mit

|            |                                                                                                                                      |
|------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| $\bar{r}$  | : zeitlich gemittelte interne Koordinate                                                                                             |
| $t$        | : momentane Zeit                                                                                                                     |
| $\tau$     | : Konstante für den Exponentialabfall                                                                                                |
| $r(t')$    | : Wert der internen Koordinate zur Zeit $t'$                                                                                         |
| $Exponent$ | : 3 bei NOE-Distanzen für große Moleküle<br>6 bei NOE-Distanzen für kleine Moleküle<br>-1 für Torsionswinkel und Kopplungskonstanten |

Ein normales statistisches Mittel hat sich nicht durchgesetzt, da bei längerer Simulationsdauer die Randbedingungen immer weniger sensitiv für den momentanen Zustand des Moleküls werden. Durch die Exponentialfunktion in Gleichung 3-11 werden diejenigen Zustände stärker gewichtet, die kürzere Zeit zurückliegen. Problematisch bei dieser Formulierung sind Protonendistanzen, da sie in dritter bzw. sechster Potenz in die Gleichung einfließen und dadurch große Instabilitäten in den MD-Rechnungen verursachen. Aus diesem Grund werden die Kräfte nicht durch Ableitung der potenziellen Energie erhalten, sondern durch eine pseudo-Kraft Formulierung<sup>73,75</sup>.

Aus vicinalen NMR-Kopplungskonstanten lassen sich meist keine direkten Randbedingungen formulieren, da sie häufig keinen eindeutigen Aufschluss über einen Torsionswinkel geben. Diese dennoch sehr wertvolle Information über die Orientierung eines bestimmten Torsionswinkels kann jedoch über eine Randbedingung in die Kraftfeldrechnung einfließen, die durch eine allgemeine Karplus-Beziehung definiert ist:

$$J = A \cos^2 \phi + B \cos \phi + C$$

**Gleichung 3-12**

Für viele Systeme existieren solche Karplus-Beziehungen (vgl. Kapitel 3.3.8). Die meisten entsprechen der formalen Erscheinung von Gleichung 3-12. Die Koeffizienten A, B und C sind dem betreffenden System jeweils angepasst. Speziell für  $^3J_{H,H}$ -Kopplungen hat sich jedoch eine etwas komplexere Gleichung<sup>76</sup> durchgesetzt<sup>77</sup>, die die Art und Orientierung der Substituenten berücksichtigt. Diese Gleichung lässt sich teilweise nur unter Hinnahme von Fehlern in die allgemeine Form transformieren.

#### 3.3.7. Quantenmechanische/molekülmechanische Rechnungen (QM/MM)

Bei der Modellierung von unterschiedlichen Systemen sind immer wieder Vor- und Nachteile der Methoden zu diskutieren, die für die Berechnung der Energien verwendet werden. Während quantenmechanische ab initio und Dichtefunktionalmethoden (DFT) zurzeit die genauesten Aussagen treffen, liefern semiempirische Methoden häufig nur für spezielle Probleme gute Resultate. Jedoch ist der Rechenaufwand in den ersten Fällen beträchtlich. Molekülmechanische Rechnungen besitzen zwar eine hohe Rechengeschwindigkeit, reichen in ihrer Genauigkeit nur selten an ab initio Rechnungen heran. Zudem besitzen sie den Nachteil, elektronisch angeregte Zustände und Bindungsbrüche nicht beschreiben zu können. Berechnungen von Reaktionen bleiben somit auf quantenmechanische Methoden beschränkt. In einem Ansatz, der bereits in den siebziger Jahren entwickelt wurde und damals seiner Zeit voraus war, wurde versucht, quantenmechanische und molekülmechanische Methoden (QM/MM) miteinander so zu kombinieren, dass sich ihre Nachteile weitgehend eliminieren.<sup>78</sup> Das Molekül wird mit molekülmechanischen Methoden beschrieben, besonders interessante Teile hingegen werden quantenmechanisch behandelt, wie beispielsweise das reaktive Zentrum eines Enzyms oder Molekülteile, an denen Bindungsbrüche auftreten. In neuerer Zeit wurde dieser Ansatz wieder aufgegriffen und molekülmechanische Rechnungen mit semiempirischen<sup>79</sup>, HF ab initio<sup>80</sup> und Dichtefunktionalmethoden<sup>81</sup> kombiniert. Dabei wurden nicht nur Energieminimierungen<sup>79a,80a</sup>, sondern auch MMC-<sup>79b</sup> und MD-<sup>80b,81a</sup> Simulationen durchgeführt.

Der QM/MM-Ansatz unterteilt die Energie  $E_{eff}$  eines Systems in drei Komponenten, einen rein quantenmechanischen Teil  $E_{QM}$ , einen vollständig molekülmechanischen Teil  $E_{MM}$  und einen Mischterm  $E_{QM/MM}$ :

$$E_{eff} = E_{QM} + E_{MM} + E_{QM/MM} \quad \text{Gleichung 3-13}$$

Bei der Suche nach der Wellenfunktion entsprechend der Gleichung 3-5 kann der molekülmechanische Teil vom Integral entfernt werden:

$$E_{eff} = \left\langle \Psi \left| \hat{H}_{QM} + \hat{H}_{QM/MM} \right| \Psi \right\rangle + E_{MM} \quad \text{Gleichung 3-14}$$



Den Schlüsselterm stellt  $\hat{H}_{QM/MM}$  dar. Die potenzielle Energie des Hamiltonoperators ist ein Ausdruck für die Wechselwirkung zwischen molekülmechanischem Atom und der Elektronenwolke des quantenmechanischen Atoms und wird durch einen Lennard-Jones Term beschrieben<sup>79a</sup>:

$$V_{QM/MM} = -\sum_{iM} \frac{q_M}{|r_{iM}|} + \sum_A \frac{q_M Z_A}{|R_{AM}|} + \sum_{AM} \left( \frac{A_{AM}}{R_{AM}^{12}} - \frac{B_{AM}}{R_{AM}^6} \right) \quad \text{Gleichung 3-15}$$

mit

- $q_M$  : Partialladung des molekülmechanischen Atoms M
- $r_{iM}$  : Abstand des quantenmechanischen Elektrons zum molekülmechanischen Atom M
- $Z_A$  : Kernladung des quantenmechanischen Atoms A
- $R_{AM}$  : Abstand zwischen dem quantenmechanischen Atom A und dem molekülmechanischen Atom M
- $A_{AM}, B_{AM}$  : Lennard-Jones-Parameter für das quantenmechanische Atom A, das mit dem molekülmechanischen Atom M wechselwirkt

Der erste Term der Gleichung 3-15 ist besonders entscheidend, da hierdurch die quantenmechanische Region von der molekülmechanischen beeinflusst wird. Er repräsentiert die Kern-Elektron-Wechselwirkung und wird explizit im quantenmechanischen Hamilton-Operator eingearbeitet. Dadurch reagiert die elektronische Struktur der quantenmechanischen Region auf die molekülmechanische Umgebung. Die letzten beiden Summenterme werden erst addiert, nachdem die Wellenfunktion durch die SCF-Prozedur festgelegt ist. Damit beeinflussen sie zwar nicht direkt die Wellenfunktion, jedoch die Geometrie des Gesamtsystems und damit die elektronische Struktur in nachfolgenden SCF-Zyklen.

Gekoppelte quantenmechanische/molekülmechanische Rechnungen sind hinreichend schnell, um auch komplexere Fragestellungen zu beantworten. So kann das dynamische Verhalten von Molekülen in Lösung simuliert werden, wobei einzelne Molekülteile quantenmechanisch behandelt werden. Wie unter Kapitel 3.3.4 bereits erwähnt wurde, benötigen MD-Simulationen Kontrollfunktionen, die sowohl die Temperatur als auch den Druck konstant halten. Während bei einfachen molekülmechanischen Rechnungen eine einfache Skalierfunktion<sup>62</sup> genügt, wurde in neuerer Zeit die Methode der Nosé-Hoover-Kette<sup>82</sup> (NHC) entwickelt, die eine effizientere Kopplung an die gewünschte Temperatur ermöglicht. Der entscheidende Vorteil ist, dass bis zu drei Ketten von Thermostaten zur Verfügung stehen, an die das System gekoppelt ist. Sie ermöglichen z.B. die getrennte Behandlung von Lö-

### 3. Methoden

---

lungsmittel und gelöstem Stoff und umgehen somit Probleme von heißem Solvent und kaltem Lösungsmittel. Auch in QM/MM-Rechnungen wird sowohl die quantenmechanische als auch die molekülmechanische Region mit getrennten Ketten verknüpft. Prinzipiell berechnet diese Methode aus der potenziellen Energie  $V(r)$ , die das Kraftfeld liefert, aus den Impulsen der Teilchen  $p_i$  mit der Masse  $m_i$  und der Temperatur  $T$ , die jeweils an spezielle Ketten von Thermostaten mit der Masse  $Q_i$  gekoppelt sind, eine Gesamtenergie  $E$ . Diese Gesamtenergie wird während der MD-Simulation konstant gehalten:

$$E(p, r, p_\xi, \xi) = V(r) + \sum_{i=1}^N \frac{p_i^2}{2m_i} + \sum_{i=1}^M \frac{p_{\xi_i}^2}{2Q_i} + N_f kT\xi_1 + \sum_{i=1}^M kT\xi_i \quad \text{Gleichung 3-16}$$

mit

|                   |                                     |
|-------------------|-------------------------------------|
| $V(r)$            | : Potenzielle Energie               |
| $N$               | : Anzahl der Atome                  |
| $p$               | : Impuls                            |
| $m_i$             | : Masse des i-ten Atoms             |
| $M$               | : Anzahl der Thermostate            |
| $\xi$ und $p_\xi$ | : Thermostatvariable und ihr Impuls |
| $Q_i$             | : Masse des Thermostaten            |
| $N_f$             | : Anzahl der Freiheitsgrade         |
| $k$               | : Boltzmannkonstante                |

Dieses Prinzip lässt sich auf den Druck ausweiten, so dass Simulationen bei konstanter Temperatur oder bei konstantem Druck mit der NHC-Methode durchgeführt werden können. Der Berendsen MD-Algorithmus<sup>62</sup> (vgl. Kapitel 3.3.4) ist bei QM/MM-MD-Simulationen durch einen modifizierten Verlet-Algorithmus<sup>83</sup> ersetzt worden. Es hat sich gezeigt, dass dieser reversible Integrator die Simulationsgeschwindigkeit entscheidend erhöht.<sup>84</sup>

#### 3.3.8. Karplus-Beziehungen

Wie in Kapitel 3.2 bereits erwähnt, können die Kernspins skalar miteinander gekoppelt sein, wobei den vicinalen  $^3\text{J}$ -Kopplungen besondere Bedeutung für die Konformationsaufklärung zukommt. Denn die Stärke der Kopplung hängt neben der betrachteten Kernsorte und der elektronischen Umgebung wesentlich von ihrer Orientierung ab, die bei  $^3\text{J}$ -Kopplungen vor allem durch den Diederwinkel definiert ist. Bereits in den sechziger Jahren wurde ein mathematischer Zusammenhang zwischen vicinale  $^3\text{J}$ -Kopplungen und Torsionswinkel ent-

deckt<sup>85</sup> (siehe Gleichung 3-12), die als Karplus-Beziehung bezeichnet wird. Da es sich um eine Cosinusfunktion handelt, lässt sich aus der Größe der Kopplungskonstante jedoch nicht eindeutig ein Torsionswinkel bestimmen. Werden jedoch durch Rechenmodelle, seien sie quantenmechanischer oder molekülmechanischer Natur, Torsionswinkel erhalten, so können mit Hilfe von Karplus-Beziehungen  $^3J_{H,H}$ -<sup>76,86</sup>,  $^3J_{C,H}$ -<sup>87,88</sup>,  $^3J_{F,H}$ -<sup>89</sup>,  $^3J_{P,H}$ -<sup>90,91</sup> und  $^3J_{C,P}$ -<sup>90</sup> Kopplungskonstanten eindeutig berechnet werden.

### 3.3.9. NOE-Aufbaukurven

Neben Kopplungskonstanten sind NOE-Verstärkungen der zweite wichtige Parameter, der aus NMR-Experimenten zur Konformationsanalyse verwendet wird. Wie in Kapitel 3.2.2 erwähnt, lassen sich auf Grund der Spindiffusion aus NOE-Verstärkungen keine direkten Kernabstände bestimmen. Bei bekannten Kernabständen können jedoch NOE-Signale nach dem Relaxationsmatixverfahren<sup>92</sup> berechnet werden. Hierbei wird eine Matrix **A** berechnet, die alle Informationen eines NOESY-Spektrums beinhaltet. Sie wird in Abhängigkeit einer Kreuzrelaxationsmatrix **R** ausgedrückt:

$$\frac{d\mathbf{A}}{dt} = -\mathbf{R}[\mathbf{A} - \mathbf{1}] \quad \text{Gleichung 3-17}$$

Diese Gleichung wird formal gelöst durch:

$$\mathbf{A} = \exp[-\mathbf{R}\tau_m] \quad \text{Gleichung 3-18}$$

Dabei ist die Potenzreihe nach der Taylorschen Formel:

$$\exp[-\mathbf{R}\tau_m] = 1 - \mathbf{R}\tau_m + \frac{1}{2}\mathbf{R}^2\tau_m^2 - \frac{1}{6}\mathbf{R}^3\tau_m^3 \dots \quad \text{Gleichung 3-19}$$

mit

$$\mathbf{R} = \begin{bmatrix} \rho_1 & \sigma_{12} & \cdot & \cdot & \sigma_{1n} \\ \sigma_{21} & \rho_2 & \cdot & \cdot & \sigma_{2n} \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ \sigma_{n1} & \sigma_{n2} & \cdot & \cdot & \rho_n \end{bmatrix} \quad \text{Gleichung 3-20}$$

### 3. Methoden

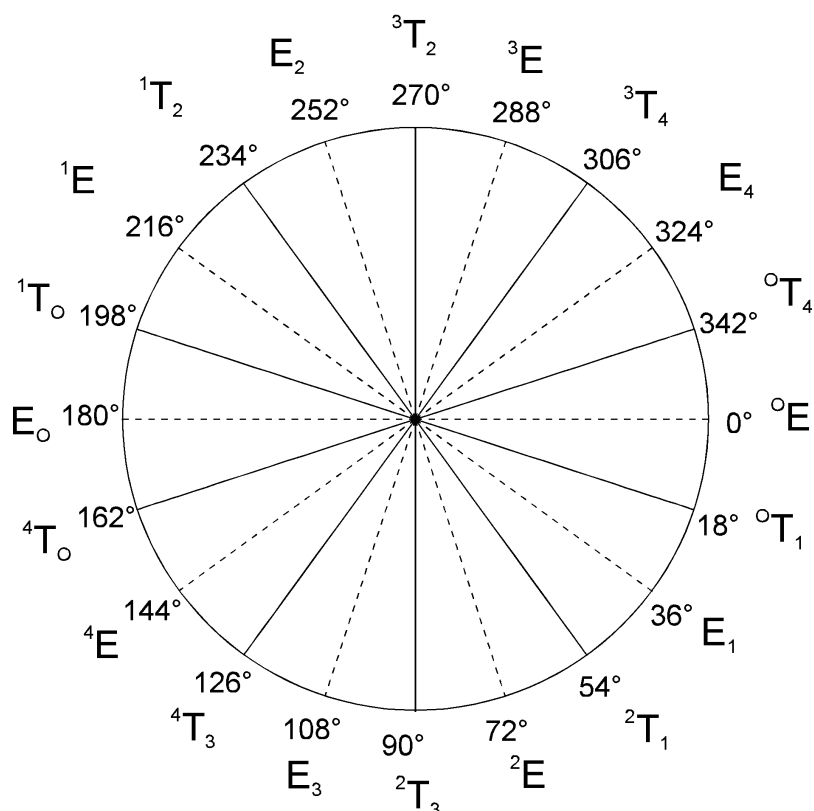
---

Anhand der Gleichung 3-19 wird klar, dass sich der NOE bei kurzen Mischzeiten, also kleinem  $\tau_m$ , auf die ersten beiden Terme der rechten Seite beschränkt und somit linear aufbaut.

Die Übergangswahrscheinlichkeiten, die zur Berechnung der Diagonal- und Nicht-Diagonalelemente der Relaxationsmatrix **R** verwendet werden, sind unter anderem von der Korrelationszeit  $\tau_c$  abhängig. Obwohl MD-Simulationen prinzipiell Aussagen über die Korrelationszeit treffen können, werden sie häufig entweder durch empirische Relaxationsmessungen bestimmt oder wie in dieser Arbeit durch Eichung an festen Protonendistanzen vorgenommen. Dabei wird mit Ausnahme von frei rotierbaren Methylgruppen eine isotrope Molekülbewegung vorausgesetzt und eine einheitliche Korrelationszeit angenommen – eine prinzipiell unnötige Einschränkung, die bei sehr flexiblen Molekülen zu falschen Ergebnissen führen kann.<sup>93</sup>

#### 3.4. Konformationsbeschreibung cyclischer Systeme

Torsionswinkel innerhalb cyclischer Systeme variieren naturgemäß nicht unabhängig voneinander. Vielmehr bewirkt die Änderung eines Torsionswinkels Abweichungen anderer Torsionswinkel. Folglich ist die Anzahl der Freiheitsgrade cyclischer Systeme um drei reduziert ist. Ein Konzept von Altona und Sundaralingam<sup>94</sup> wurde später von Cremer und Pople allgemeingültig für cyclische Systeme beliebiger Größe formuliert<sup>95</sup>, wodurch der Konformationsraum beispielsweise von Fünfringen mit Hilfe zweier Pseudorotationsparameter  $\phi$  und  $q$  beschrieben wird. In einem Fünfring können drei oder vier Atome in einer Ebene liegen und entsprechend zwei oder ein Atom aus der Ebene herausragen.  $q$  beschreibt die Stärke der Auslenkung. Bei Riboseringen von Nucleosiden ist  $q$  relativ konstant (Kapitel 5), während  $\phi$  stark variiert. Mit Hilfe von  $\phi$  werden die Atome des Rings definiert, die aus der Ebene ausgelenkt sind. Ribosen von Nucleosiden befinden sich häufig in einer C3'-*endo*-(<sup>3</sup>E,  $\phi = 288^\circ$  oder  $\phi = -72^\circ$ ) oder C2'-*endo*-Konformation (<sup>2</sup>E,  $\phi = 72^\circ$ ). Hierbei ist das Kohlenstoffatom C3' bzw. C2' oberhalb der Ebene lokalisiert, die von den restlichen vier Atomen aufgespannt wird (siehe auch Abbildung 5-3). Da Fünfringe in Lösungen recht flexibel und der Konformationsraum somit groß ist, werden sie auch in nördliche, südliche, westliche und östliche Konformationen unterteilt.



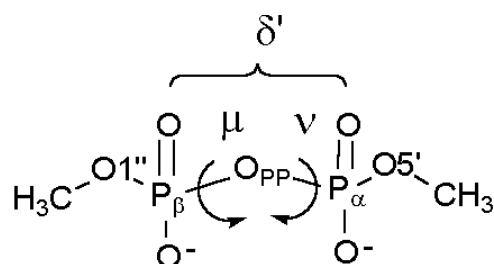
**Abbildung 3-4:** Beschreibung der Konformation von Fünfringen mit Hilfe des Cremer-Pople-Parameters  $\phi$ .

Zur Beschreibung der Geometrie von Sechsringen wird ein zusätzlicher Pseudorotationsparameter eingeführt, so dass die Konformation durch  $\phi$ ,  $\theta$  und  $Q$  beschrieben wird.  $\phi$  und  $\theta$  definieren die Richtung eines Vektors mit der Größe  $Q$ . Damit wird exakt eine Position innerhalb eines Globus beschrieben, auf dem verschiedene Konformationen angeordnet sind.  $\theta$  nimmt Werte zwischen  $0^\circ \leq \theta \leq 180^\circ$  an, definiert den Breitengrad und die Art der Konformation.  $\phi$  liegt in einem Bereich von  $0^\circ \leq \phi \leq 360^\circ$ , bestimmt den Längengrad und die Atome, die aus der Ebene ausgelenkt sind. An den Polen bei  $\theta = 0^\circ$  oder  $\theta = 180^\circ$  nimmt der Sechsring eine Sesselkonformation ein, am Äquator ( $\theta = 90^\circ$ ) liegen Boot- ( $\phi = 0^\circ, 60^\circ, 120^\circ, \dots$ ) oder Twistbootkonformationen vor ( $\phi = 30^\circ, 90^\circ, 150^\circ, \dots$ ). Bei  $\theta = 66.5^\circ$  und  $\theta = 113.5^\circ$  besitzt der Sechsring eine Halbsessel- ( $\phi = 0^\circ, 60^\circ, 120^\circ, \dots$ ) oder Halbbootkonformation ( $\phi = 30^\circ, 90^\circ, 150^\circ, \dots$ ).

### 4. Entwicklung neuer Kraftfeldparameter für das Pyrophosphat

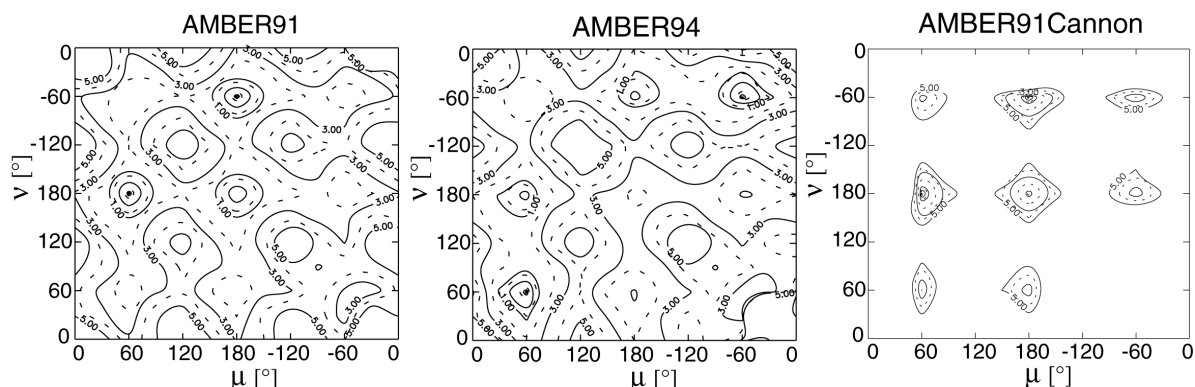
#### 4.1. Berechnungen mit existierenden AMBER-Kraftfeldern

Für die nachfolgenden Untersuchungen der dreidimensionalen Struktur pyrophosphathaltiger Verbindungen wurde zunächst das Dianion Diphosphorsäuredimethylester (DMDP) als einfache Modells substanz eingehender untersucht. Ähnlichkeiten mit den Zuckernucleotiden besitzt DMDP dahingehend, dass zwei Säurefunktionen verestert sind, und das Molekül zwei negative Ladungen trägt.



**Abbildung 4-1:** Schematische Abbildung von Dimethyldiphosphat (DMDP) mit Benennung wichtiger Diederwinkel.

Energiehyperflächenberechnungen von DMDP entlang beider  $O_{PP}$ -P-Bindungen mit dem gängigen AMBER91-<sup>65</sup>, AMBER94-<sup>67</sup> und dem erweiterten AMBER91Cannon-Kraftfeld<sup>70</sup> ausgehend von einer Startstruktur analog zur Kristallstruktur von UDP-Glc<sup>28</sup> (CEKLIZ, Tabelle 4-1) weisen vergleichsweise viele lokale Energieminima jeweils bei gestaffelten Konformationen der Phosphatgruppen zum Brückensauerstoff  $O_{PP}$  auf (Abbildung 4-2). Die Phosphatgruppen nehmen dabei zueinander verdeckte Konformationen ein. Die Differenzen zwischen den relativen Energien der lokalen Minima und des globalen Minimums sind klein, so dass alle in Lösung vorliegen müssten. Auch MD-Simulationen mit AMBER91<sup>65</sup>, AMBER94<sup>67</sup>, die hier nicht genauer dargestellt werden, zeigen eine hohe Flexibilität des Moleküls.



**Abbildung 4-2:** Energiehyperflächenberechnungen für Dimethyldiphosphat (DMDP) mit AMBER91<sup>65</sup> (links), AMBER95<sup>67</sup> (Mitte) und AMBER91Cannon<sup>70</sup> (rechts). Nur Energiedifferenzen kleiner gleich 5 kcal/mol wurden dargestellt.

## 4.2. Kristallstrukturen

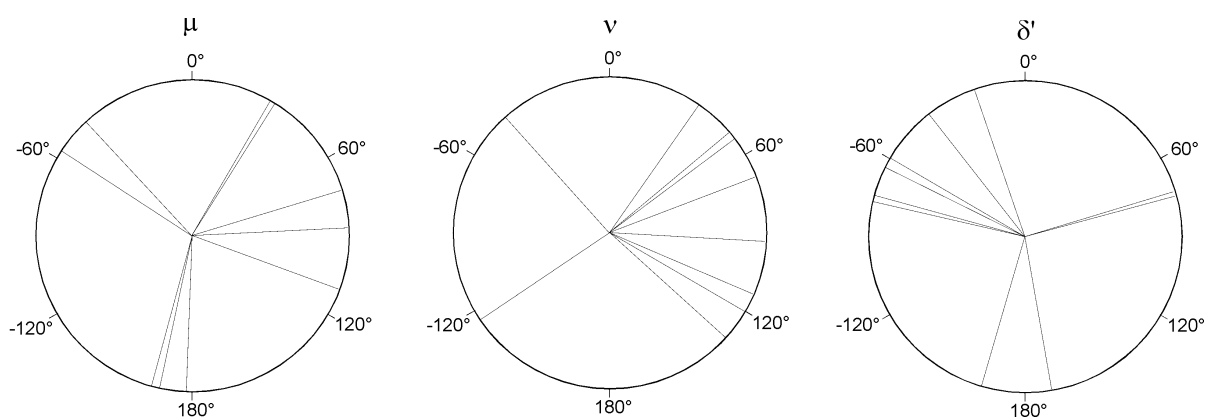
Kristallstrukturen unterschiedlicher Derivate einer interessierenden Verbindung geben Hinweise auf ihr konformatives Verhalten und ihre Flexibilität in Lösung.<sup>100</sup> Es existieren einige Kristallstrukturen pyrophosphathaltiger Substanzen (Tabelle 4-1).<sup>96</sup> Sie zeigen keine ausgeprägte Vorzugsorientierung der Torsionswinkel  $\mu$  und  $\nu$  (Abbildung 4-3). Die beiden Phosphatgruppen nehmen aber, mit Ausnahme von DAYWEF (Tabelle 4-1), in etwa die gestaffelte Konformationen in der  $+sc$ -,  $-sc$ - und  $ap$ -Orientierung ein, so dass beide Torsionswinkel zu einem Diederwinkel zusammen gefasst wurden, der die Orientierung beider Phosphatgruppen zueinander beschreibt. Dieser Diederwinkel wird durch zwei Ebenen definiert, die durch die Atome O5', P $_{\alpha}$  und O $_{PP}$  bzw. O $_{PP}$ , P $_{\beta}$  und O1'' aufgespannt werden. Er wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit als  $\delta'$  bezeichnet (Abbildung 4-1). In den Kristallstrukturen werden vorwiegend Werte für  $\delta'$  von etwa  $-60^{\circ}$  bis  $-80^{\circ}$ ,  $60^{\circ}$  bis  $80^{\circ}$  und  $180^{\circ}$  gefunden (Tabelle 4-1, Abbildung 4-3).

Die Kristallstrukturdaten (Tabelle 4-1) zeigen einen stark aufgeweiteten Bindungswinkel am Brückensauerstoff O $_{PP}$ , der wesentlich höher als der tetraedrische Winkel eines  $sp^3$ -hybridisierten Atoms ist. Dies weist auf einen höheren  $p$ -Charakter der Sauerstoff-Phosphor-Bindung oder auf eine starke repulsive Wechselwirkung beider Phosphatgruppen hin. Daher wurde ein anderes konformatives Verhalten vermutet als die gestaffelten Orientierungen der Phosphatgruppen mit dem Sauerstoffatom O $_{PP}$ , die unter Verwendung der AMBER-Kraftfelder ermittelt wurden (Abbildung 4-2).

#### 4. Entwicklung neuer Kraftfeldparameter

**Tabelle 4-1:** Kristallstrukturdaten<sup>96</sup> einiger Pyrophosphatderivate.

| Name     | $\phi_{\text{POP}}$ [°] | $\mu$ [°] | $\nu$ [°] | $\delta'$ [°] |
|----------|-------------------------|-----------|-----------|---------------|
| CDPCHM   | 130.88                  | -124.3    | 87.4      | -38.0         |
| CEKLUZ   | 132.59                  | 93.5      | -164.9    | -74.6         |
| CYPCHO01 | 131.56                  | 113.6     | -168.5    | -59.7         |
| DAYWEF   | 129.25                  | 34.8      | -57.2     | -18.9         |
| MEOXPH01 | 132.54                  | 49.4      | 32.0      | 73.2          |
| MEOXPH20 | 131.79                  | 50.6      | 30.9      | 72.9          |
| MHPHOL   | 127.52                  | -42.3     | -43.3     | -78.0         |
| NACYTD   | 129.53                  | 120.3     | -178.0    | -63.6         |
| NADLIH10 | 133.14                  | 132.5     | 72.5      | -163.9        |
| NAPYPX10 | 134.27                  | 68.9      | 109.0     | 170.6         |



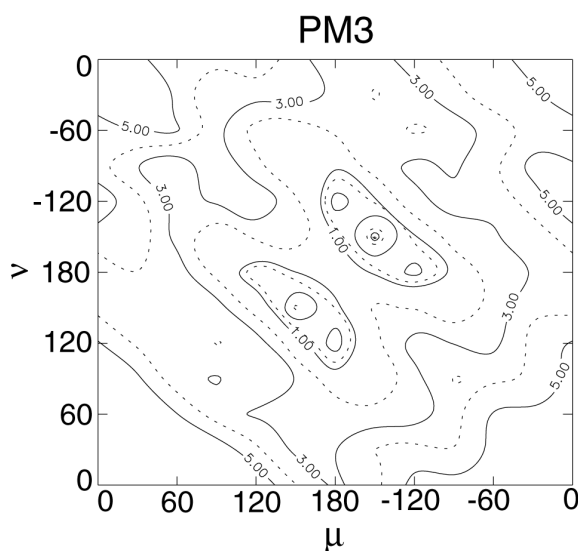
**Abbildung 4-3:** Verteilung der Diederwinkel  $\mu$ ,  $\nu$  und  $\delta'$  in den Kristallstrukturen einiger pyrophosphathaltiger Verbindungen.

Im Fall von geladenen Molekülen sind Rückschlüsse von Kristallstrukturen auf die Konformation in Lösung sicherlich problematisch, da Kationen im Festkörper häufig nahe den Anionen lokalisiert sind und somit einen sterischen Einfluss ausüben. In wässriger Lösung hingegen vermindert die Hydrathülle diesen Einfluss auf die Konformation. Aus chemischer Sicht erscheinen die gestaffelten Konformationen der beiden Phosphatgruppen, wie sie in den Kristallstrukturen gefunden werden, in jedem Falle sinnvoll. Da dieses jedoch im Widerspruch zu den bisherigen Kraftfeldparametern steht (Abbildung 4-2), sollen hier eingehendere Untersuchungen mit quantenmechanischen Methoden durchgeführt werden.



### 4.3. Quantenmechanische Untersuchung von Dimethyldiphosphat (DMDP)

Da ab initio Methoden zu aufwändig für die Durchmusterung des gesamten Konformationsraumes von DMDP sind, wurden zunächst Energiehyperflächenberechnungen mit semiempirischen Methoden unter Verwendung des PM3-Modells<sup>59</sup> durchgeführt. Ausgehend von einer Startgeometrie analog zur Kristallstruktur von UDP-Glc (CEKLIZ, Tabelle 4-1) wurden die Torsionswinkel  $\mu$  und  $\nu$  entlang der O<sub>PP</sub>-P-Bindungen beginnend bei 180° in einer Schrittweite von 30° inkrementiert und die restliche Geometrie optimiert. Der Bindungswinkel  $\phi_{POP}$  näherte sich dabei auf etwa 180°. Aufgrund der Kristallstrukturen (Tabelle 4-1) und Geometrieoptimierungen auf dem HF/6-31G\*-Niveau (s. u.) kann jedoch von einem Bindungswinkel zwischen 130° und 140° ausgegangen werden, so dass er in Analogie zu CEKLIZ in den nachfolgenden Rechnungen auf  $\phi_{POP} = 132.59^\circ$  festgelegt wurde. Mit dieser Festlegung wurden zwei energetische Minima bei  $\mu = 150^\circ$  und  $\nu = 150^\circ$  bzw.  $\mu = -150^\circ$  und  $\nu = -150^\circ$  berechnet (Abbildung 4-4). Die nachoptimierten Geometrien besaßen einen Dieckmankel  $\delta' = 68.7^\circ$  bzw.  $\delta' = -68.7^\circ$ . Die deutliche Symmetrie des Energiehyperflächendiagramms entlang der Diagonalen spricht für eine starke Korrelation der beiden Torsionswinkel  $\mu$  und  $\nu$ .



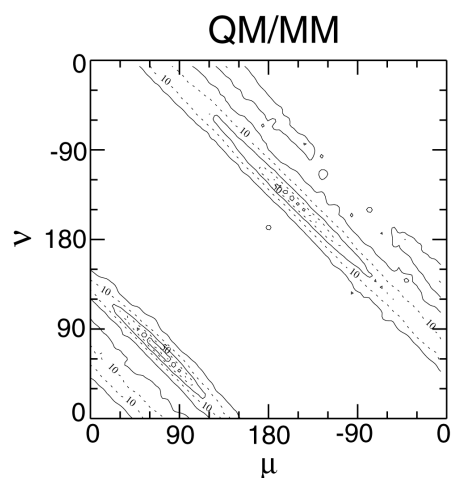
**Abbildung 4-4:** Energiehyperfläche von Dimethyldiphosphat (DMDP) mit variierenden Torsionswinkeln  $\mu$  und  $\nu$  unter Verwendung der semiempirischen PM3-Methode.

#### 4. Entwicklung neuer Kraftfeldparameter

MD-Simulationen sollten einen besseren Aufschluss über eine Korrelation von  $\mu$  und  $\nu$  geben, da die Torsionswinkel frei beweglich und flexibel eine bevorzugte Orientierung einnehmen können. Da die Anwendbarkeit der bisherigen AMBER-Kraftfeldparameter für das Pyrophosphat zweifelhaft ist, wurde das Molekül mit dem QM/MM-Ansatz behandelt. Hierbei wurde das zweifach negativ geladene Pyrophosphat einschließlich aller Sauerstoffatome semiempirisch behandelt. Die freien Valenzen wurden abgesättigt, um ungepaarte Elektronen zu vermeiden. Diese Vereinfachung wird in anderen Ansätzen inzwischen mit Hilfe von lokalisierten Orbitalen vermieden<sup>97</sup>, müssen im ROAR-Modul jedoch noch so vorgenommen werden. Die Methylgruppen wurden über die Wasserstoffatome an die Sauerstoffatome gebunden und molekülmechanisch mit dem AMBER91-Kraftfeld berechnet.

Die QM/MM-MD-Simulation zeigte keine bevorzugte Orientierung der Torsionswinkel  $\mu$  und  $\nu$  (Abbildung 4-5). Vielmehr können beide Winkel jeden beliebigen Wert annehmen. Allerdings sind beide Torsionswinkel stark miteinander korreliert, so dass das Konturdiagramm eine hohe Symmetrie entlang einer Diagonalen aufweist (Abbildung 4-5). Einer Addition beider Torsionswinkel innerhalb eines Populationsmaximums ergibt jeweils einen bestimmten Wert für den Diederwinkel  $\delta'$ .

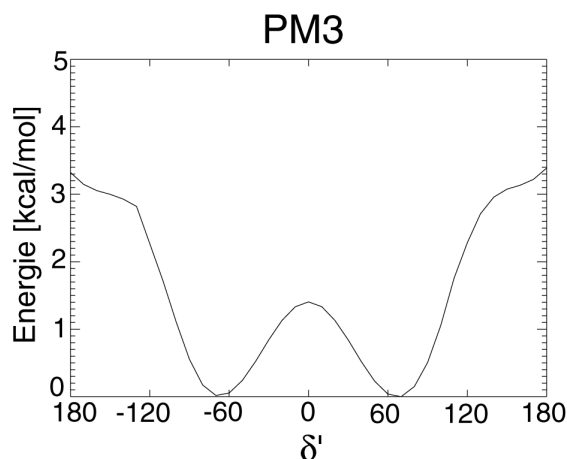
QM/MM-MD-Simulationen sind sehr rechenintensiv, wodurch die Simulation auf eine Dauer von lediglich 2 ns beschränkt war. Innerhalb dieses Zeitraums befand sich das Molekül noch nicht im Gleichgewicht, und dementsprechend wurden nicht alle Zustände generiert. Dennoch ist die deutliche Korrelation der Torsionswinkel  $\mu$  und  $\nu$  zu erkennen.



**Abbildung 4-5:** Konturdiagramm der inneren Torsionswinkel  $\mu$  und  $\nu$  von Dimethyldiphosphat (DMDP) ermittelt durch eine QM/MM-MD-Simulation.

Der Vergleich der semiempirischen Rechnungen (Abbildung 4-4, Abbildung 4-5) mit den Berechnungen der Energiehyperflächen unter Verwendung der AMBER-Kraftfelder (Abbildung 4-2) belegt die Notwendigkeit einer Parametrisierung für pyrophosphathaltige Verbindungen. Da keine neuen Atomtypen auftreten, können bestehende Parameter für van-der-Waals-Radien, Gleichgewichtsabstände etc. übernommen werden. Die semiempirischen Rechnungen zeigten, dass die Geometrie von DMDP vor allen Dingen durch die Orientierung der beiden Phosphatgruppen zueinander bestimmt wird. Eine Parametrisierung wird im Wesentlichen also für den Bindungswinkel  $\phi_{\text{POP}}$  und den Diederwinkel  $\delta'$  benötigt.

In zwei semiempirischen Rechnungen wurde der Diederwinkel  $\delta'$  in zwei  $180^\circ$ -Rotationen beginnend mit  $0^\circ$  und endend mit  $180^\circ$  in  $10^\circ$  Schritten in- bzw. dekrementiert und der Rest des Moleküls geometrioptimiert. Es wurden zwei Energieminima in der  $+sc$ - und  $-sc$ -Orientierung ( $\delta'$  ca.  $70^\circ$  und  $-70^\circ$ ) gefunden (Abbildung 4-6). Die  $sp$ - und  $ap$ -Konformationen ( $\delta' = 0^\circ$  bzw.  $\delta' = 180^\circ$ ) wurden als Übergangszustände berechnet.



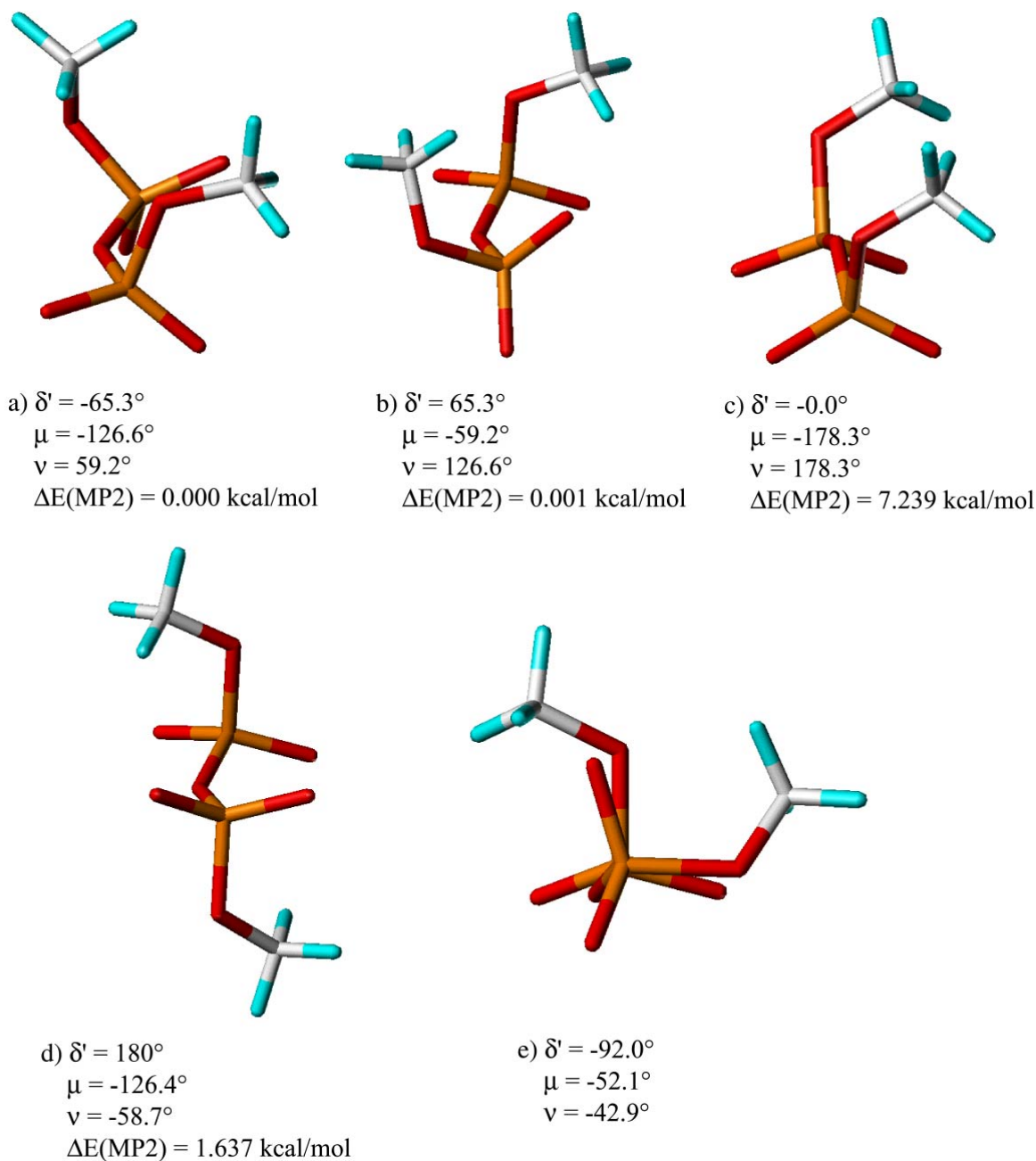
**Abbildung 4-6:** Energieprofil des Diederwinkels  $\delta'$  von DMDP berechnet unter Verwendung der PM3-Methode.

Wie bereits erwähnt enthalten semiempirische Methoden viele Näherungen und Vereinfachungen. Die Energieminima und die Übergangszustände der semiempirischen Rechnung wurden daher mit ab initio Methoden erneut berechnet. Hierbei wurden die beiden globalen Minima der semiempirischen Rechnung ( $\delta = 70^\circ$  und  $\delta' = -70^\circ$ ) als Startstrukturen verwendet, auf HF/6-31G\*-Niveau geometrioptimiert, und die Energie der Endstruktur auf MP2/6-31G\*-Niveau berechnet. Es ergaben sich zwei strukturell sehr ähnliche Konformationen, bei denen die beiden Phosphatgruppen *gauche*-Orientierungen einnehmen. Der Die-

#### 4. Entwicklung neuer Kraftfeldparameter

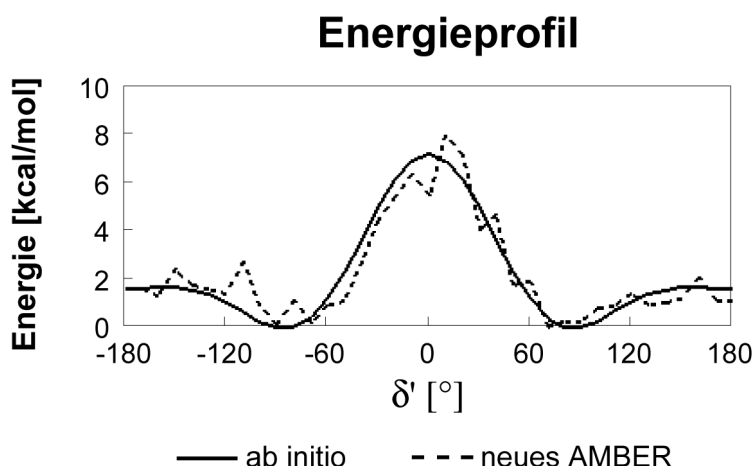
---

derwinkel beträgt  $\delta' = \pm 65.3^\circ$ . Sie weisen die niedrigste Energie auf und stellen somit die globalen Minima dar (Abbildung 4-7 a, b). Eine Optimierung auf MP2/6-31G\*-Niveau, die zu Testzwecken durchgeführt wurde, bedeutete keine Verbesserung, sondern führte zu einer vergleichbaren Struktur. Die Übergangszustände bei  $\delta' = 0^\circ$  und  $\delta' = 180^\circ$  der semiempirischen Rechnung wurden ebenfalls MP2/6-31G\*//HF/6-31G\* berechnet,  $\delta'$  allerdings nicht optimiert. Die resultierenden Übergangszustände ergaben eine deutlich ungünstigere *sp*-Konformation ( $\delta' = 0^\circ$ ) mit  $\Delta E = 7.239$  kcal/mol als die *ap*-Konformation ( $\delta' = 180^\circ$ ) mit  $\Delta E = 1.637$  kcal/mol (Abbildung 4-7 c, d). Dass die *ap*-Konformation tatsächlich auch mit ab initio Methoden einen Übergang darstellt, wurde durch Geometrieoptimierungen dieser Konformation ( $\delta' = 180^\circ$ ) auf HF/6-31G\*- und MP2/6-31G++-Niveau festgestellt. Unter Verwendung des kleinen Basissatzes wurde die Startgeometrie nicht wesentlich verändert. Die MP2/6-31++-Rechnung hingegen optimierte den Diederwinkel  $\delta' = 92^\circ$  (Abbildung 4-7 e), so dass sich eine Ähnlichkeit mit einem Minimum ( $\delta' = +65.3^\circ$ ) aufwies. Dies wurde als Beweis eines Übergangszustands bei  $\delta' = 180^\circ$  gewertet. Da die unterschiedliche Startgeometrie der MP2-Optimierung (Abbildung 4-7 a, b) eine anderer Orientierung der Torsionswinkel  $\mu$  und  $\nu$  verursachte, war auch die Lage der beiden Phosphatgruppen stärker aus der *gauche*-Konformation ausgelenkt. Insgesamt wurde jedoch davon ausgegangen, dass nur jeweils ein einziges allerdings recht breites Minimum in der jeweiligen *gauche*-Konformation vorliegt.



**Abbildung 4-7:** Auf HF/6-31G\*- (a-d) und MP2/6-31+G\*-Niveau (e) optimierte Geometrien von Dimethyldiphosphat (DMDP) und ihre MP2/6-31G\*-Energien.

Aus den ab initio berechneten Konformationen und den MP2/6-31G\*-Energien ergab sich ein Energieprofil für DMDP in Abhängigkeit von  $\delta'$ , welches durch Cosinusterme angenäherte wurde (Abbildung 4-8).



**Abbildung 4-8:** Energieverteilung des Diederwinkels  $\delta'$  in DMDP berechnet nach dem modifizierten AMBER91-Kraftfeld (·····) und der durch Cosinusterme angenäherten ab initio Rechnung (—).

DMDP stellt eine hypervalente, geladene Verbindung mit Elementen der dritten Periode dar. Zur Berechnung derartiger Verbindungen ist prinzipiell die Verwendung diffuser Funktionen unerlässlich. Auf Grund mangelnder Rechnerkapazitäten musste auf die Verwendung größerer Basissätze im Wesentlichen verzichtet werden. Allerdings zeigten Berechnungen verschiedener diphosphathaltiger Verbindungen, dass die Ergebnisse relativ unabhängig von der Größe des Basissatzes sind, und der 6-31G\*-Basissatz vergleichsweise gute Resultate liefert.<sup>132</sup>

#### 4.4. Quantenmechanische Untersuchung von Diphosphorsäurediisopropylester (DPP)

Mit dem Ziel Kraftfeldparameter für das Pyrophosphat zu entwickeln, muss dem Ansatz der Separation, dem ein Kraftfeld unterliegt (Kapitel 3.3.5), Rechnung getragen werden. Hierfür war es notwendig, sterische Einflüsse, die von den Substituenten stammen, vom konformativen Verhalten des Pyrophosphats zu trennen. Deshalb wurde der Einfluss eines weiteren Substituenten auf die Konformation des Pyrophosphats und die Lagen der Minima und Übergangszustände untersucht. Da hierfür ein Substituent benötigt wurde, der möglichst wenig nichtbindende Wechselwirkungen mit dem Pyrophosphat eingeht, wurde ein Pyrophosphatderivat, dessen Säurefunktionen mit zwei Isopropanolgruppen verestert ist, als Modellsubstanz quantenmechanisch berechnet.

Diphosphorsäurediisopropylester (DPP) wurde semiempirisch mit der PM3-Methode berechnet. Der Diederwinkel  $\delta'$  wurde beginnend mit  $180^\circ$  in  $10^\circ$  Schritten inkrementiert und der Rest des Moleküls geometrieoptimiert. Es ergaben sich zwei Energieminima bei etwa  $\delta' = 50^\circ$  und  $\delta' = -50^\circ$  und zwei Übergangszustände, die eine *ap*- und *sp*-Konformation repräsentieren, wobei Letztere energetisch deutlich begünstigt ist. Dies ist erstaunlich, da gewöhnlicher Weise große unpolare Gruppen eine *ap*-Orientierung bevorzugen. Bei genauerer Betrachtung der dreidimensionalen Struktur des *sp*-Übergangszustands, wurde ein kurzer Abstand ( $1.735 \text{ \AA}$ ) eines tertiären Protons der einen Isopropyl- zu einem primären Proton der anderen Isopropylgruppe ersichtlich, der auf kovalente Bindungsanteile hindeutete. Dieser offensichtliche Fehler der semiempirischen Rechnung erforderte eine Neuberechnung mit *ab initio* Methoden.

Hierfür wurden aus der semiempirischen Rechnung die Minima und die Übergangszustände wie bei DMDP auf HF/6-31G\*-Niveau geometrieoptimiert und abschließend die Energien mit der MP2-Methode berechnet.

**Tabelle 4-2:** HF/6-31G\*-Geometrien und MP2/6-31G\*-Energien von DPP.

|                                          | + <i>sc</i>    | - <i>sc</i>    | <i>sp</i>      | <i>ap</i>      |
|------------------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| $\delta'$                                | $77.4^\circ$   | $-77.4^\circ$  | $0.0^\circ$    | $180.0^\circ$  |
| $\mu$                                    | $55.7^\circ$   | $-135.1^\circ$ | $175.9^\circ$  | $-54.2^\circ$  |
| $\nu$                                    | $-135.1^\circ$ | $55.7^\circ$   | $-175.9^\circ$ | $-130.5^\circ$ |
| $\Delta E(\text{MP2}) [\text{kcal/mol}]$ | 0.000          | 0.000          | 7.432          | 2.001          |

Wie bei DMDP wurden auch bei DPP die *sc*- und die *-sc*-Orientierungen der Phosphatgruppen mit der *ab initio* Methode als die energetisch günstigsten Konformationen berechnet (Tabelle 4-2). Erwartungsgemäß ist der Diederwinkel  $\delta'$  im Vergleich zu DMDP auf Grund der sterisch anspruchsvolleren Substituenten etwas stärker aus der ideal gestaffelten Orientierung ausgelenkt. Die Energieminima des Diederwinkels  $\delta'$  lägen ohne Substituenten also in einer annähernd optimalen *gauche*-Konformation. Der *ap*-Übergangszustand ist wie bei DMDP energetisch deutlich bevorzugt. Während in der semiempirischen Rechnung kovalente Bindungsanteile zwischen den Protonen der beiden Isopropylgruppe auftraten, sind die Abstände dieser Protonen in der *ab initio* Rechnung erwartungsgemäß deutlich größer als der doppelte van-der-Waals-Radius und weisen somit keine kovalente Bindungsanteile auf.

#### 4. Entwicklung neuer Kraftfeldparameter

Auch mit zwei Isopropylsubstituenten wurden also zwei *gauche*-Konformationen als energetische Minima berechnet. Die Lage dieser Minima ist erwartungsgemäß verschoben. Die Übergangszustände bleiben im Wesentlichen unverändert.

#### 4.5. Neue AMBER-Parameter für pyrophosphathaltige Verbindungen

Im AMBER91-Kraftfeld wird die potenzielle Energie der Torsionswinkel prinzipiell mit zwei Termen ausgedrückt. Im Fall von pyrophosphathaltigen Verbindungen erwies es sich aber als zweckdienlich, drei Terme zu definieren, die der allgemeinen Kraftfeldgleichung unterliegen (Gleichung 3-10). Die Parameter  $k$ ,  $n$  und  $\phi$  wurden so angepasst, dass sie eine Energiekurve ergaben, die der ab initio Rechnung entsprach (Abbildung 4-8). Die Parameter wurden in AMBER91 implementiert (Tabelle 4-3), um mit diesem erweiterten Kraftfeld die Konformation und Flexibilität modifizierter Zuckernucleotide zu ermitteln.

**Tabelle 4-3:** Neue Parameter für das AMBER91-Kraftfeld (vgl. Gleichung 3-10).

| Kraftfeld-Term | $k_1$ | $n_1$ | $\phi_1$ | $k_2$ | $n_2$ | $\phi_2$ | $k_3$ | $n_3$ | $\phi_3$ |
|----------------|-------|-------|----------|-------|-------|----------|-------|-------|----------|
| Bindungswinkel |       |       |          |       |       |          |       |       |          |
| P-OS-P         | 100.0 | -     | 132.59   |       |       |          |       |       |          |
| Torsionswinkel |       |       |          |       |       |          |       |       |          |
| P-OS-P-OS      | 0.3   | 6     | 90       | 0     | 0     | 0        | 0     | 0     | 0        |
| P-OS-P-OH      | 0     | 0     | 0        | 0     | 0     | 0        | 0     | 0     | 0        |
| P-OS-P-O2      | 0     | 0     | 0        | 0     | 0     | 0        | 0     | 0     | 0        |
| Diederwinkel   |       |       |          |       |       |          |       |       |          |
| OS-P-P-OS      | 0.9   | 3     | 0        | 2.2   | 2     | 0        | 0.7   | 1     | 0        |

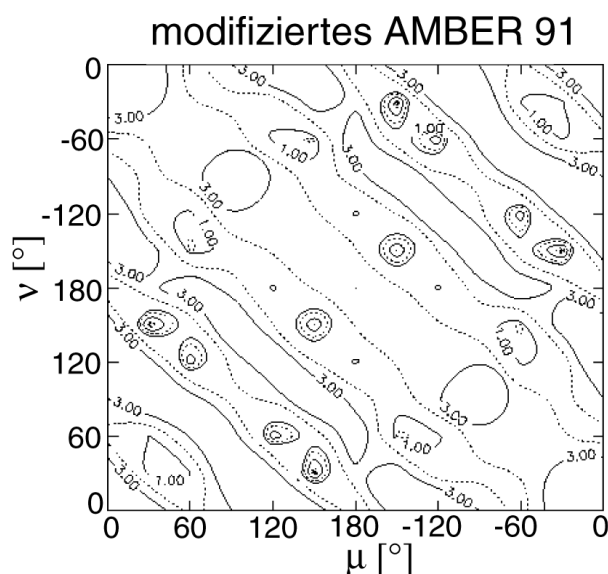
#### 4.6. Test der neuen Parameter

Zur Überprüfung der neu entwickelten Parameter wurden zunächst einfache Geometrieoptimierungen von DMDP mit dem modifiziertem AMBER91-Kraftfeld im Vakuum durchgeführt: Ausgehend von unterschiedlichen Startkonformationen wurde jeweils die *sc*-, und die *-sc*-Konformation bezüglich der beiden Phosphatgruppen generiert. Startkonformationen nahe des *ap*-Übergangszustands verblieben jedoch in dieser Konformation. Die hier verwendeten Minimierungsalgorithmen waren auf Grund der niedrigen Energiedifferenz zwischen diesem Übergangszustand und dem Minimum offensichtlich nicht in der Lage das globale Minimum zu finden.



In einem zweiten Schritt wurde der Diederwinkel  $\delta'$  in  $10^\circ$  Schritten variiert und der Rest des Moleküls geometrieoptimiert. Das Energieprofil ähnelt in zufriedenstellendem Maße der geglätteten Energiekurve der ab initio Rechnung (Abbildung 4-8).

Berechnungen der Energiehyperfläche von DMDP mit dem neu parametrisierten AMBER91-Kraftfeld zeigten im Einklang mit den Ergebnissen der semiempirischen Rechnungen keine eindeutige Bevorzugung einer Orientierung der Torsionswinkel  $\mu$  und  $\nu$ . Die Symmetrie entlang der Diagonalen verdeutlicht die starke Korrelation der Torsionswinkel, so dass sich stets ein Diederwinkel  $\delta'$  von etwa  $-65^\circ$  bzw.  $65^\circ$  ergibt. Geometrieoptimierungen der berechneten Minima ergaben  $+sc$ - und  $-sc$ -Konformationen der Phosphatgruppen und ähneln den Strukturen der quantenmechanischen Rechnung.

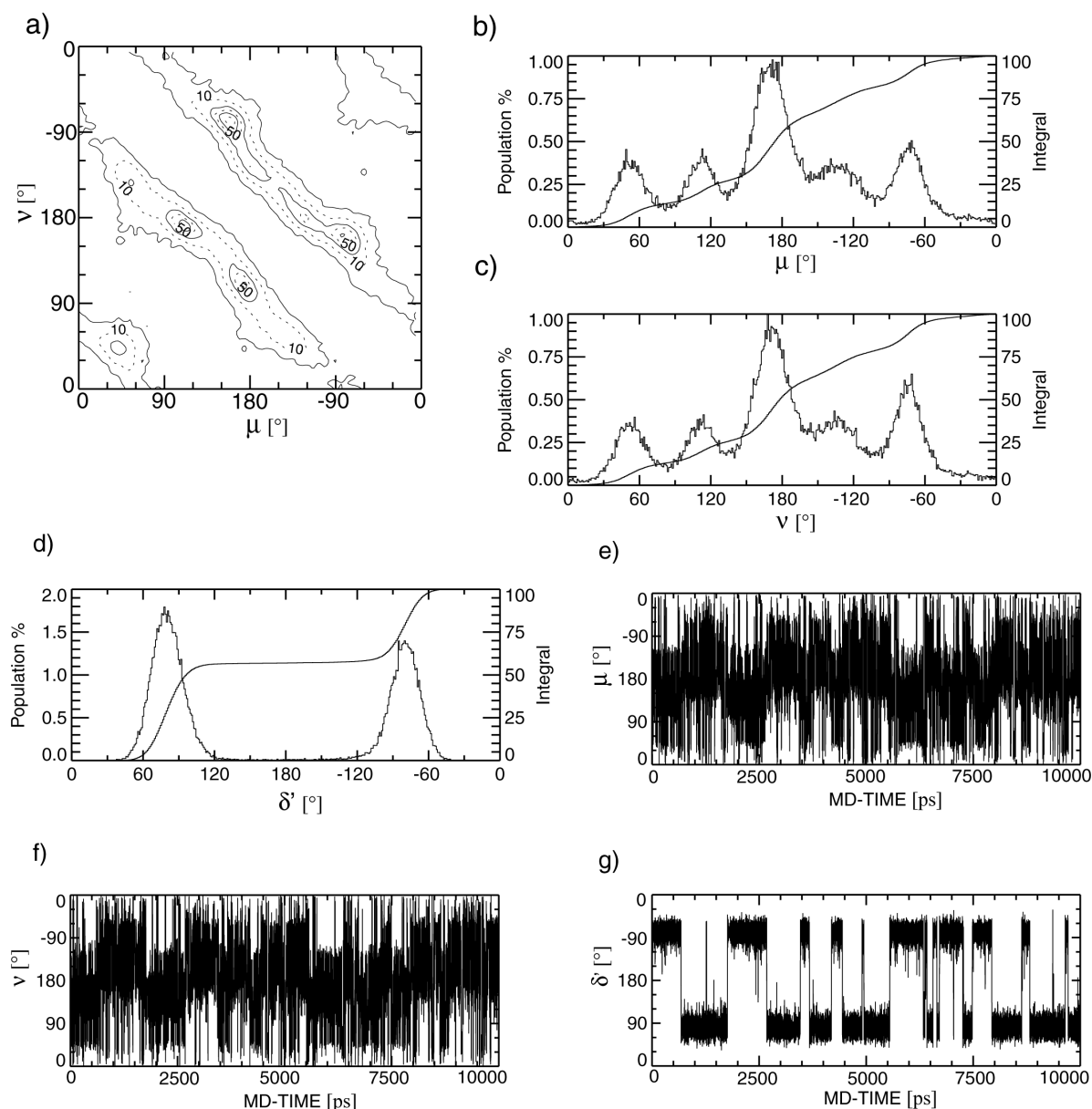


**Abbildung 4-9:** Energiehyperflächen von Dimethyldiphosphat (DMDP) der Torsionswinkel  $\mu$  und  $\nu$  unter Verwendung des neu parametrisierten AMBER91-Kraftfelds.

In einer anschließenden MD-Simulation mit dem neu parametrisierten AMBER91-Kraftfeld ließ sich die Korrelation der Torsionswinkel ebenfalls gut erkennen (Abbildung 4-10 a). Zudem treten zwei weitere Nebenmaxima bei  $\mu = 45^\circ$  und  $\nu = 45^\circ$  bzw.  $\mu = -45^\circ$  und  $\nu = -45^\circ$  auf, die in der semiempirischen Gitternetzsuche nicht vorhanden waren. Die Torsionswinkel  $\mu$  und  $\nu$  nehmen viele verschiedene Orientierungen ein (Abbildung 4-10 b, c). Der Diederwinkel  $\delta'$  hingegen hat zwei deutliche Populationsmaxima bei etwa  $\delta' = 70^\circ$  und  $\delta' = -70^\circ$  (Abbildung 4-10 d). Die Torsionswinkel  $\mu$  und  $\nu$  sind sehr flexibel,  $\delta'$  ist in seiner Flexibilität deutlich reduziert (Abbildung 4-10 e, f, g).

#### 4. Entwicklung neuer Kraftfeldparameter

Die Übereinstimmungen zwischen den Ergebnissen des neu parametrisierten AMBER91-Kraftfelds mit den Resultaten der quantenmechanischen Berechnungen verdeutlichte, dass das modifizierte AMBER91-Kraftfeld gut Energien und die Geometrien von DMDP reflektiert und damit für die Berechnung pyrophosphathaltiger Verbindungen geeignet ist.



**Abbildung 4-10:** MD-Simulation von DMDP über einen Zeitraum von 10 ns mit dem neu parametrisierten AMBER91-Kraftfeld. a) Konturdiagramm der Populationen der Torsionswinkel  $\mu$  und  $\nu$ . b)-d) Populationsdiagramme und e)-g) Trajektorien der Diederwinkel  $\mu$ ,  $\nu$  und  $\delta'$ .

## 4.7. Ladungen

Zur Berechnung der hier untersuchten Nucleoside und Zuckernucleotide unter Verwendung molekülmechanischer Methoden wurden Atompartialladungen benötigt. Hierfür wurden sämtliche Molekülfragmente (Nucleoside, Pyrophosphat, Pyranosen) ab initio geometrieoptimiert. Aus diesen Rechnungen wurde die Elektronendichteverteilung des Moleküls erhalten und in ein Raster aus vielen Punktladungen übertragen. Diese ESP-Ladungen wurden nach dem RESP-Modell systematisch erniedrigt, da der 6-31G\*-Basissatz die Polarität der Atome überbewertet, und den Atomen als Partialladungen zugewiesen (Kapitel 9).

Streng genommen ist die Verwendung des RESP-Ladungsmodells lediglich für das AMBER94-Kraftfeld gültig. Um die Berechnungen jedoch zu vereinfachen, wurde im Rahmen dieser Arbeit versucht, das Ladungsmodell auch auf AMBER91 zu übertragen. AMBER bietet die Möglichkeit, Skalierfaktoren für die nichtbindenden Wechselwirkungen zu verwenden. Eine Übertragung des RESP-Ladungsmodells auf AMBER91 beinhaltet also lediglich die Suche nach dem richtigen Skalierfaktor ( $EEL_S$  in Gleichung 3-10) für die elektrostatischen Wechselwirkungen und einer korrekten Dielektrizitätskonstante (vgl. Kapitel 3.3.5).

Für die Suche dieser beiden Parameter wurde die potenzielle Energie für das bekannte und häufig berechnete 2dU bei variierender Orientierung der exocyclischen Gruppe (Torsionswinkel  $\gamma$ , vgl. Kapitel 5) ermittelt, da nichtbindende Wechselwirkungen diesen Freiheitsgrad stark beeinflussen. Aus NMR-Daten ist bekannt, dass die gg-Konformation mit ca. 50% am stärksten und die tg-Konformation mit 20% am geringsten populiert ist.<sup>130</sup> Nach Gleichung 3-14 ergibt sich daraus eine Differenz in der freien Enthalpie von  $\Delta G(\text{gt-gg}) = 1.27 \text{ kJ/mol}$  und  $\Delta G(\text{tg-gg}) = 2.29 \text{ kJ/mol}$ . Die Konformation des Riboserings wurde konstant in der C2'-*endo*-Konformation und die Orientierung der Base in *anti*-Stellung gehalten. Aus PCILO-Rechnungen wurde eine Präferenz von gg-Konformation gegenüber der tg-Orientierung von ca. 4-8 kJ/mol berechnet.<sup>98</sup>

#### 4. Entwicklung neuer Kraftfeldparameter

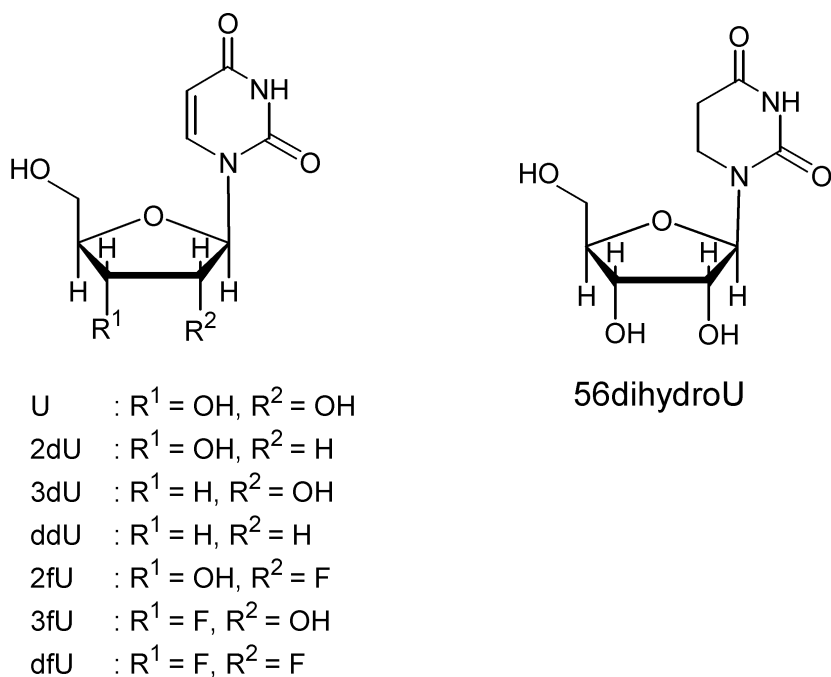
**Tabelle 4-4:** Potenzielle Energien ( $E_{\text{Pot}}$ ) der exocyclischen Gruppe bei verschiedenen Skalierungsfaktoren für die nichtbindenden elektrostatischen Wechselwirkungen und variierenden Dielektrizitätskonstanten.

| Dielektrizitätskonstante<br>$\epsilon$ [ $\text{C}^2/\text{Jm}$ ] | Skalierungsfaktor | $E_{\text{Pot}}(\text{gg})$<br>[kJ/mol] | $E_{\text{Pot}}(\text{gt})$<br>[kJ/mol] | $E_{\text{Pot}}(\text{tg})$<br>[kJ/mol] |
|-------------------------------------------------------------------|-------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|
| 4.0 (konstant)                                                    | 2.0               | 31.43                                   | 34.30                                   | 30.39                                   |
| 80.0 (konstant)                                                   | 2.0               | 53.20                                   | 53.35                                   | 56.87                                   |
| 4.0 (konstant)                                                    | 1.2               | 28.32                                   | 31.25                                   | 28.11                                   |
| 8.0 (distanzabhängig)                                             | 1.2               | 39.55                                   | 40.74                                   | 43.60                                   |

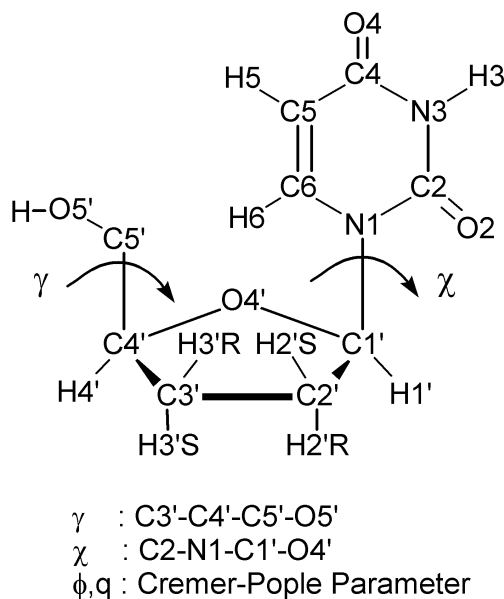
Die Berechnung der gestaffelten Konformationen der exocyclischen Gruppe mit dem AMBER91-Kraftfeld unter Verwendung einer Dielektrizitätskonstanten von  $\epsilon = 8.0 \text{ C}^2/\text{Jm}$  (distanzabhängig) und einem Skalierungsfaktor von  $EEL_S = 1.2$  wurden Energien berechnet, die das Populationsgleichgewicht der NMR-Daten am besten reflektieren. Diese Werte wurden für die weiteren Berechnungen mit AMBER91 verwendet.

## 5. Konformation modifizierter Nucleoside

Viele Aspekte des konformativen Verhaltens von Nucleosiden im Festkörper und in Lösung sind bekannt.<sup>36</sup> Ihr flexibles Verhalten erschwerte jedoch häufig eine Interpretation empirisch ermittelter Daten. Durch die Verwendung neuer Rechenmodelle wurde die Interpretation jedoch vereinfacht. Basierend auf Bekanntem wurde die Konformation der Nucleoside 3'-Desoxyuridin (3dU), 2',3'-Didesoxyuridin (ddU) und 2'-Desoxy-2'-fluorouridin (2fU) erneut untersucht und um die Orientierung der Base und um die Korrelation der Freiheitsgrade erweitert, um so detaillierte Einblicke in die Kräfteverhältnisse in Nucleoside zu erlangen. Wesentliche Aspekte bisheriger Forschung über die Konformation von Nucleosiden sollen zunächst kurz zusammengefasst werden.



**Abbildung 5-1:** Schematische Darstellung von Uridin (U), 2'-Desoxyuridin (2dU), 3'-Desoxyuridin (3dU), 2',3'-Didesoxyuridin (ddU), 2'-Desoxy-2'-fluorouridin (2fU), 3'-Desoxy-3'-fluorouridin (3fU), 2',3'-Didesoxy-2',3'-difluorouridin (dfU) und 5,6-Dihydrouridin (56dihydroU).



**Abbildung 5-2:** Bezeichnung von Atomen und der konformativen Freiheitsgrade  $\gamma$ ,  $\phi$  und  $\chi$  am Beispiel des Nucleosids ddU.

In Nucleosiden ist die Pyrimidinbase inklusive des extracyclischen Kohlenstoffatoms C1' planar. Ihre Konformation ändert sich nur relativ zur Ribose durch Drehung um den Torsionswinkel  $\chi$ . Die Torsionswinkel des Furanosylrings variieren nicht unabhängig voneinander, sondern ändern sich stets alle gleichzeitig. In einem Konzept von *Cremer et al.*<sup>99</sup> werden sie zusammengefasst und in einem Fünfring durch zwei Parameter  $\phi$  und  $q$  beschrieben (siehe Kapitel 3.3.8). Weil  $q$  eine intrinsische Eigenschaft ist, die nur vom Ring an sich und nicht von den Substituenten abhängt<sup>100</sup> und keine große Varianz aufweist ( $q = 0.377 \pm 0.029$  Å),<sup>101</sup> kann die Konformation des Furanoserings allein durch  $\phi$  ausgedrückt werden (siehe Kapitel 3.3.8). Die Stellung der exocyclischen Gruppe wird durch den Torsionswinkel  $\gamma$  entlang der C4'-C5' Bindung beschrieben. Die Konformationsanalyse von Nucleosiden reduziert sich auf die Beschreibung der drei Freiheitsgrade  $\chi$ ,  $\phi$  und  $\gamma$ .

### Die Orientierung der Base in Pyrimidinnucleosiden

Die Base in Pyrimidinen besitzt in wässriger Lösung im Wesentlichen zwei Orientierungen. In der *syn*-Konformation liegt das Sauerstoffatom O2 der Base über dem Ribosering, wohingegen in der *anti*-Orientierung das Wasserstoffatom H6 über der Ribose lokalisiert ist. NMR-Experimente zeigten, dass die *anti*-Konformation in Lösung deutlich stärker populiert ist. In 2dU liegt die *anti*-Konformation zu etwa 64% ( $\chi = -160^\circ$ ) und die *syn*-Orientierung zu

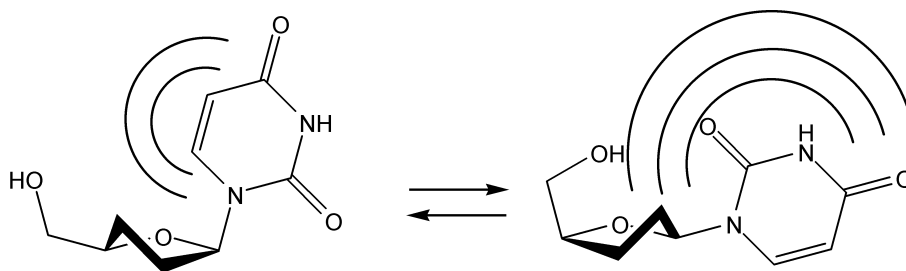
etwa 36% ( $\chi = 45^\circ$ ) vor.<sup>102</sup> In 3dU und ddU ist die Population der *anti*-Orientierung ähnlich groß wie in 2dU.<sup>123</sup> Im Festkörper ändert sich diese Dominanz der *anti*-Orientierung nicht, so dass die meisten Pyrimidinnucleoside, wie z.B. 2dU<sup>103</sup>, eine *anti*-Orientierung aufweisen.<sup>36</sup> Berechnungen bestätigten die Experimente und ergaben, dass die *syn*-Konformation in 2dU mit ca. 8 kJ/mol benachteiligt ist.<sup>104</sup> Die *high-anti*-Konformation ( $\chi = -60^\circ$ ) spielt nur eine geringe Rolle und ist in Lösung kaum populiert.<sup>36</sup> Die deutliche Bevorzugung der *anti*-Orientierung beruht schlicht auf einem sterischen Konflikt zwischen den Sauerstoffatomen O2 der Base und O4' der Ribose.<sup>36</sup>

Da in der Süd-Konformation der Ribose ( $\phi = 72^\circ$ , C2'-*endo*) die Base eine pseudoäquatoriale Position einnimmt und somit mehr Platz für die Base zur Verfügung steht, zeigen Kristallstrukturen von Pyrimidinnucleosiden, die in der sterisch anspruchsvollen *syn*-Orientierung vorliegen, verstärkt diese Süd-Konformation (Abbildung 5-3 rechts).<sup>105</sup> In der *anti*-Orientierung hingegen ist die Abstoßung der Sauerstoffatome O2 und O4' deutlich geringer, so dass auch eine Nord-Konformation ( $\phi = -72^\circ$ , C3'-*endo*) mit pseudoaxialer Position der Base möglich ist (Abbildung 5-3 links).<sup>36</sup> Die Konformation der Ribose beeinflusst also das *syn-anti*-Gleichgewicht der Base. Auch die exakten Werte für den glycosidischen Winkel  $\chi$  sind von der Konformation der Ribose abhängig. Während in der Nord-Konformation der Ribose der Torsionswinkel  $\chi$  in der *anti*-Orientierung zwischen  $-180^\circ$  und  $-138^\circ$  variiert, werden in der Süd-Konformation Werte für  $\chi$  von  $-144^\circ$  bis  $-115^\circ$  beobachtet. Denn in der Nord-Konformation stoßen sich die Wasserstoffatome H6 der Base und H3' der Ribose ab, so dass der Torsionswinkel  $\chi$  aufgeweitet ist. In der Süd-Konformation hingegen nimmt die Base eine pseudoäquatoriale Position ein, und die abstoßende Wechselwirkung der betreffenden Wasserstoffatome erniedrigt sich, so dass sich die Sauerstoffatome O2 und O4' in Richtung einer *-ac*-Konformation orientieren.<sup>36</sup>

Der Übergang zwischen *syn*- und *anti*-Konformationen vollzieht sich über den *high-anti*-Pfad.<sup>36</sup> Ein Übergang bei einem Torsionswinkel  $\chi = 90^\circ$  wird vermieden, da es in dieser Konformation zu einem sterischen Konflikt zwischen dem Sauerstoffatom O2 und den Wasserstoffatomen H2' und H3' kommt. Die Konformationswechsel ereignen sich im Nanosekundenbereich<sup>106</sup> und sind somit schnell relativ zur NMR-Zeitskala. In NMR-Experimenten werden somit nur gemittelte Strukturen aufgelöst.

## 5. Konformation modifizierter Nucleoside

In Nucleosiden werden zwei Wasserstoffbrückenbindungen gefunden. In der *syn*-Orientierung der Base ist eine O5'-H...O2-Wechselwirkung möglich.<sup>36</sup> Deuteriumausgetauschte NMR-Experimente und quantenmechanische Berechnungen identifizierten eine zweite, ungewöhnlichere Wasserstoffbrückenbindung C6-H...O5',<sup>107</sup> die die *anti*-Konformation stabilisiert.



**Abbildung 5-3:** Abstoßende Wechselwirkungen im Nucleosid zwischen der Base in der *anti*-Orientierung und der Ribose in der C3'-*endo*-Konformation (links) und zwischen der Base in der *syn*-Orientierung und der Ribose in der C2'-*endo*-Konformation (rechts).

### Konformation des Furanoserings

Der Ribosering ist niemals planar. Ein Maß für die Stärke der Faltung ist der Pseudorotationsparameter  $q$ , der bei Furanosen relativ konstant ist. Die Rotationsbarriere um die C-O-Bindungen ist deutlich niedriger als um die C-C-Bindungen. Deshalb treten entlang der C-O-Bindungen eher verdeckte Konformationen auf, wohingegen die Torsionswinkel, die eine C-C-Bindung beinhalten, gestaffelt stehen.<sup>36</sup> Das führt dazu, dass nicht alle Konformationen des Pseudorotationscyclus (Kapitel 3.3.8) eingenommen werden.

Eine Analyse von 178 Röntgenstrukturen verschiedener  $\beta$ -D-Nucleoside zeigte, dass die Ribose vorwiegend eine C2'-*endo*- ( $\phi = 72^\circ$ , Süd) und eine C3'-*endo*-Konformation ( $\phi = -72^\circ$ , Nord) einnimmt.<sup>100</sup> Sie repräsentieren auch die bevorzugten Konformationen in Lösung.<sup>108</sup> Eine Änderung zwischen der Nord- und der Süd-Konformation vollzieht sich über den O4'-*endo*-Pfad ( $\phi = 0^\circ$ , Ost) und auf Grund der Abstoßung zwischen der Base und der exocyclischen Gruppe niemals über den O4'-*exo*-Pfad ( $\phi = 180^\circ$ , West).<sup>109,110</sup>

Die Konformation des Furanoserings wird neben dem Lösungsmittel und dem pH-Wert<sup>111,112,113,114</sup> im Wesentlichen durch den *gauche*-Effekt und den anomeren Effekt beeinflusst.



Der *gauche*-Effekt<sup>115</sup> tritt prinzipiell bei R-X-Y-R' und X-C-C-Y Systemen auf (X und Y sind elektronegative Substituenten) und beschreibt die Bevorzugung dieser Systeme zu *gauche*-Konformationen gegenüber *trans*-Orientierungen. Er wird allgemein als Tendenz eines Moleküls definiert, diejenige Struktur einzunehmen, die eine maximale Anzahl von *gauche*-Wechselwirkungen zwischen benachbarten Elektronenpaaren und/oder polaren Bindungen aufweist.<sup>116</sup> Während bei einigen Molekülen, wie beispielsweise bei Glykol, der Ursprung des *gauche*-Effekts auf Wasserstoffbrückenbindungen zurückgeht,<sup>117</sup> werden die Gründe bei anderen Molekülen noch diskutiert. Wechselwirkungen der freien Elektronenpaare von X und Y werden hierbei als Erklärungsversuch angeführt<sup>118</sup> wie  $\sigma\tau\sigma^*$ -Orbitalüberlappungen zwischen dem besten Donor und dem besten Akzeptor.<sup>119</sup>

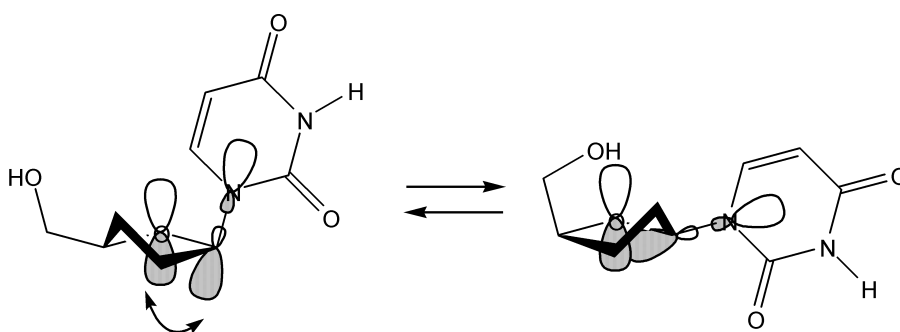
Der anomere Effekt<sup>120,121</sup> wurde zunächst bei Pyranosen entdeckt und später allgemeingültig bei Systemen von Kohlenstoffatomen mit zwei elektronegativen Substituenten (X-C-Y) beschrieben. In  $\beta$ -D-Nucleosiden beruht der anomere Effekt auf der Stabilisierung durch Hyperkonjugation eines nichtbindenden Elektronenpaares am Sauerstoff O4' ( $n_{O4'}$ ) mit dem antibindenden Molekülorbital der glycosidischen Bindung C1'-N1 ( $\sigma^*_{C1'-N1}$ )<sup>122</sup> (Abbildung 5-4). Nur in pseudoaxialer Stellung der Base ist die Geometrie für eine Überlappung der betreffenden Orbitale geeignet, so dass der energetische Zustand des Moleküls abgesenkt wird. In äquatorialer Stellung ist keine Überlappung möglich. Verkürzung der Bindungslänge C1'-O4' gegenüber C4'-O4' auf Grund der  $n_{O4'}\tau\sigma^*_{C1'-N1}$ -Überlappung, wie sie beispielsweise in der Kristallstruktur von 2dU gefunden wird,<sup>103</sup> unterstützen diese Theorie. Dieses Erklärungsmodell wurde auch durch thermodynamische Messungen des Nord-Süd-Gleichgewichts bestätigt und für einige Nucleoside quantifiziert.<sup>111,112</sup>

Insgesamt beeinflussen und dominieren vier *gauche*-Effekte die Orientierung der Torsionswinkel O2'-C2'-C1'-O4', O2'-C2'-C1'-N1, O2'-C2'-C3'-O3' und O3'-C3'-C4'-O4' und somit die Konformation des Riboserings in Nucleosiden. Der *gauche*-Effekt übt starken Einfluss auf die Konformation der Ribose aus. Eine Änderung der *gauche*-Effekte, die z.B. durch Modifikationen an den Kohlenstoffatomen C2' und C3' hervorgerufen werden kann, verändern deshalb stark das Nord-Süd-Gleichgewicht. Der *gauche*-Effekt ist der Grund, weshalb 2dU eine Süd-Konformation<sup>36</sup> (O3' und O4' stehen *gauche*), 3dU hingegen eine Nord-Konformation<sup>123</sup> (O2' und O4' stehen *gauche*) bevorzugt. Die Stärke des *gauche*-Effekts hängt dabei von der Elektronegativität der Substituenten ab. Dementsprechend steigen die

## 5. Konformation modifizierter Nucleoside

Nord-Konformere von 2fU bis auf 87%.<sup>124</sup> In Uridinderivaten existiert sogar eine lineare Abhängigkeit zwischen Elektronegativität der Substituenten an den Kohlenstoffatomen C2' und C3' und der Ribosekonformation.<sup>124</sup>

Der anomere Effekt ist in seiner Wirkung wesentlich geringer als der *gauche*-Effekt. Er bewirkt die Tendenz eines Nucleosids, prinzipiell Nord-Konformationen zu bevorzugen. Konformationsanalysen von Furanosen, die statt der Base lediglich eine Methoxygruppe aufweisen<sup>125</sup>, zeigten auch diese Präferenz der Furanose zur Nord-Konformation, in der der Substituent eine pseudoaxiale Position einnimmt. Ebenfalls zeigt ddU, das auf Grund fehlender Substituenten keinen den Ribosering beeinflussenden *gauche*-Effekt aufweist, eine Bevorzugung der pseudoaxialen Stellung der Base.<sup>126,127</sup> In Nucleosiden verursacht die sterisch anspruchsvolle Base eine Abstoßung mit der Ribose, wodurch die Süd-Konformation, die durch eine pseudoäquatoriale Position der Base charakterisiert ist, energetisch begünstigt ist.<sup>128,129</sup> Diese beiden Effekte, der anomere Effekt und die Abstoßung zwischen Base und Ribose, sind in ihrer Richtung entgegengesetzt. In ddU überwiegt der anomere Effekt etwas, so dass dieses Nucleosid die Nord-Konformationen favorisiert. In natürlichen Ribonucleinsäuren hingegen sind sie in ihrer Größe ungefähr gleich, so dass sie ein etwa ausgeglichenes Verhältnis an Nord- und Süd-Konformationen aufweisen. Wird durch größere Substituenten am Kohlenstoffatom C6 der Base das Gleichgewicht zu mehr *syn*-Orientierungen der Base verschoben und somit die Abstoßung zwischen Base und Ribose erhöht, dann erhöht sich jedoch der Anteil der Süd-Konformere.<sup>36</sup>

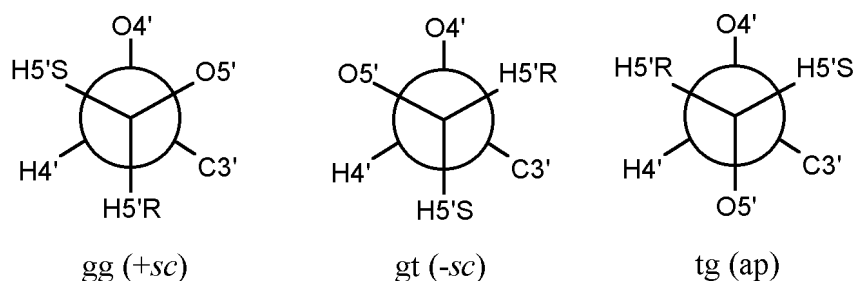


**Abbildung 5-4:** Darstellung der Möglichkeit zur Überlappung des nichtbindenden Orbitals von O4' ( $n_{O4'}$ ) mit dem antibindenden Molekülorbital der glycosidischen Bindung ( $\sigma^*_{C1'-N1}$ ) in der pseudoaxialen Position der Base (links) entsprechend des anomeren Effekts.

### Die Orientierung der exocyclischen Gruppe

Die Orientierung der exocyclischen Gruppe in Nucleosiden zeigt im Festkörper eine Dominanz der tg-Orientierung ( $\gamma = -60^\circ$ ).<sup>36</sup> In wässriger Lösung sind alle drei gestaffelten Konformationen möglich (Abbildung 5-5), tg-Rotamere sind jedoch weniger stabil. In 2dU dominiert klar die gg-Orientierung ( $\gamma = 60^\circ$ , 50% der Rotamere) gegenüber gt ( $\gamma = 180^\circ$ , 30%) und tg ( $\gamma = -60^\circ$ , 20%)<sup>130</sup>, ebenso wie in 3du (gg = 62%, gt = 38%) und ddU (gg = 54%, gt = 42%).<sup>123</sup> Maßgeblich verantwortlich für die Bevorzugung beider *gauche*-Orientierungen ist der *gauche*-Effekt. Wie bei der Konformation der Ribose bestimmt er die Vorzugsorientierungen des Torsionswinkels. Allerdings ist diese deutliche Bevorzugung nur in Lösung existent. Im Festkörper und in der Gasphase<sup>117a</sup> ist er dagegen deutlich erniedrigt. Insofern dürfte das Lösungsmittel eine wesentliche Rolle für diesen Effekt spielen.

Wie bereits erwähnt, können zwei Wasserstoffbrücken zwischen der exocyclischen Gruppe und der Base ausgebildet werden, die die gg-Konformation stabilisieren. In der *syn*-Orientierung der Base ist eine O5'-H...O2-Wechselwirkung möglich, in *anti*-Konformation kann eine C6-H...O5'-Wasserstoffbrückenbindung ausgebildet werden.



**Abbildung 5-5:** Drei gestaffelte Konformationen der exocyclischen Gruppe.

### 5.1. 3'-Desoxyuridin (3dU)

#### 5.1.1. Ergebnisse einer MD-Simulation

Molekülmechanische Berechnungen von modifizierten Nucleosiden mit dem nativen AMBER91-Kraftfeld zeigten größere Fehler mit steigendem Derivatisierungsgrad.<sup>39</sup> MD-Simulation von 3dU wurden daher unter Verwendung zusätzlicher Randbedingungen durchgeführt, die aus NMR-Experimenten<sup>123</sup> erhalten wurden.

Der Ribosefünfring in Nucleosiden besitzt zwei energetisch günstige Konformationen, die etwa bei C2'-*endo* ( $\phi = 72^\circ$ ) und C3'-*endo* ( $\phi = -72^\circ$ ) liegen. Entsprechend dieser Minima werden in der MD-Simulation von 3dU (Abbildung 5-6) die Nord- ( $\phi = -73.0^\circ$ ) und die Süd-Konformation ( $\phi = 90.2^\circ$ ) als Populationsmaxima gefunden, wobei die nördliche stark dominiert (Abbildung 5-6 a, Tabelle 5-1). Laut Rechnung findet der Wechsel zwischen Nord- und Süd-Konformationen stets über den östlichen Pfad ( $\phi = 0^\circ$ ) statt, ein Übergang über den westlichen Pfad ( $\phi = 180^\circ$ ) wird vermieden.

Die exocyclische Gruppe wird laut MD-Simulation in einem Gleichgewicht von allen drei gestaffelten Konformationen berechnet, wobei die gg- ( $\gamma = 60^\circ$ ) und die gt- Orientierungen ( $\gamma = 180^\circ$ ) etwa gleich stark populiert sind (Abbildung 5-6 b, Tabelle 5-1). Im Vergleich zu Kristallstrukturen von Nucleosiden sind kaum tg-Rotamere ( $\gamma = -60^\circ$ ) vorhanden.

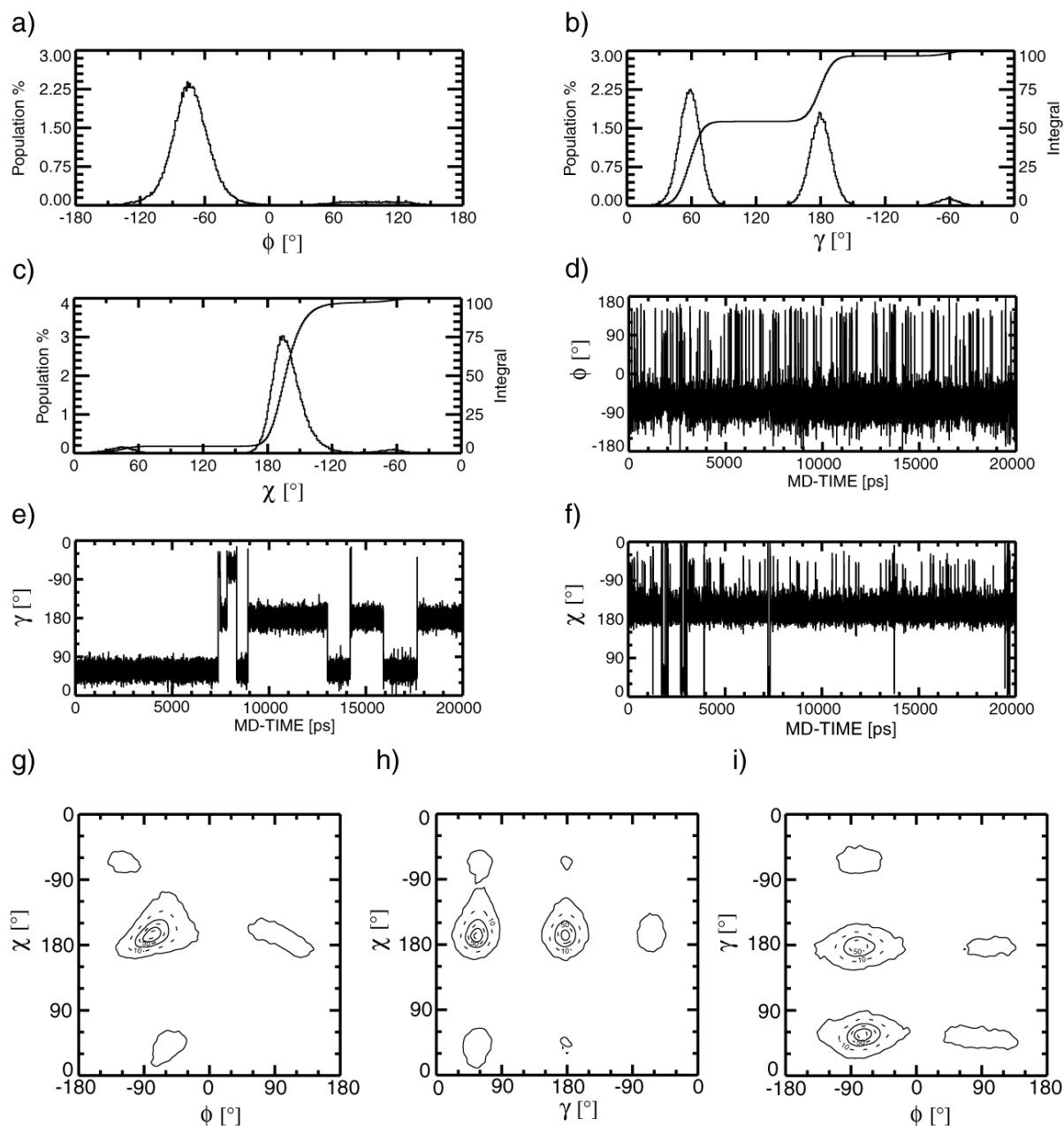
Laut Rechnung liegt die Base hauptsächlich in der *anti*-Orientierung ( $\chi = -160^\circ$ , Abbildung 5-6 c, Tabelle 5-1) vor, während die *syn*- ( $\chi = 45^\circ$ ) und die *high-anti*-Orientierung ( $\chi = -60^\circ$ ) lediglich gering besetzte Nebenmaxima darstellen. Die Konformationswechsel der Base ereignen sich ausschließlich über den *high-anti*-Pfad ( $\chi = 90^\circ$ ). Ein Übergang, bei dem das Sauerstoffatom O2 nahe dem Wasserstoffatom H2'S lokalisiert ist ( $\chi = 120^\circ$ ), wird vermieden. Während des Konformationswechsels der Base, nimmt die Ribose meist eine Nord-Konformation ein (Nord : Süd = 5 : 1).

In der MD-Simulation wird ein gegenseitiger Einfluss zwischen der Konformation der Base und der Ribose berechnet: Die *syn*-Konformation der Base bewirkt eine Verschiebung des Populationsmaximums in Richtung Osten ( $\chi = 45^\circ$ ,  $\phi = 60^\circ$ , Abbildung 5-6 g), wodurch die Base stärker eine pseudoäquatoriale Position einnimmt. In der *anti*-Konformation verlagert sich das Populationsmaximum der Ribosekonformation in Richtung Westen ( $\chi = -160^\circ$ ,

$\phi = 90^\circ$ , Abbildung 5-6 g). Die exocyclische Gruppe und die Base vermindern ihre Distanz und die Base wechselt in eine pseudoaxiale Position. Diese Tendenz setzt sich in der *high-anti*-Orientierung der Base fort. Hier nimmt die Ribose eine noch westlichere Konformation ein, die durch eine ausgeprägte pseudoaxiale Position der Base gekennzeichnet ist ( $\chi = -60^\circ$ ,  $\phi = 120^\circ$ , Abbildung 5-6 g). Laut MD-Rechnung existiert also eine Korrelation zwischen der westlichen Konformation der Ribose mit der *high-anti*- bzw. *anti*-Orientierung der Base, und der östliche Konformation mit der *syn*-Orientierung. Eine *C2'-endo/syn*- und *C3'-endo/anti*-Korrelation, wie sie in Kristallstrukturen vorhanden ist<sup>36</sup>, wird durch die MD-Simulation nicht berechnet, da die Ribose in einer Nord-Konformation vorliegt, während die Base eine *syn*-Orientierung einnimmt ( $\chi = 45^\circ$ ,  $\phi = 60^\circ$ , Abbildung 5-6 g). Die übrigen Freiheitsgrade zeigen keine Korrelationen (Abbildung 5-6 h, i).

Entsprechend der MD-Simulation wird die Ribose von 3dU (Abbildung 5-6 d) zwar flexibel, jedoch deutlich rigider berechnet als bei den Nucleosiden 2dU<sup>39</sup> und ddU (vgl. Kapitel 5.2). Die erhöhte Rigidität der Ribose in 3dU beeinflusst die Orientierung der Base und der exocyclischen Gruppe, die ebenfalls deutlich an Flexibilität verlieren (Abbildung 5-6 e, f), so dass 3dU insgesamt ein deutlich rigideres Nucleosid ist.

Da die Gesamtkonformation durch insgesamt drei Freiheitsgrade definiert ist, die jeweils zwei bzw. drei Populationsmaxima aufweisen, sind 18 verschiedene Konformationen möglich. Hiervon sind allerdings lediglich zwei Konformationen in bedeutendem Maße populiert, die sich nur durch die Orientierung der exocyclischen Gruppe unterscheiden. 3dU liegt zu 45% in einer *anti/gg*/Nord-Konformation vor. Die *anti/gt*/Nord-Konformation ist etwa zu 38% populiert mit einer Differenz in der freien Enthalpie von  $\Delta G = 0.39$  kJ/mol. Die drittmächtigste Population weist eine *syn/gg*/Nord-Konformation auf und ist nur noch zu 3% besetzt ( $\Delta G = 6.43$  kJ/mol).



**Abbildung 5-6:** Ergebnisse einer MD-Simulation von 3'-Desoxyuridin (3dU) unter Verwendung des AMBER91-Kraftfelds und zusätzlicher NMR-Randbedingungen. Populationsverteilungen [%] des a) Pseudorotationsparameters  $\phi$  der Ribose, b) Torsionswinkels  $\gamma$  der exocyclischen Gruppe c) Torsionswinkels  $\chi$  der Base. Trajektorien des d) Pseudorotationsparameters  $\phi$ , e) Torsionswinkels  $\gamma$  und f) Torsionswinkels  $\chi$ . Konturdiagramme der Populationsdichten der Freiheitsgrade g)  $\chi$  und  $\phi$ , h)  $\chi$  und  $\gamma$  und i)  $\gamma$  und  $\phi$ .

**Tabelle 5-1:** Ergebnisse einer MD-Simulation mit dem AMBER91-Kraftfeld und NMR-Randbedingungen von 3dU bei 300 K über einen Zeitraum von 20 ns.

| 3dU                   |            |                     |
|-----------------------|------------|---------------------|
|                       | Population | $\Delta G$ [kJ/mol] |
| $X_N(\phi)$           | 0.94       | 0.00                |
| $X_S(\phi)$           | 0.06       | 6.89                |
| $X_{gg}(\gamma)$      | 0.54       | 0.00                |
| $X_{gt}(\gamma)$      | 0.42       | 0.62                |
| $X_{tg}(\gamma)$      | 0.03       | 6.40                |
| $X_{syn}(\chi)$       | 0.04       | 7.60                |
| $X_{anti}(\chi)$      | 0.93       | 0.00                |
| $X_{high-anti}(\chi)$ | 0.02       | 8.91                |
| $\phi(N)$ [°]         | -73.0      |                     |
| $q(N)$ [Å]            | 0.377      |                     |
| $\phi(S)$ [°]         | 90.2       |                     |
| $q(S)$ [Å]            | 0.340      |                     |

### 5.1.2. Vergleich theoretischer und experimenteller NMR-Daten

Da die MD-Simulation mit dem molekülmechanischen AMBER91-Kraftfeld in ihrem Ansatz viele Vereinfachungen und Näherungen enthält, war es erforderlich, makroskopische Größen zu berechnen und diese mit experimentellen Daten zu vergleichen. Aus der MD-Simulation wurden daher Torsionswinkel generiert und in NMR-Kopplungskonstanten umgerechnet. Ein Vergleich der experimentellen und theoretisch ermittelten Daten (Tabelle 5-2) zeigt eine sehr befriedigende Übereinstimmung und belegt somit, dass die Konformation der Ribose und die Orientierung der Base korrekt berechnet wurden.

**Tabelle 5-2:** Experimentelle<sup>123</sup> und berechnete Kopplungskonstanten von 3dU.

|                  | 3dU [Hz]               |                    |
|------------------|------------------------|--------------------|
|                  | exp. <sup>a),123</sup> | ber. <sup>b)</sup> |
| $^3J_{H1',H2'}$  | 1.5                    | 1.9                |
| $^3J_{H2',H3'R}$ | 5.3                    | 5.1                |
| $^3J_{H2',H3'S}$ | 2.5                    | 2.0                |
| $^3J_{H3'R,H4'}$ | 9.8                    | 10.6               |
| $^3J_{H3'S,H4'}$ | 6.3                    | 5.3                |
| $^3J_{H4',H5'R}$ | 4.6                    | 5.2                |
| $^3J_{H4',H5'S}$ | 2.9                    | 3.3                |

<sup>a)</sup> in D<sub>2</sub>O bei 300 K

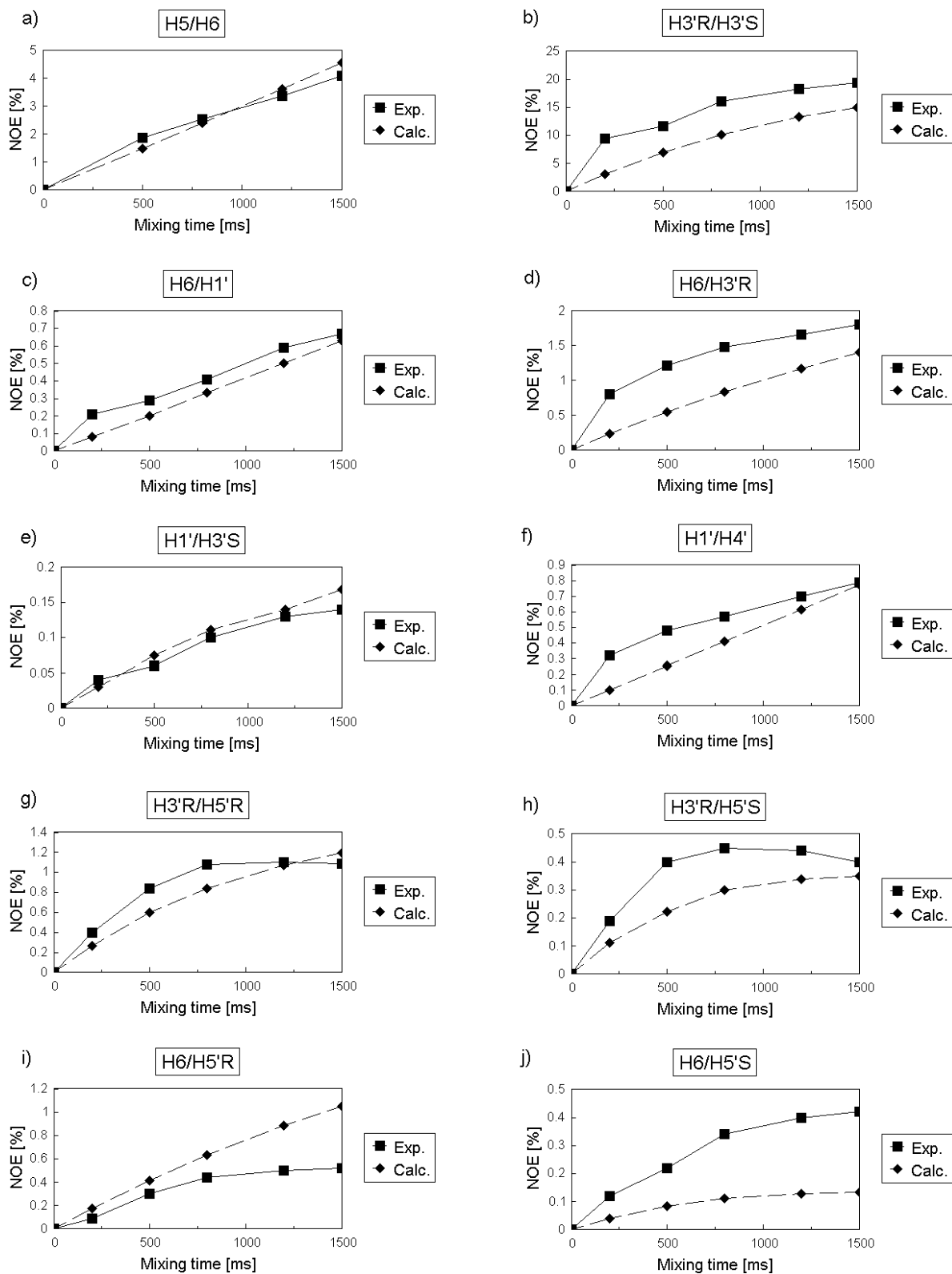
<sup>b)</sup> mit Karplus-Beziehung<sup>76</sup>

## 5. Konformation modifizierter Nucleoside

---

Um auch die übrigen Molekülparameter mit den experimentell ermittelten Werten zu vergleichen, wurde eine weitere makroskopische Größe aus der MD-Simulation berechnet. Zur Überprüfung der Ergebnisse der MD-Simulation wurden aus Protonenabständen NOE-Aufbaukurven berechnet und mit experimentell bestimmten einer anderen Arbeit<sup>123</sup> verglichen (Abbildung 5-7). Anhand der NOEs H5/H6 und H3'R/H3'S (Abbildung 5-7 a, b), die während der Simulationszeit weitgehend konstante Abstände aufweisen, wurde die Korrelationszeit des Moleküls festgelegt, mit der alle NOEs berechnet wurden. Nicht jeder NOE besitzt die gleiche Aussagekraft, da sich nur bestimmte NOEs bei einem Konformationswechsel entscheidend verändern. Die NOEs H6/H1' und H6/H3'R (Abbildung 5-7 c, d, Tabelle 5-3) sind gute Indikatoren für die Orientierung der Base zur Ribose und verdeutlichen die Richtigkeit der MD-Simulation in diesem Punkt. Jedoch deutet die Abweichung des NOE H6/H2' (Tabelle 5-3) auf eine stärkere *high-anti* Population der Base hin, als sie durch die MD-Simulation berechnet wurde. Der NOE H1'/H3'S ist sensitiv für die Quantität der Nord- und Süd-Populationen des Furanoserings, wohingegen H1'/H4' zur Überprüfung der Lage des Populationsmaximums verwendet wurde (Abbildung 5-7 e, f, Tabelle 5-3). Beide zeigen gute Übereinstimmung. Auch die Orientierung der exocyclischen Gruppe ist gut simuliert worden, was an den NOEs H3'R/H5'R und H3'S/H5'S (Abbildung 5-7 g, h, Tabelle 5-3) deutlich wird. Die NOEs H4'/H5'R+S (Tabelle 5-3) zeigen zwar größere Abweichungen, sind für die Überprüfung des Rotamerengleichgewichts aber ohnehin weniger aussagekräftig, da skalare Kopplungen bei kurzen Mischzeiten die Resultate verfälschen können. Größere Diskrepanzen treten zwischen den experimentellen und berechneten NOEs H6/H5'R und H5/H6'S auf (Abbildung 5-7 i, j, Tabelle 5-3). Sie deuten auf eine falsche Korrelation der Base und der exocyclischen Gruppe hin, so dass keine Aussagen diesbezüglich getroffen wurden. Insgesamt zeigen die NOE-Aufbaukurven jedoch sehr gute Übereinstimmungen.





**Abbildung 5-7:** Experimentelle (Exp.) und aus der MD-Simulation erhaltene (Calc.) NOE-Aufbaukurven von 3'-Desoxyuridin (3dU).

## 5. Konformation modifizierter Nucleoside

**Tabelle 5-3:** Arithmetisch gemittelte Abweichungen der experimentellen von den berechneten NOEs ( $\Delta\text{NOE}$ ), über die MD-Zeit gemittelte Protonenabstände ( $\langle d_{\text{Calc}} \rangle$ ) und in Näherung berechnete Fehler der MD-Simulation von 3dU bei 300 K ( $\Delta\langle d \rangle$ ).

| Name      | $\Delta\text{NOE}$ [%] | $\langle d_{\text{Calc}} \rangle$ [Å] | $\Delta\langle d \rangle$ [Å] |
|-----------|------------------------|---------------------------------------|-------------------------------|
| H5/H6     | 4.0                    | 2.39                                  | -0.02                         |
| H6/H1'    | 22.9                   | 3.55                                  | -0.12                         |
| H6/H2'    | 145.7                  | 3.73                                  | -0.60                         |
| H6/H3'R   | 66.5                   | 3.11                                  | -0.28                         |
| H6/H5'R   | -38.0                  | 3.78                                  | 0.29                          |
| H6/H5'S   | 198.6                  | 4.12                                  | -0.82                         |
| H1'/H2'   | 6.3                    | 2.83                                  | -0.03                         |
| H1'/H3'S  | -13.3                  | 4.00                                  | 0.09                          |
| H1'/H4'   | 35.7                   | 3.26                                  | -0.17                         |
| H2'/H3'R  | -3.8                   | 2.38                                  | 0.02                          |
| H2'/H3'S  | 2.9                    | 2.72                                  | -0.01                         |
| H3'R/H3'S | 48.3                   | 1.79                                  | -0.12                         |
| H3'R/H4'  | -0.9                   | 3.02                                  | -0.00                         |
| H3'R/H5'R | 15.8                   | 2.81                                  | -0.07                         |
| H3'R/H5'S | 43.6                   | 3.33                                  | -0.21                         |
| H3'S/H4'  | 12.6                   | 2.39                                  | -0.05                         |
| H3'S/H5'R | 13.7                   | 3.50                                  | -0.08                         |
| H4'/H5'R  | 105.6                  | 2.70                                  | -0.34                         |
| H4'/H5'S  | 34.3                   | 2.48                                  | -0.12                         |
| H5'R/H5'S | 51.3                   | 1.77                                  | -0.13                         |

## 5.2. 2',3'-Didesoxyuridin (ddU)

### 5.2.1. Ergebnisse einer MD-Simulation

Auf Grund der Modifikationen in der Ribose war es nicht möglich ddU zufriedenstellend mit dem nativen AMBER91-Kraftfeld zu berechnen. Deshalb wurden NMR-Randbedingungen erstellt und während der MD-Simulation dem Molekül auferlegt.

Zu Beginn dieses Kapitels wurde dargelegt, dass der *gauche*-Effekt maßgeblich die Konformation des Riboserings bestimmt. Auf Grund der fehlenden Hydroxylgruppen sind keine *gauche*-Effekte bezüglich der Ribose vorhanden. Daher wurde eine Änderung im konformativen Verhalten der Ribose gegenüber 3dU erwartet. Tatsächlich berechnete die MD-Simulation auch ein verändertes Gleichgewicht zwischen Nord- ( $\phi = -72.6^\circ$ ) und Süd-Konformationen ( $\phi = 80.2^\circ$ ) der Ribose mit einer Dominanz der Nord-Konformere (Abbildung 5-8 a, Tabelle 5-4). Der Wechsel zwischen Nord- und Süd-Konformationen erfolgt ausschließlich über den östlichen Pfad ( $\phi = 0^\circ$ ), bei dem die Base und exocyclische Gruppe einen vergrößerten Abstand aufweisen.

Laut Rechnung nimmt die exocyclische Gruppe, sehr ähnlich wie bei 3dU, bevorzugt beide möglichen *gauche*-Orientierungen ein ( $\gamma = 60^\circ, \gamma = 180^\circ$ , Abbildung 5-8 b, Tabelle 5-4). Die Modifikationen im Ribosering haben offensichtlich keinen entscheidenden Einfluss auf die Populationsverteilung der exocyclischen Gruppe.

Die MD-Simulation berechnet ein Gleichgewicht von *syn*- ( $\chi = 45^\circ$ ), *anti*- ( $\chi = 45^\circ$ ) und *high-anti*-Orientierungen ( $\chi = 45^\circ$ ) der Base (Abbildung 5-8 c, Tabelle 5-4) mit einer deutlichen Präferenz zur *anti*-Orientierung. Allerdings hat die Population der *high-anti*-Orientierung im Vergleich zu 3dU und 2dU<sup>39</sup> deutlich zugenommen. Der Übergang zwischen *syn*- und *anti*-Orientierungen findet stets über den *high-anti*-Pfad statt, wobei die Ribose bevorzugt in der Nord-Konformation vorliegt (Nord : Süd = 2 : 1).

Laut Rechnung sind sämtliche Freiheitsgrade untereinander korreliert. Wie bei 3dU wird die Ribosekonformation von ddU durch die Orientierung der Base beeinflusst: In der *high-anti*-Orientierung der Base bevorzugt die Ribose eine westliche Konformation mit einer pseudoaxialen Position der Base ( $\chi = -60^\circ, \phi = -120^\circ$ , Abbildung 5-8 g). In der *syn*-Orientierung verschiebt sich das Populationsmaximum der Ribose in Richtung Osten und die Base wechselt in eine

## 5. Konformation modifizierter Nucleoside

---

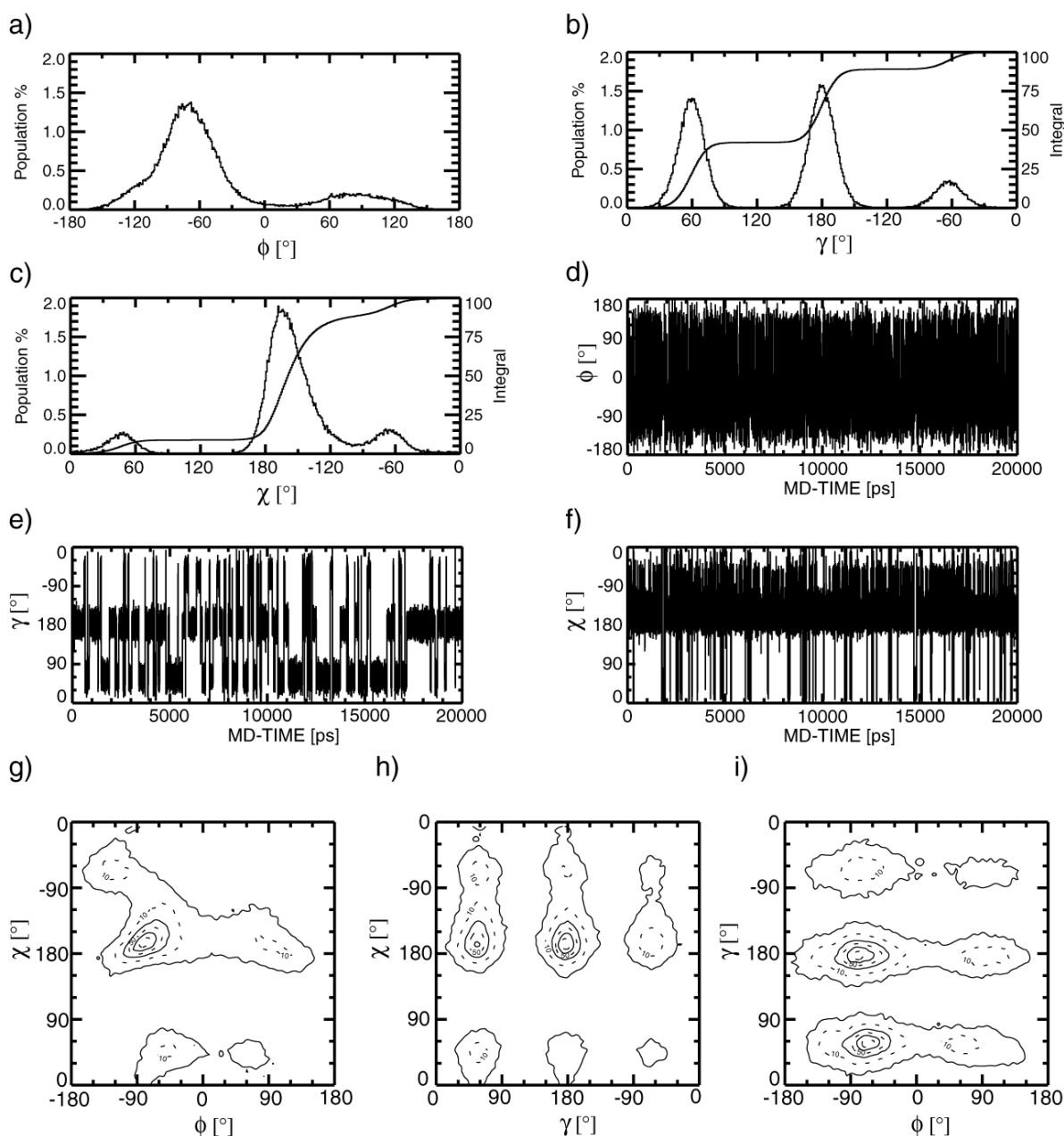
pseudoäquatoriale Position ( $\chi = 45^\circ$ ,  $\phi = \pm 60^\circ$ , Abbildung 5-8 g). Es existiert also eine *syn*/Ost- und einer *high-anti*/West-Korrelation. Andererseits beeinflusst aber auch die Konformation der Ribose die Orientierung der Base: Im Vergleich zu 3dU sind die Süd-Konformationen von ddU etwas stärker, im Vergleich zu 2dU<sup>39</sup> sind sie weniger stark populiert. Entsprechend dieser Populationsänderung der Süd-Konformationen verändert sich auch die Besetzung der *syn*-Orientierungen. In 2dU sind die *syn*-Orientierungen stärker besetzt als in ddU, in 3dU sind sie weniger stark besetzt.

Des Weiteren wird ein leichter Einfluss der exocyclischen Gruppe auf die Konformation des Furanoserings berechnet (Abbildung 5-8 h). Wenn die exocyclische Gruppe eine *gg*-Konformation ( $\gamma = +60^\circ$ ) einnimmt, verschiebt sich das Populationsmaximum der Ribosekonformation leicht in östliche Richtung ( $\phi = \pm 60^\circ$ ). D.h. bei dieser Orientierung begibt sich die exocyclischen Gruppe eher in eine pseudoäquatoriale Position, es existiert also eine *gg*/Ost-Korrelation. Während der *gt*- ( $\gamma = -60^\circ$ ) oder *tg*-Orientierung ( $\gamma = 180^\circ$ ) werden etwas westlichere Nord- und Süd-Konformationen eingenommen mit Populationsmaxima bei  $\phi = \pm 90^\circ$  (Abbildung 5-8 i).

Eine dritte Korrelation wurde zwischen der Orientierungen der exocyclischen Gruppe und der Base von ddU berechnet: Die Population der *gg*-Rotamere der exocyclischen Gruppe ist höher als die durchschnittliche Rotamerenverteilung, wenn sich die Base in *syn*-Orientierung befindet ( $\gamma = 60^\circ$ ,  $\chi = 45^\circ$ , Abbildung 5-8 h). Es ist also eine leichte *syn/gg*-Korrelation vorhanden.

Auf Grund der fehlenden Substituenten an den Kohlenstoffatomen C2' und C3' sind die Rotationsbarrieren der beteiligten Bindungen deutlich abgesenkt, so dass eine erhöhte Flexibilität der Ribose berechnet wird (Abbildung 5-8 d). Wie bei 3dU festgestellt wurde, beeinflusst die Flexibilität der Ribose ebenfalls die Rotationsbarrieren der exocyclischen Gruppe und der Base. Die Trajektorien (Abbildung 5-8 e, f) der Torsionswinkel dieser beiden Gruppen zeigen ein deutlich flexibleres Verhalten, so dass ddU insgesamt ein sehr flexibles und "weiches" Nucleosid ist, wodurch kleine Effekte und schwache Korrelationen besonders gut identifiziert werden konnten.

Laut Rechnung ist die *anti/gt*/Nord-Konformation zu 32% der Zeit und damit am häufigsten populiert. Die *anti/gg*/Nord-Konformation liegt um  $\Delta G = 0.63$  kJ/mol höher und ist zu 25% der Zeit besetzt. Am dritthäufigsten ist die *anti/tg*/Nord-Konformation populiert (8%) und ist energetisch bereits deutlich ungünstiger als der Grundzustand ( $\Delta G = 3.60$  kJ/mol).



**Abbildung 5-8:** Ergebnisse einer MD-Simulation von 2',3'-Dideoxyuridin (ddU) unter Verwendung des AMBER91-Kraftfelds und zusätzlicher NMR-Randbedingungen. Populationsverteilungen [%] des a) Pseudorotationsparameters  $\phi$  der Ribose, b) Torsionswinkels  $\gamma$  der exocyclischen Gruppe c) Torsionswinkels  $\chi$  der Base. Trajektorien des d) Pseudorotationsparameters  $\phi$ , e) Torsionswinkels  $\gamma$  und f) Torsionswinkels  $\chi$ . Konturdiagramme der Populationen der Freiheitsgrade g)  $\chi$  und  $\phi$ , h)  $\chi$  und  $\gamma$  und i)  $\gamma$  und  $\phi$ .

## 5. Konformation modifizierter Nucleoside

---

**Tabelle 5-4:** Ergebnisse einer MD-Simulation mit dem AMBER91-Kraftfeld und NMR-Randbedingungen von ddU bei 300 K über einen Zeitraum von 20 ns.

|                       | ddU        |                     |
|-----------------------|------------|---------------------|
|                       | Population | $\Delta G$ [kJ/mol] |
| $X_N(\phi)$           | 0.83       | 0.00                |
| $X_S(\phi)$           | 0.17       | 3.96                |
| $X_{gg}(\gamma)$      | 0.42       | 0.28                |
| $X_{gt}(\gamma)$      | 0.47       | 0.00                |
| $X_{tg}(\gamma)$      | 0.11       | 3.64                |
| $X_{syn}(\chi)$       | 0.09       | 5.57                |
| $X_{anti}(\chi)$      | 0.80       | 0.00                |
| $X_{high-anti}(\chi)$ | 0.11       | 4.96                |
| $\phi(N)$ [°]         | -72.6      |                     |
| $q(N)$ [Å]            | 0.368      |                     |
| $\phi(S)$ [°]         | 80.2       |                     |
| $q(S)$ [Å]            | 0.346      |                     |

### 5.2.2. Vergleich theoretischer und experimenteller NMR-Daten

Alle H,H-Torsionswinkel wurden in Kopplungskonstanten umgeformt und über die MD-Zeit gemittelt. Wie im Fall von 3dU eignen sie sich zur Überprüfung der Ribosekonformation und der Orientierung der exocyclischen Gruppe. Innerhalb der Abweichungen, die vermutlich in der Parametrisierung der Karplus-Beziehung begründet liegen, sind sehr gute Übereinstimmungen zwischen den experimentellen und theoretisch ermittelten Kopplungskonstanten erzielt worden, so dass von einem korrekten dynamischen Verhalten dieser beiden Freiheitsgrade ausgegangen werden kann.

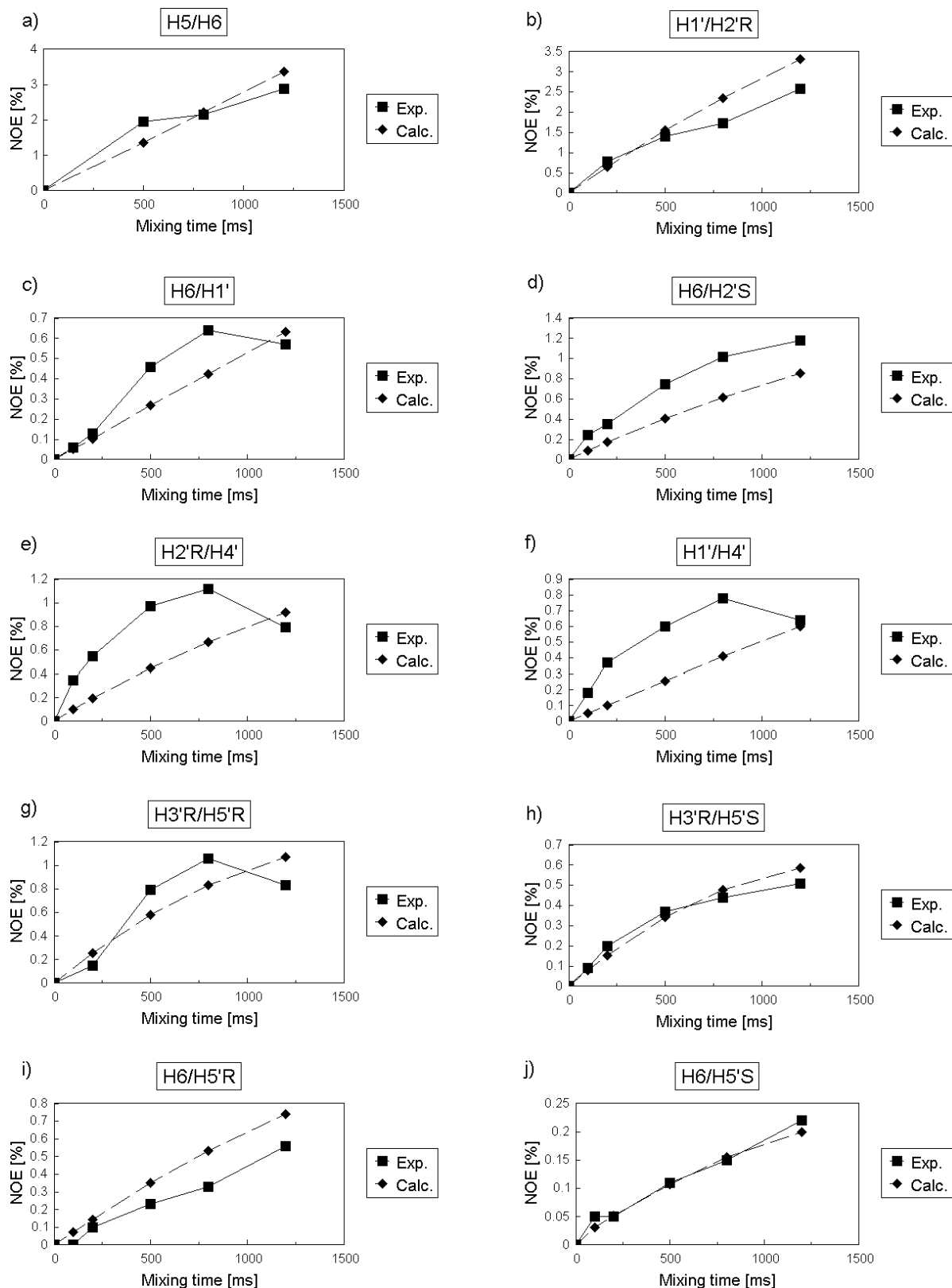
**Tabelle 5-5:** Experimentelle<sup>123</sup> und berechnete Kopplungskonstanten von ddU.

|                                     | ddU [Hz]               |                    |
|-------------------------------------|------------------------|--------------------|
|                                     | exp. <sup>a),123</sup> | ber. <sup>b)</sup> |
| <sup>3</sup> J <sub>H1',H2'S</sub>  | 3.2                    | 3.9                |
| <sup>3</sup> J <sub>H1',H2'R</sub>  | 7.0                    | 7.6                |
| <sup>3</sup> J <sub>H2'S,H3'R</sub> | 8.4                    | 8.3                |
| <sup>3</sup> J <sub>H2'S,H3'S</sub> | 3.5                    | 2.3                |
| <sup>3</sup> J <sub>H2'R,H3'R</sub> | 10.0                   | 10.6               |
| <sup>3</sup> J <sub>H2'R,H3'S</sub> | 8.4                    | 8.6                |
| <sup>3</sup> J <sub>H3'R,H4'</sub>  | 9.0                    | 9.3                |
| <sup>3</sup> J <sub>H3'S,H4'</sub>  | 6.0                    | 5.9                |
| <sup>3</sup> J <sub>H4',H5'R</sub>  | 5.2                    | 5.9                |
| <sup>3</sup> J <sub>H4',H5'S</sub>  | 3.2                    | 3.9                |

<sup>a)</sup> in D<sub>2</sub>O bei 300 K

<sup>b)</sup> mit Karplus-Beziehung<sup>76</sup>

Die Kreuzrelaxationsraten der in einer anderen Arbeit<sup>123</sup> bestimmten NOESY-Spektren zeigen entsprechend der Relaxationsgeschwindigkeit der Protonen einen Abfall bei Mischzeiten von etwa einer Sekunde. Insbesondere diejenigen NOEs, die Protonen des Furanoserings beinhalten, zeigen dieses Verhalten. Diese unterschiedlichen Relaxationsgeschwindigkeiten könnten auf eine unterschiedliche Flexibilität der verschiedenen Molekülteile zurückzuführen sein. Ähnliche Effekte wurden bei Dinucleotiden beobachtet.<sup>131</sup> Beim Relaxationsmatrixverfahren zur Berechnung der NOE-Aufbaukurven wird jedoch mit Ausnahme der Hydroxymethylgruppe von einer isotropen Molekülbewegung und somit von einer einheitlichen Korrelationszeit ausgegangen. Dieses könnte in dem Fall des sehr flexiblen Nucleosids nicht ganz korrekt sein, so dass die NOE-Aufbaukurven kritisch betrachtet werden müssen. Dennoch deuten sie auf eine korrekte MD-Simulation hin (Abbildung 5-9, Tabelle 5-6).



**Abbildung 5-9:** Experimentelle (Exp.) und aus der MD-Simulation erhaltene (Calc.) NOE-Aufbaukurven von 2',3'-Didesoxyuridin (ddU).



**Tabelle 5-6:** Arithmetisch gemittelte Abweichungen der experimentellen von den berechneten NOEs ( $\Delta\text{NOE}$ ), über die MD-Zeit gemittelte Protonenabstände ( $\langle d_{\text{Calc}} \rangle$ ) und in Näherung berechnete Fehler der MD-Simulation von 3dU bei 300 K ( $\Delta\langle d \rangle$ ).

| Name           | $\Delta\text{NOE}$ [%] | $\langle d_{\text{Calc}} \rangle$ [Å] <sup>a)</sup> | $\Delta\langle d \rangle$ [Å] |
|----------------|------------------------|-----------------------------------------------------|-------------------------------|
| H5/H6          | 8.39                   | 2.38                                                | -0.03                         |
| H6/H1'         | 35.02                  | 3.46                                                | -0.18                         |
| H6/H2'S        | 72.39                  | 3.44                                                | -0.33                         |
| H6/H3'R        | 28.59                  | 3.35                                                | -0.14                         |
| H6/H5'R        | -31.92                 | 3.92                                                | 0.24                          |
| H6/H5'S        | 1.72                   | 4.30                                                | -0.01                         |
| H1'/H2'R       | -9.62                  | 2.30                                                | 0.04                          |
| H1'/H2'S+H3'S  | 132.26                 | 3.10                                                | -0.47                         |
| H1'/H3'R       | 34.64                  | 3.83                                                | -0.19                         |
| H1'/H4'        | 122.64                 | 3.23                                                | -0.46                         |
| H2'R/H4'       | 121.89                 | 2.99                                                | -0.42                         |
| H2'R/H2'S+H3'S | 49.55                  | 1.94                                                | -0.13                         |
| H2'S+H3'S/H3'R | 83.65                  | 1.95                                                | -0.21                         |
| H3'R/H5'R      | 0.02                   | 2.81                                                | -0.00                         |
| H3'R/H5'S      | 4.23                   | 3.15                                                | -0.02                         |
| H3'S/H4'       | 49.36                  | 2.36                                                | -0.16                         |
| H3'S/H5'R      | 154.46                 | 3.35                                                | -0.56                         |
| H3'S/H5'S      | 158.82                 | 3.47                                                | -0.60                         |
| H4'/H5'R       | 106.54                 | 2.72                                                | -0.35                         |
| H4'/H5'S       | 155.03                 | 2.51                                                | -0.42                         |
| H5'R/H5'S      | 100.08                 | 1.77                                                | -0.22                         |

<sup>a)</sup> bei Signalüberlagerungen wurde der kürzeste Abstand der beteiligten Protonen verwendet.

### 5.3. 2'-Desoxy-2'-fluorouridin (2fU)

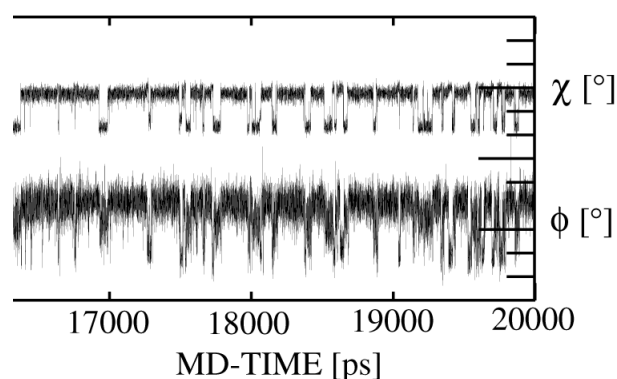
#### 5.3.1. Ergebnisse einer MD-Simulation

2fU wurde analog zu 3dU und ddU (Kapitel 5.1 und 5.2) mit AMBER 91 und NMR-Randbedingungen moleküldynamisch simuliert. Im Verlauf dieser Arbeit zeigte sich, dass die Rotamerenverteilung der exocyclischen Gruppe besser beschrieben wird, indem ihre potenzielle Energie über Randbedingungen angepasst wird, anstatt die Kopplungskonstanten  $^3J_{H4',H5'R}$  und  $^3J_{H4',H5'S}$  mit hohen Kraftkonstanten zu versehen. Hierbei wurde die gg- und die gt-Konformation gezielt abgesenkt, wodurch die Eigenschaften der Hydroxymethylgruppe besser wiedergegeben werden. Die MD-Rechnung deckte Probleme bei der Parametrisierung der Karplus-Beziehung auf (s.u.), so dass bei 2fU größeres Augenmerk auf die Übereinstimmung der experimentellen und berechneten NOE-Aufbaukurven gelegt und ein etwas größerer Fehler bei den Kopplungskonstanten hingenommen wurde.

Zu Beginn dieses Kapitels wurde auf die lineare Abhängigkeit zwischen *gauche*-Effekt und Elektronegativität des Substituenten in der Ribose hingewiesen. Entsprechend dieses Effekts wird durch die MD-Simulation eine strenge Bevorzugung der pseudoaxialen Position des Fluoratoms berechnet. Dadurch liegt der Furanosering praktisch nur in der Nord-Konformation vor mit einem Populationsmaximum bei  $\phi = -69.4^\circ$  (Abbildung 5-11 a, Tabelle 5-7). Unter Beibehaltung der Nord-Konformation sind leichte Konformationsänderungen jedoch durchaus möglich. Genau genommen besitzt der Furanosering drei Populationsmaxima in der C3'-endo/C4'-exo- ( $\phi = -60^\circ$ ), C3'-endo- ( $\phi = -80^\circ$ ) und C2'-exo-Konformation ( $\phi = -120^\circ$ ) (Abbildung 5-11 g). Sie liegen im Pseudorotationscyclus dicht beisammen, ähneln sich also stark. Unterschiede weisen sie jedoch in der Stellung der exocyclischen Gruppe auf. Während in der C3'-endo Konformation die exocyclische Gruppe vergleichsweise pseudoäquatorial steht, nimmt sie in den anderen beiden Konformationen eine eher pseudoaxiale Stellung ein.

Die Base besitzt laut Rechnung zwei Populationsmaxima in der *anti*- und *high-anti*-Orientierung (Abbildung 5-11 c, Tabelle 5-7), die beide sehr scharf umrissen sind. Eine Orientierung bei  $\chi = -120^\circ$  wird eher vermieden (Abbildung 5-11 c). Die Orientierung der Base ist stark mit der Ribosekonformation korreliert (Abbildung 5-11 g). Wenn die Base eine *anti*-Orientierung einnimmt, bevorzugt die Ribose eine C3'-endo-Konformation. In der *high-anti*-

Orientierung der Base hingegen favorisiert die Ribose entweder eine C3'-*endo*/C4'-*exo*- oder eine C2'-*exo*-Konformation. Dass die Orientierung der Base stark mit der Konformation der Ribose korreliert, wird anhand eines Ausschnitts aus den Trajektorien von  $\phi$  und  $\chi$  (Abbildung 5-10) besonders deutlich. Die Freiheitsgrade ändern sich stets zeitgleich, zeigen also immer synchrone Konformationswechsel.

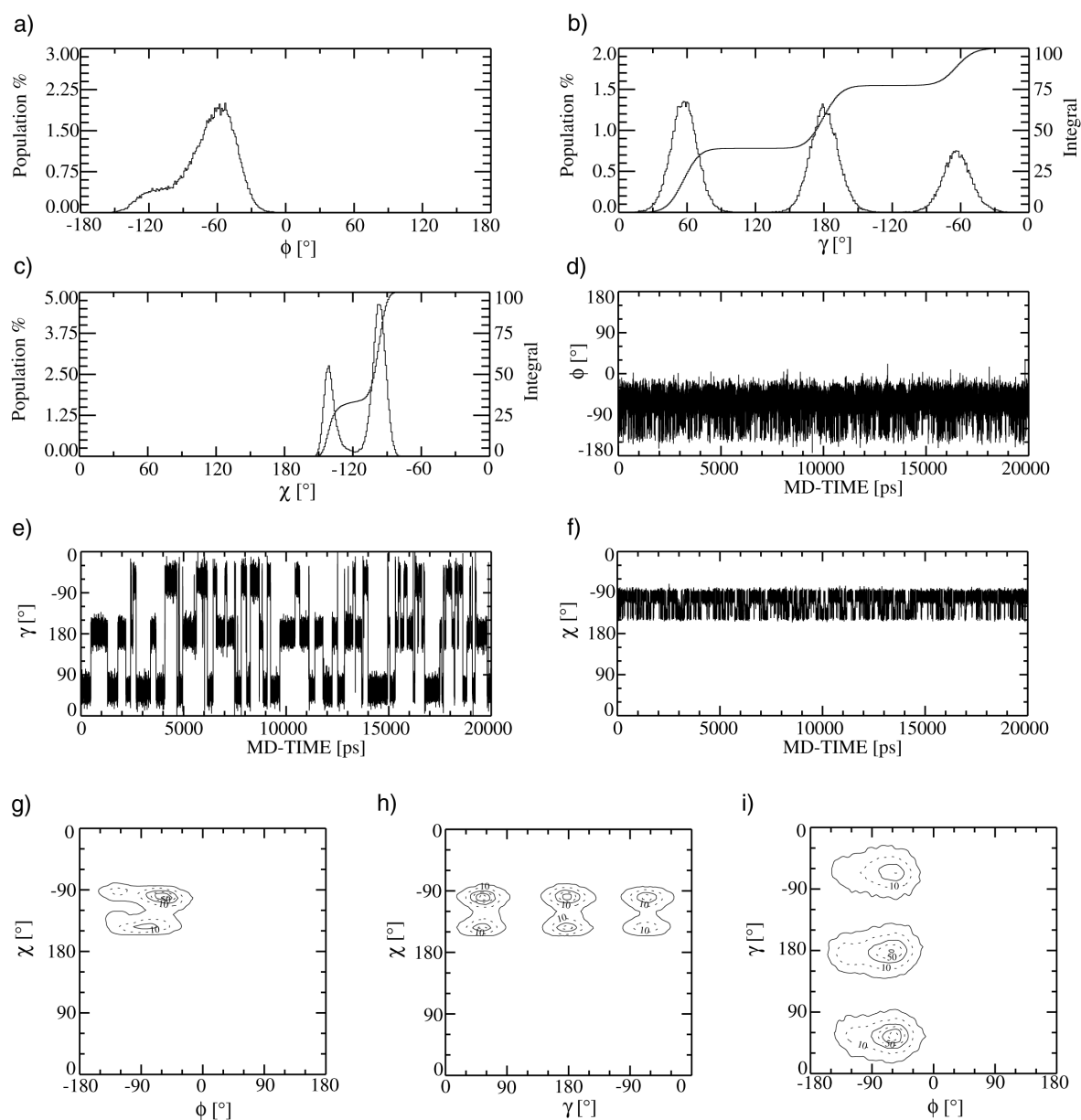


**Abbildung 5-10:** Ausschnitt aus den Trajektorien der Freiheitsgrade  $\phi$  und  $\chi$  von 2fU.

Die MD-Simulation berechnet ein Gleichgewicht der exocyclischen Gruppe mit allen drei möglichen gestaffelten Rotameren (Abbildung 5-11 b, Tabelle 5-7), von denen die beiden *gauche*-Konformere wie bei den anderen beiden Nucleosiden klar bevorzugt sind. Die Orientierung der exocyclischen Gruppe beeinflusst nicht das konformative Verhalten der übrigen Freiheitsgrade, so dass keine Korrelationen auftreten (Abbildung 5-11 h, i).

Durch die etwas andere Art der NMR-Randbedingungen lässt sich die Flexibilität von 2fU nicht direkt mit der von 3dU und ddU vergleichen. Jedoch zeigen die Trajektorien der MD-Simulation eindeutig, dass die Ribose und die Base vergleichsweise rigide sind (vgl. Abbildung 5-11 d, f).

Das gesamte Nucleosid 2fU nimmt laut MD-Simulation praktisch nur drei unterschiedliche Konformationen ein, die lediglich durch eine veränderte Orientierung der exocyclischen Gruppe charakterisiert sind. Die *anti/gg*/Nord-Konformation ist mit 39% am stärksten besetzt, gefolgt von der *anti/gt*/Nord- mit 38% und der *anti/tg*/Nord-Konformation mit 22%.



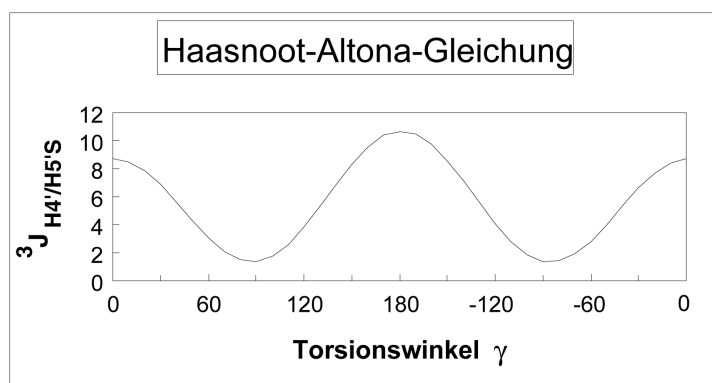
**Abbildung 5-11:** Ergebnisse einer MD-Simulation von 2'-Desoxy-2'-fluorouridin (2fU) unter Verwendung des AMBER91-Kraftfelds und zusätzlicher NMR-Randbedingungen. Populationsverteilungen [%] des a) Pseudorotationsparameters  $\phi$  der Ribose, b) Torsionswinkels  $\gamma$  der exocyclischen Gruppe c) Torsionswinkels  $\chi$  der Base. Trajektorien des d) Pseudorotationsparameters  $\phi$ , e) Torsionswinkels  $\gamma$  und f) Torsionswinkels  $\chi$ . Konturdiagramme der Populationen der Freiheitsgrade g)  $\chi$  und  $\phi$ , h)  $\chi$  und  $\gamma$  und i)  $\gamma$  und  $\phi$ .

**Tabelle 5-7:** Ergebnisse einer MD-Simulation mit dem AMBER91-Kraftfeld und NMR-Randbedingungen von 2fU bei 300 K über einen Zeitraum von 20 ns.

|                       | 2fU        |                     |
|-----------------------|------------|---------------------|
|                       | Population | $\Delta G$ [kJ/mol] |
| $X_N(\phi)$           | 1.00       | 0.00                |
| $X_S(\phi)$           | 0.00       | 22.13               |
| $X_{gg}(\gamma)$      | 0.39       | 0.00                |
| $X_{gt}(\gamma)$      | 0.38       | 0.05                |
| $X_{tg}(\gamma)$      | 0.23       | 1.36                |
| $X_{syn}(\chi)$       | 0.00       | 27.72               |
| $X_{anti}(\chi)$      | 0.33       | 0.00                |
| $X_{high-anti}(\chi)$ | 0.67       | 1.78                |
| $\phi(N)$ [°]         | -69.4      |                     |
| $q(N)$ [Å]            | 0.363      |                     |
| $\phi(S)$ [°]         | -          |                     |
| $q(S)$ [Å]            | -          |                     |

### 5.3.2. Vergleich theoretischer und experimenteller NMR-Daten

Die vergleichende Betrachtung zwischen den experimentell ermittelten und aus der MD-Simulation berechneten vicinalen Kopplungskonstanten für 2fU zeigt im hohen Maße Übereinstimmung. Größere Abweichungen treten lediglich bei Protonen der exocyclischen Gruppe vor allem bei  $^3J_{H4',H5'S}$  auf (Tabelle 5-5). Diese sehr kleine Kopplung von 2.4 Hz ist laut Karplus-Beziehung nur bei einem Torsionswinkel nahe von  $90^\circ$  oder  $-90^\circ$  möglich (Abbildung 5-12), und wäre nur zu realisieren, wenn die beteiligten Substituenten in einer nicht optimal gestaffelten Orientierung stünden. Aus chemischer Sicht ist dieses sicherlich zu bezweifeln, so dass die Qualität der Parameter der Karplus-Beziehung eher in Frage gestellt werden muss, als die Güte der MD-Simulation.



**Abbildung 5-12:** Karplus-Beziehung für  $^3J_{H4',H5'S}$  nach *Altona et al.*<sup>76</sup>

Für 2fU wurden heteronucleare Kopplungskonstanten zwischen H1' und C2 bzw. C6 experimentell bestimmt. Für heteronucleare C,H-Kopplungen der glycosidischen Bindung von Nucleosiden sind speziell zwei Karplus-Beziehungen entwickelt worden,<sup>87,88</sup> die einen Vergleich zwischen experimentellen Daten und der MD-Simulation ermöglichen. Sie liefern sehr unterschiedliche Ergebnisse. Die neuere Karplus-Beziehung<sup>87</sup> berechnet wesentlich kleinere Werte für die Kopplungskonstanten ( $^3J_{H1',C2} = 0.7$  Hz,  $^3J_{H1',C6} = 1.1$  Hz) und widerspricht den experimentellen Befunden. Sie wurde daher nicht weiter verwendet. Die mit der älteren Karplus-Beziehung<sup>88</sup> berechneten Kopplungskonstanten stimmen hingegen gut mit den Ergebnissen der MD-Simulation überein (Tabelle 5-8). Da die experimentellen und theoretisch ermittelten NOE-Aufbaukurven ebenfalls in gutem Einklang sind (Tabelle 5-9), kann davon ausgegangen werden, dass die MD-Simulation die konformativen Eigenschaften von 2fU in Lösung mit hoher Präzision widerspiegelt.

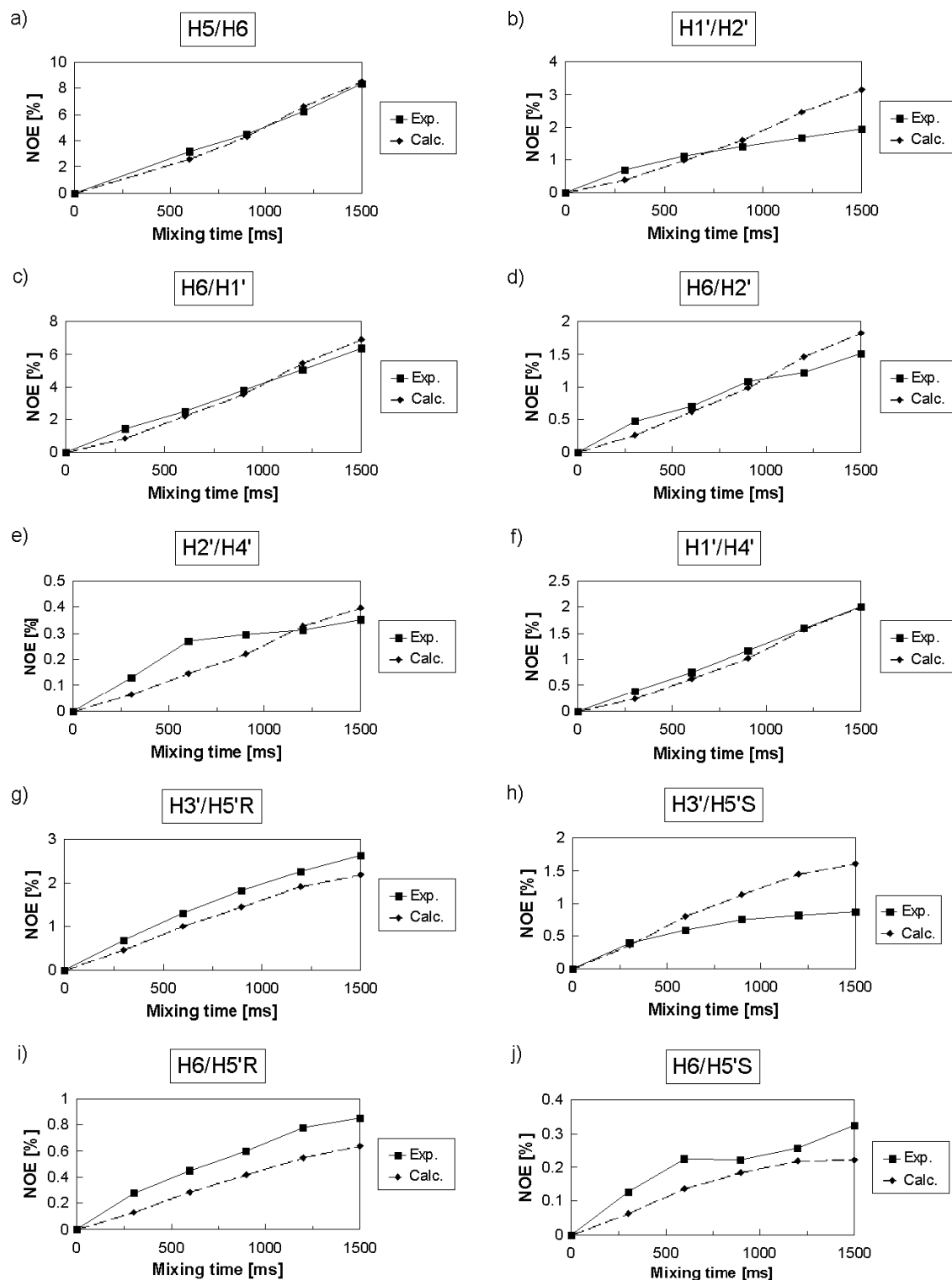
In jüngerer Zeit wurde eine allgemeingültige Karplus-Beziehung für heteronucleare F,H-Kopplungen entwickelt.<sup>89</sup> Sie ähnelt formal der Gleichung von *Altona et al.*<sup>76</sup> und berücksichtigt Lage und Elektronegativität der Substituenten. Zudem fließen C-C-H und C-C-F Bindungswinkel in die Karplus-Beziehung ein. Werden diese jedoch aus der MD-Simulation entnommen, ergeben sich sehr kleine Kopplungskonstanten ( $^3J_{I',F2'} = 8.0$  Hz und  $^3J_{F2',3'} = 14.9$  Hz), die stark von den experimentellen abweichen. Die Verwendung von festen Bindungswinkeln, wie sie beispielsweise AMBER- oder MM2-Parametern entnommen werden können ( $\phi_{CCH} = 109.5^\circ$  bzw.  $\phi_{CCF} = 110.8^\circ$ ), führen hingegen zu vergleichsweise guten Übereinstimmungen mit den experimentellen Daten (Tabelle 5-8).

**Tabelle 5-8:** Durch eigene Experimente ergänzte experimentelle<sup>124</sup> und berechnete Kopplungskonstanten von 2fU.

|                                    | 2fU [Hz]           |                    |
|------------------------------------|--------------------|--------------------|
|                                    | exp. <sup>a)</sup> | ber. <sup>b)</sup> |
| <sup>3</sup> J <sub>H1',H2'</sub>  | 1.5                | 1.4                |
| <sup>3</sup> J <sub>H1',C2</sub>   | 3.8                | 4.1                |
| <sup>3</sup> J <sub>H1',C6</sub>   | 3.9                | 3.5                |
| <sup>3</sup> J <sub>H1',F2'</sub>  | 19.6               | 20.0               |
| <sup>3</sup> J <sub>H2',H3'</sub>  | 4.9                | 4.5                |
| <sup>3</sup> J <sub>F2',H3'</sub>  | 21.3               | 25.7               |
| <sup>3</sup> J <sub>H3',H4'</sub>  | 8.5                | 8.6                |
| <sup>3</sup> J <sub>H4',H5'R</sub> | 4.5                | 5.5                |
| <sup>3</sup> J <sub>H4',H5'S</sub> | 2.4                | 4.6                |

<sup>a)</sup> in D<sub>2</sub>O bei 300 K<sup>b)</sup> mit Karplus-Beziehungen<sup>76,88,89</sup>

Der Vergleich der NOE-Aufbaukurven zeigt eine gute Korrelation der experimentellen und theoretisch ermittelten Daten, da bei der Wahl der NMR-Randbedingungen größeres Augenmerk auf die Richtigkeit der NOE-Aufbaukurven gelegt wurde (Abbildung 5-13, Tabelle 5-9). Eine größere Abweichung ist lediglich zwischen dem NOE H6/H3' (Tabelle 5-9) vorhanden. Vermutlich ist der Anteil an C3'-*endo*-Konformation der Ribose noch größer als es die MD-Simulation berechnete.



**Abbildung 5-13:** Experimentelle (Exp.) und aus der MD-Simulation erhaltene (Calc.) NOE-Aufbaukurven von 2'-Desoxy-2'-fluoruridin (2fU).



**Tabelle 5-9:** Arithmetisch gemittelte Abweichungen der experimentellen von den berechneten NOEs ( $\Delta\text{NOE}$ ), über die MD-Zeit gemittelte Protonenabstände ( $\langle d_{\text{Calc}} \rangle$ ) und in Näherung berechnete Fehler der MD-Simulation von 2fU bei 300 K ( $\Delta\langle d \rangle$ ).

| Name      | $\Delta\text{NOE}$ [%] | $\langle d_{\text{Calc}} \rangle$ [Å] | $\Delta\langle d \rangle$ [Å] |
|-----------|------------------------|---------------------------------------|-------------------------------|
| H5/H6     | 4.7                    | 2.39                                  | -0.02                         |
| H6/H1'    | 1.1                    | 2.78                                  | -0.01                         |
| H6/H2'    | -2.3                   | 3.62                                  | 0.01                          |
| H6/H3'    | 116.2                  | 4.30                                  | -0.59                         |
| H6/H5'R   | 44.4                   | 5.29                                  | -0.33                         |
| H6/H5'S   | 37.1                   | 5.38                                  | -0.29                         |
| H1'/H2'   | -17.8                  | 2.81                                  | 0.09                          |
| H1'/H3'   | 50.8                   | 3.81                                  | -0.27                         |
| H1'/H4'   | 9.2                    | 3.13                                  | -0.05                         |
| H2'/H3'   | -18.3                  | 2.37                                  | 0.08                          |
| H2'/H4'   | 24.8                   | 1.79                                  | -0.07                         |
| H3'/H4'   | 39.7                   | 4.95                                  | -0.28                         |
| H3'/H5'R  | 22.8                   | 2.94                                  | -0.10                         |
| H3'/H5'S  | -37.3                  | 3.09                                  | 0.23                          |
| H4'/H5'R  | 31.5                   | 2.69                                  | -0.13                         |
| H4'/H5'S  | 27.4                   | 2.61                                  | -0.11                         |
| H5'R/H5'S | 36.3                   | 1.77                                  | -0.09                         |

#### 5.4. Zusammenfassung und Diskussion stereoelektronischer Effekte in Nucleosiden

Durch die Interpretation der Ergebnisse, die die MD-Simulationen der hier untersuchten Nucleoside lieferten, können die im Nucleosid wirkenden Kräfte sehr detailliert beschrieben werden. Im Folgenden werden bekannte Aspekte, die die Konformation von Nucleosiden bestimmen, aufgegriffen und um neu gefundene Effekte erweitert.

Es ist bekannt, dass die Konformation des Riboserings maßgeblich durch den *gauche*-Effekt bestimmt wird.<sup>36</sup> Die MD-Simulationen an 3dU und 2fU stehen in völliger Übereinstimmung mit diesem Effekt, da beide Verbindungen die Nord-Konformation bevorzugen, in der die Substituenten entlang der C1'-C2'-Bindung *gauche* stehen (Abbildung 5-6 a, Abbildung 5-11 a). Die fehlende Hydroxylgruppe in 3dU erzeugt keinen *gauche*-Effekt entlang der C3'-C4'-Bindung, der zu einer Bevorzugung der Süd-Konformer führen würde, so dass die Nord-Konformation stark favorisiert wird (Abbildung 5-6 a). Die Stärke des *gauche*-Effekts

## 5. Konformation modifizierter Nucleoside

---

hängt von der Elektronegativität des Substituenten ab.<sup>36</sup> Insofern zeigt die MD-Simulation von 2fU eine Präferenz der Ribose zur Nord-Konformation, obwohl zwei *gauche*-Effekte miteinander konkurrieren: Entlang der C3'-C4'-Bindung bewirkt der *gauche*-Effekt eine Bevorzugung der Süd-Konformation, während er entlang der C1'-C2'-Bindung eine Präferenz zur Nord-Konformation verursacht. Auf Grund des elektronegativen Fluorsubstituenten am Kohlenstoffatom C2' wird aber die Nord-Konformation klar bevorzugt (Abbildung 5-11 a).

Der anomere Effekt beeinflusst ebenfalls die Konformation der Ribose und dirigiert sie in Richtung Nord-Konformation.<sup>36</sup> In ddU tritt kein *gauche*-Effekt bezüglich des Riboserings auf Grund der fehlenden Substituenten an den Kohlenstoffatomen C2' und C3' auf, so dass der schwächere anomere Effekt nicht in seiner Auswirkung überlagert und so besonders deutlich wird. Die MD-Simulation von ddU berechnet eine klare Bevorzugung der Nord-Konformation in ddU (Abbildung 5-8 a), die alleine durch den anomeren Effekt zu erklären ist. Auffällig ist des Weiteren, dass 3dU sehr deutlich Nord-Konformationen bevorzugt. Würde nur der *gauche*-Effekt die Konformation des Riboserings bestimmen, so müsste die Nord-Konformation von 3dU etwa genauso stark populiert sein wie die Süd-Konformation von 2dU. Da aber in 3dU der anomere Effekt und der *gauche*-Effekt gleichgerichtet sind, treten Nord-Konformationen sehr viel häufiger auf als die Süd-Konformationen von 2dU, wo der *gauche*-Effekt die Ribose in eine Süd-Konformation dirigiert. Dies ist ebenfalls ein klarer Hinweis auf die Wirkung des anomeren Effekts.

In Pyrimidinnucleosiden ist die *anti*-Orientierung der Base auf Grund der Abstoßung der Sauerstoffatome O2 der Base und O4' der Ribose bevorzugt.<sup>36</sup> Die hier durchgeführten MD-Simulationen belegen diese Aussagen erneut und ergeben für alle drei Nucleoside eine Präferenz der *anti*-Orientierung. Auch eine Korrelation zwischen der Konformation der Ribose und der Orientierung der Base ist bekannt:<sup>36</sup> In der Süd-Konformation besetzt die Base eine pseudoäquatoriale Position, so dass ihr mehr Platz zur Verfügung steht als in der Nord-Konformation. Deshalb ist die sterisch anspruchsvolle *syn*-Orientierung der Base in der Süd-Konformation energetisch günstiger. Diese Korrelation wird auch in den MD-Simulationen deutlich: Wird die Konformation der Ribose durch Modifikation im Ring dahingehend verändert, dass verstärkt Süd-Konformationen auftreten, wie z.B. bei 2dU,<sup>39</sup> so treten verstärkt *syn*-Orientierungen auf. In ddU vermindert sich der Anteil an Süd-Konformationen, und es kommt zu einer Reduzierung der *syn*-Orientierungen. Diese Tendenz setzt sich bei 3dU und 2fU fort, die kaum noch Süd-Konformere aufweisen. In diesen Nucleosiden tritt die *syn*-

Orientierung praktisch nicht mehr auf. Theoretisch wäre es denkbar, dass die Modifikationen in den unterschiedlichen Nucleosiden direkt eine Wechselwirkung mit der Base ausbilden und so ihre Orientierung verändern. Da die Modifikationen allerdings sehr weit von der Base entfernt sind, ist eine direkte Beeinflussung der Substituenten an den Kohlenstoffatomen C2' und C3' auf die Orientierung der Base eher unwahrscheinlich. Viel eher wird durch die Substituenten eine Änderung im konformativen Verhalten der Ribose induziert, wodurch die Orientierung der Base beeinflusst wird.

In den hier durchgeführten MD-Simulationen wurde erstmals eine direkte Wirkung der Base auf die Konformation der Ribose deutlich. Die Simulationen der Nucleoside 3dU und ddU ergaben eine Verschiebung der Populationsmaxima der Ribose in östliche Konformationen mit einer pseudoäquatorialständigen Base, wenn die Base eine *syn*-Orientierung einnimmt ( $\phi = \pm 60^\circ$ ,  $\chi = 45^\circ$ , Abbildung 5-6 g, Abbildung 5-8 g). In einer *anti*-Orientierung herrschen dagegen verstärkt westliche Konformationen entsprechend des anomeren Effekts vor ( $\phi = \pm 90^\circ$ ,  $\chi = -160^\circ$ , Abbildung 5-6 g, Abbildung 5-8 g). Diese Tendenz setzt sich in der *high-anti*-Orientierung fort, die eine sehr westliche Konformation der Ribose mit einer nahezu optimalen pseudoaxialen Position der Base ermöglicht ( $\phi = \pm 90^\circ$ ,  $\chi = -160^\circ$ , Abbildung 5-6 g, Abbildung 5-8 g). Diese pseudoaxiale Position eignet sich am besten für eine  $n_{O4'}\tau\sigma^*_{C1'-N1}$ -Überlappung, wie sie dem anomeren Effekt entspricht. Sehr stark wird diese Korrelation auch bei 2fU deutlich. Zwar verlässt dieses Nucleosid praktisch nicht die *anti*/Nord-Konformation. Leichte Orientierungsänderungen in der Base haben aber stets synchrone Konformationswechsel der Ribose zur Folge, so dass von einer starken Korrelation der beiden Freiheitsgrade  $\phi$  und  $\chi$  ausgegangen werden kann (Abbildung 5-10). Allgemein wird bei den hier untersuchten Nucleosiden also eine *syn*/Ost- und *anti*/West- bzw. *high-anti*/West-Korrelation festgestellt. Ein Konformationswechsel der Base induziert jedoch keinen Wechsel zwischen der Nord- und der Süd-Konformation.

Der *gauche*-Effekt wirkt sich auch auf das konformative Verhalten der exocyclischen Gruppe aus.<sup>36</sup> Im Gegensatz zum Festkörper, wo die *tg*-Rotamere bevorzugt sind, liegt die exocyclische Gruppe in Lösung verstärkt in den beiden *gauche*-Orientierungen vor.<sup>36</sup> Die Bevorzugung der *gauche*-Orientierungen ergibt sich auch aus den hier durchgeführten MD-Simulationen (Abbildung 5-6 c, Abbildung 5-8 c, Abbildung 5-11 c). Die Abhängigkeit vom Lösungsmittel wurde in dieser Arbeit zwar nicht untersucht. Da eine Bevorzugung der *gauche*-

## 5. Konformation modifizierter Nucleoside

---

Orientierungen weder im Festkörper noch in der Gasphase auftritt, dürfte der *gauche*-Effekt hier im Lösungsmittel begründet liegen. Im Allgemeinen versuchen Moleküle in polaren Lösungsmitteln ihr Dipolmoment zu erhöhen, was sich in einer Dominanz der *gauche*-Orientierungen der exocyclischen Gruppe äußern dürfte.

Durch die fehlenden Substituenten an den Kohlenstoffatomen C2' und C3' wurde das Nucleosid ddU als sehr flexibel und "weich" berechnet (Abbildung 5-8 d-f). Dadurch wurden mit der hier verwendeten Methodik erstmals auch kleine Effekte sichtbar, die sonst durch den starken *gauche*-Effekt überlagert werden: In der *gg*-Orientierung der exocyclischen Gruppe nimmt die Ribose eine etwas östlichere Konformation ein mit einer pseudoäquatorialen Stellung dieser Gruppe ( $\gamma = 60^\circ$ ,  $\phi = \pm 70^\circ$ , Abbildung 5-8 i). Offensichtlich verursacht diese *gg*-Orientierung, in der die exocyclischen Gruppe über der Ribose lokalisiert ist, einen schwachen sterischen Konflikt, der durch eine östlichere Ribosekonformation und eine damit verbundene pseudoäquatoriale Position der exocyclischen Gruppe reduziert wird. Die anderen beiden Rotamere der exocyclischen Gruppe ( $\gamma = 180^\circ$ ,  $\gamma = -60^\circ$ ) belassen die Ribose in etwas westlicheren Konformationen ( $\phi = \pm 90^\circ$ , Abbildung 5-8 i).

Eine weitere, sehr schwache Korrelation zwischen der Base und der exocyclischen Gruppe ergibt sich aus der MD-Simulation von ddU (Abbildung 5-8 h). Die *syn*-Orientierung der Base ist stärker populiert als üblich, wenn die exocyclische Gruppe eine *gg*-Orientierung einnimmt. Diese leichte *syn/gg*-Korrelation deutet auf die bereits bekannte, schwache O5'-H $\cdots$ O2-Wasserstoffbrückenbindung hin.<sup>36</sup> Allerdings ergibt die Analyse der MD-Rechnung, dass der Wasserstoff-Akzeptor-Abstand lediglich zu 6% der Zeit die Marke von 3.0 Å unterschreitet, die als Limit für eine schwache Wasserstoffbrückenbindung angesehen wird. In allen diesen Fällen ist der O5'-H $\cdots$ O2-Winkel dabei spitzer als 120°. Laut Definition einer Wasserstoffbrückenbindung sollte der Winkel annähernd linear sein ( $160^\circ < \phi_{\text{O5'-H-O2}} < 180^\circ$ ). In diesem Fall kann also nicht von einer echten Wasserstoffbrückenbindung gesprochen werden.

Aus den MD-Simulationen der Nucleoside wird zum ersten Mal ein Einfluss von den Modifikationen in der Ribose auf die Flexibilität der Nucleoside nachgewiesen. Auf Grund der fehlenden Substituenten an den Kohlenstoffatomen C2' und C3' ist der Riboseteil von ddU am flexibelsten, die Ribose von 3dU und 2fU erweist sich hingegen als wesentlich rigider (Abbildung 5-6 d, Abbildung 5-8 d, Abbildung 5-11 d). Die Veränderung in der Flexibilität der Ribose wirkt sich auch auf das dynamische Verhalten der Base und der exocyclischen

Gruppe aus (Abbildung 5-6 e,f, Abbildung 5-8 e,f, Abbildung 5-11 e,f), die in ihrer Flexibilität zu- bzw. abnehmen. Das führt insgesamt zu einem Nucleosid, das entweder sehr flexibel (ddU) oder vergleichsweise rigide ist (3dU und 2fU).

Insgesamt wurden folgende konformative Effekte in Lösung von  $\beta$ -D-Nucleoside bestätigt und teilweise neu identifiziert. Sie sind in etwa ihrer Stärke nach geordnet.

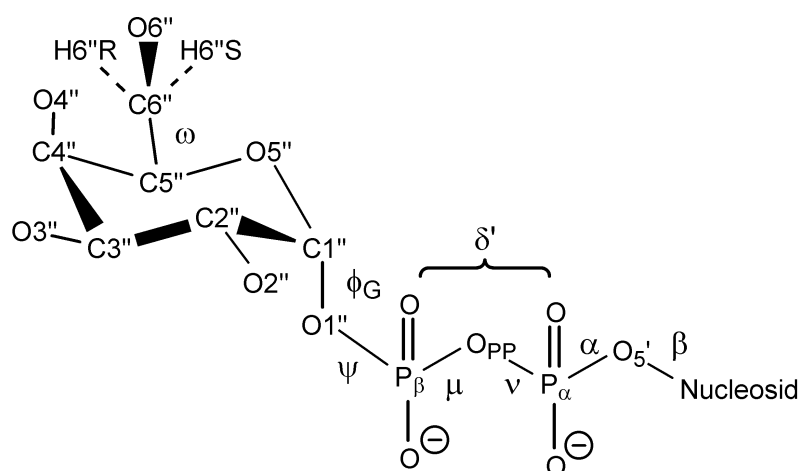
- Der *gauche*-Effekt beeinflusst maßgeblich die Konformation des Ribosering und der exocyclischen Gruppe. Er hängt von der Elektronegativität des Substituenten ab. (Bestätigter Effekt)
- Durch den anomere Effekt wird die westliche Konformation der Ribose bevorzugt. (Bestätigter Effekt)
- Die Orientierung der Base verändert sich in Abhängigkeit von der Konformation der Ribose. (Bestätigter Effekt)
- Die Base beeinflusst die Konformation der Ribose. (Neu identifizierter Effekt)
- In der gg-Orientierung der exocyclischen Gruppe kommt es zu einer schwachen Abstoßung mit der Ribose. (Neu identifizierter Effekt)
- Es bildet sich eine sehr schwache O5'-H $\cdots$ O2-Wechselwirkung aus, die eine leichte gg/*syn*-Korrelation verursacht. (Bestätigter Effekt)
- Die Modifikationen im Ribosering verändern die Flexibilität des gesamten Nucleosids. (Neu identifizierter Effekt)

### 6. Konformation von Zuckernucleotiden

Zu Beginn dieser Arbeit war vergleichsweise wenig über die Konformation von Zuckernucleotiden bekannt.<sup>28,29</sup> Erst zeitgleich zum Entstehen dieser Arbeit sind Untersuchungen zu diesem Thema weiter vorangetrieben worden. So wurde die Struktur des Diphosphats, des Methyldiphosphats (MDP)<sup>132</sup>, des Pyranosephosphats<sup>133,134</sup> und des gesamten Zuckernucleotids<sup>135</sup> mit ab initio Methoden ermittelt. Für das Diphosphat wurden Kraftfeldparameter für CHARMM22<sup>136</sup> und für phosphorylierte Pyranosen AMBER-Parameter<sup>137</sup> entwickelt. Der Konformationsraum von UDP-Glc wurde mit Hilfe der neu entwickelten Parameter abgesucht<sup>137</sup> und sein Verhalten mittels MD-Simulationen in Lösung berechnet.<sup>138</sup> Darüber hinaus gaben 1D NOE-Experimente weitere Hinweise auf die Konformation von UDP-Glc in Lösung<sup>139</sup> und in Verbindung mit <sup>13</sup>C-NMR-Relaxationsmessungen wurde daraus eine Struktur in Lösung ermittelt.<sup>140</sup> Die in Kapitel 5 getroffenen Aussagen über Nucleoside lassen sich grob auch auf den Nucleotidteil von Zuckernucleotiden übertragen. Ihre Besonderheiten sollen jedoch kurz dargestellt werden, um anschließend auf die Konformation des gesamten Zuckernucleotids näher einzugehen.

Die Analyse von Kristallstrukturen 5'-phosphorylierter Nucleotide zeigte eine Abnahme ihrer Flexibilität im Vergleich zu den Nucleosiden.<sup>141</sup> Das gilt besonders für die Rotation der exocyclischen Gruppe und führt zu einer Dominanz von gg-Rotameren in Lösung (80% gg in UMP).<sup>142</sup> Auch die Häufigkeit der *anti*-Orientierungen der Base in den Kristallstrukturen nimmt zu.<sup>141</sup> Durch die Phosphatgruppe erhöht sich die Polarität von O5' und damit die C6-H<sup>δ</sup>··O5'-Wechselwirkung, wodurch die gg-Konformation der exocyclischen Gruppe und die *anti*-Orientierung der Base stabilisiert wird.<sup>36</sup> Im Vergleich zu Nucleosiden besitzt ein Nucleotid eine zusätzliche Rotationsachse entlang der C5'-O5'-Bindung (Torsionswinkel  $\beta$ ).<sup>36</sup> Da die exocyclische Gruppe bevorzugt eine gg-Konformation einnimmt, ist die Rotation um  $\beta$  aus sterischen Gründen stark eingeschränkt.<sup>36</sup> In wässriger Lösung besitzt der Torsionswinkel  $\beta$  beispielsweise bei UMP zu 90% eine *ap*-Orientierung.<sup>36</sup> Die starke Bevorzugung einer einzigen Orientierung der Base, der exocyclischen Gruppe und des Torsionswinkels  $\beta$  führte zum Konzept der "rigiden" Nucleotide. Spektroskopische Daten sind im Einklang mit diesem Konzept. Jedoch sollte lediglich darunter verstanden werden, dass Nucleotide in Lösung eine einzige bestimmte Konformation favorisieren, aber dennoch viele andere Konformationen einnehmen.<sup>36</sup>

Zuckernucleotide besitzen vergleichsweise viele konformative Freiheitsgrade (Abbildung 6-1). In Energiehyperflächenberechnungen des Zuckernucleotids UDP-Glc wurden viele energetisch günstige Konformationen ermittelt, die Relevanz in Lösung besitzen könnten. Da sich diese Minima jedoch ähneln, lassen sie sich zu sechs Konformationsfamilien zusammenfassen. Dabei weist die Mehrheit dieser Konformationsfamilien eine eher gefaltete räumliche Anordnung auf als eine gestreckte.<sup>137</sup> Auch in MD-Simulationen von UDP-Glc wurde eine höhere Stabilität der gefalteten Konformationen berechnet, wobei das Gegenion zur negativ geladenen Pyrophosphatgruppe konformativen Einfluss ausübt. Während Kaliumionen die gestreckten Konformationen stabilisieren, nimmt UDP-Glc in Anwesenheit von Magnesiumionen stets gefaltete Konformationen ein.<sup>138</sup> Auch die Analyse von 1D NOE-Daten und Untersuchungen zur Reaktivität der Pyranose ergaben, dass UDP-Glc zumindest teilweise gefaltete Konformationen in Lösung einnehmen muss.<sup>139</sup> <sup>13</sup>C-Relaxationsmessungen in Kombination mit 1D NOE-Daten ermittelten jedoch, dass vorwiegend gestreckte Konformationen in Lösung vorliegen<sup>140</sup> und somit eher der Kristallstruktur von UDP-Glc<sup>28</sup> entsprechen (vgl. Abbildung 6-6).



**Abbildung 6-1:** Benennung der Schweratome und prochiralen Wasserstoffatome in Zuckernucleotiden mit den Torsionswinkeln  $\omega$ : O6''-C6''-C5''-O5'',  $\phi$ : O5''-C1''-O1''-P<sub>β</sub>,  $\psi$ : C1''-O1''-P<sub>β</sub>-O<sub>PP</sub>,  $\mu$ : O1''-P<sub>β</sub>-O<sub>PP</sub>-P<sub>α</sub>,  $\nu$ : P<sub>β</sub>-O<sub>PP</sub>-P<sub>α</sub>-O5',  $\alpha$ : O<sub>PP</sub>-P<sub>α</sub>-O5'-C5',  $\beta$ : P<sub>α</sub>-O5'-C5'-C4'.

Im Einzelnen bietet sich für die konformativen Freiheitsgrade der Zuckernucleotide folgendes Bild: Allgemein liegt die Pyranose starr in einer <sup>4</sup>C<sub>1</sub>-Konformation vor, da die größeren Hydroxylgruppen die äquatoriale Position bevorzugen. Die Orientierungen ihrer exocyclischen Gruppe weisen ein Besetzungsverhältnis von gg : gt : tg = 3 : 2 : 0 in Gluco-D-Monosacchariden und von gg : gt : tg = 1 : 3 : 1 in D-Galactosen auf, wobei die Anteile der Rotamere

## 6. Konformation von Zuckernucleotiden

---

im Wesentlichen durch die Natur der Hexose bestimmt werden.<sup>143</sup> Ab initio Studien der Modellverbindung Tetrahydropyran-1-phosphat zeigten, dass der Torsionswinkel  $\phi_G$  bei  $\alpha$ -Pyranosen nicht frei drehbar ist, sondern lediglich zwei Orientierungen bevorzugt. Demnach werden zwei Minima bei  $\phi_G = 60^\circ$  und  $\phi_G = 150^\circ$  gefunden,<sup>137</sup> die durch den anomeren Effekt<sup>144</sup> bestimmt werden.

Das Diphosphat ist sehr flexibel,<sup>132</sup> wodurch die Pyranose und das Nucleotid viele Orientierungen zueinander einnehmen können. Die P-O<sub>pp</sub>-Bindungen sind vergleichsweise lang und der P-O<sub>pp</sub>-P-Bindungswinkel beträgt ca.  $130^\circ$ .<sup>36</sup> Dadurch sind die beiden Phosphatgruppen weit voneinander entfernt, so dass sie ohne größere Hinderung alle möglichen gestaffelten und sogar verdeckten Konformationen einnehmen können.<sup>36</sup> Quantenmechanische Berechnungen zeigten einen hohen  $\pi$ -Bindungscharakter der P-O<sub>pp</sub>-Bindungen (35%), der jedoch deutlich geringer ist, als bei den Bindungen der Phosphoratomen mit den freien Sauerstoffatomen (42-48%).<sup>27a</sup>

Die Ribose befindet sich üblicher Weise in einer nördlichen (51%) und südlichen (49%) Konformation. Bei der exocyclischen Gruppe dominieren die gg-Konformationen ( $\gamma = 60^\circ$ , 81%) und entlang der C5'-O5'-Bindung wird eine *anti*-Orientierung bevorzugt ( $\beta = 180^\circ$ , 71%).<sup>29</sup>

Eine Analyse aller energetisch relevanten Minima von UDP-Glc gab Hinweise auf die Konformation von UDP-Glc in Lösung.<sup>137</sup> Demnach besitzt der Torsionswinkel  $\alpha$  entlang des Sauerstoffatoms O5' und dem  $\alpha$ -Phosphat zwei bevorzugte Konformationen bei  $\alpha = 90^\circ$  und  $\alpha = -90^\circ$ , die *ap*-Orientierung ist hingegen kaum besetzt. Der Torsionswinkel  $\beta$  liegt vorwiegend in der *ap*-Orientierung vor, wohingegen die exocyclische Gruppe des Nucleotids alle drei gestaffelten Orientierungen einnimmt. Der nucleosidisch-glycosidische Winkel  $\chi$  kann Werte  $\chi = -170^\circ$  bis  $0^\circ$  und  $\chi = 0^\circ$  bis  $60^\circ$  annehmen, bevorzugt jedoch leicht die *syn*-Orientierungen. Die Ribose befindet sich in einem Gleichgewicht von Nord- und Süd-Konformationen. Die inneren Torsionswinkel des Pyrophosphats  $\mu$  und  $\nu$  besitzen kein ausgeprägtes Populationsmaximum eines Rotamers. Bei dem Torsionswinkel  $\phi_G$  am anomeren Zentrum der Pyranose dominiert hingegen klar eine Konformation mit einem Winkel von  $\phi_G = 70^\circ$ . Der Torsionswinkel  $\psi$  entlang des Sauerstoffatoms O1'' und dem  $\beta$ -Phosphat bevorzugt alle drei gestaffelten Konformationen, die jedoch stark verzerrt sind.<sup>137</sup>



Die Orientierungen der einzelnen Freiheitsgrade in Lösung von UDP-Glc, soweit sie bekannt sind, ähneln der Kristallstruktur<sup>28</sup> (Abbildung 6-6). Hier nimmt die Base eine *anti*-Orientierung ein ( $\chi = -105.0^\circ$ ), die Ribose liegt in der C2'-*endo*-Konformation vor, bei der exocyclischen Gruppe wird eine *gg*-Orientierung ( $\gamma = 56.5^\circ$ ) gefunden. Die übrigen Torsionswinkel betragen  $\beta = -151.1^\circ$ ,  $\alpha = 76.2^\circ$ ,  $\nu = 93.5^\circ$ ,  $\mu = -164.9^\circ$ ,  $\psi = -72.6^\circ$ ,  $\phi = 75.7^\circ$ . Die D-Glucose liegt in der  ${}^4C_1$ -Sesselkonformation vor mit einer *gg*-Orientierung der exocyclischen Gruppe ( $\omega = -49.2^\circ$ ).

### 6.1. Uridin-5'-O-diphosphor- $\alpha$ -glucose (UDP-Glc)

#### 6.1.1. Ergebnisse einer MD-Simulation

Auf Grund der Molekülgröße und ihrer vielen konformativen Freiheitsgrade ist ein vollständiges Absuchen des Konformationsraumes von Zuckernucleotiden mit ab initio Methoden zurzeit nicht möglich, so dass auf Kraftfeldmethoden zurückgegriffen werden musste. Unter Verwendung des AMBER91-Kraftfelds in Kombination mit dem GLYCAM93-Kraftfeld für Pyranosen und den hier entwickelten Parametern für das Pyrophosphat wurde das dynamische Verhalten von UDP-Glc mittels einer MD-Simulation mit zusätzlichen NMR-Randbedingungen ermittelt.

Die hier durchgeführten MD-Simulationen (Abbildung 6-3) verdeutlichten eine große Beweglichkeit von UDP-Glc, so dass sowohl einzelne Freiheitsgrade als auch das Gesamtmolekül in mehr als einer Konformation vorliegen. Die hier untersuchten Zuckernucleotide weisen in vielen Aspekten Ähnlichkeiten in ihrem konformativen Verhalten auf. Deshalb wird die Konformation von UDP-Glc exemplarisch detailliert dargestellt, um bei den übrigen Zuckernucleotiden lediglich die Unterschiede herauszustellen. Im Einzelnen bietet sich für UDP-Glc folgendes Bild:

Laut MD-Rechnung liegt die Base in *syn*- ( $\chi = 45^\circ$ ), *anti*- ( $\chi = -160^\circ$ ) und *high-anti*-Orientierungen ( $\chi = -60^\circ$ ) vor mit einer Dominanz der *anti*-Orientierung. Im Vergleich zu den Nucleosiden ist die *anti*-Orientierung jedoch stark verbreitert und die *high-anti*-Orientierung ist stärker besetzt (Abbildung 6-2 a, Tabelle 6-1). Die Flexibilität der Base ist dadurch jedoch unbeeinflusst (Abbildung 6-3 b).

Aus den MD-Rechnungen ergibt sich, dass die Ribose eine Verteilung über vier unterschiedliche Konformationsbereiche aufweist. Diese befinden sich in nördlichen und südlichen Regionen, die jeweils in eine westliche und eine östliche Konformation unterteilt sind. Somit ergibt sich eine nordwestliche ( $\phi = -120^\circ$ ), eine nordöstliche ( $\phi = -50^\circ$ ), eine südwestliche ( $\phi = 120^\circ$ ) und eine südöstliche ( $\phi = 50^\circ$ ) Konformation. Die östlichen Konformationen sind dabei durch einen größeren Abstand zwischen der Base und der exocyclische Gruppe charakterisiert, während die westlichen Konformationen einen verkürzten Abstand aufweisen. Wie bei den Nucleosiden existiert eine Korrelation der Orientierung der Base mit der Ribosekonformation (Abbildung 6-5 b): In den *syn*- und *anti*-Orientierungen der Base verschiebt sich die Konformation der Ribose in Richtung Osten und es kommt zu einer Auf-

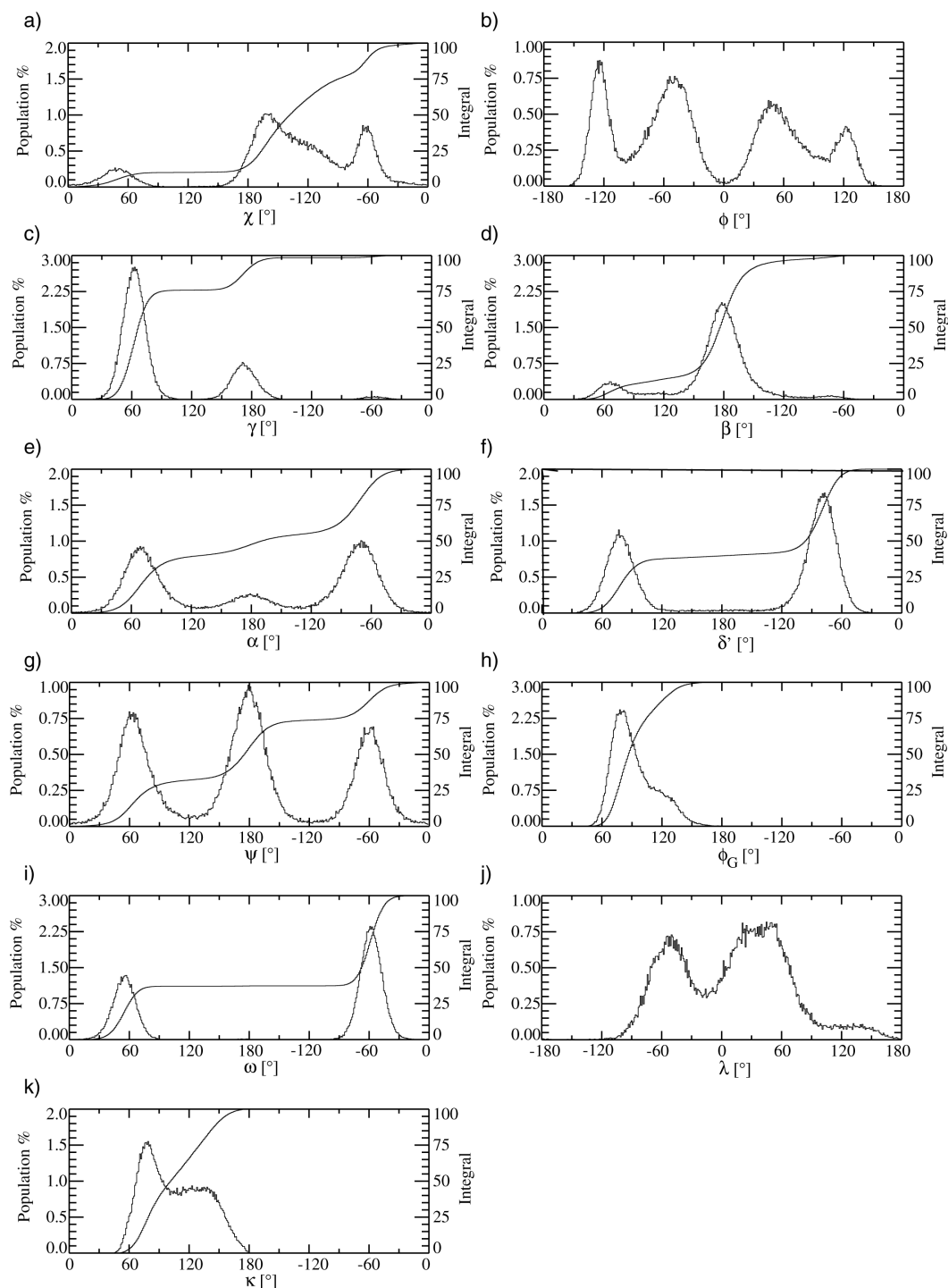
weitung des Abstands zwischen Base und exocyclischer Gruppe. In der *high-anti*-Orientierung vermindert sich der Abstand zwischen Base und Ribose, so dass die Ribose eine westliche Konformation einnimmt (Abbildung 6-5 b). Die Ribose wechselt im Vergleich zu den hier untersuchten Nucleosiden deutlich seltener zwischen Nord- und Süd-Konformationen (Abbildung 6-3 b) und ist somit etwas rigider.

Im Vergleich zu den Nucleosiden bevorzugt die exocyclische Gruppe laut MD-Rechnung deutlich stärker die *gg*-Orientierung ( $\gamma = 60^\circ$ , Abbildung 6-2 c, Tabelle 6-1). Ihre Orientierung ist zwar nicht mit den anderen beiden Freiheitsgraden des Nucleosids korreliert (Abbildung 6-5 a, c), jedoch mit dem benachbarten Torsionswinkel  $\beta$  entlang der C5'-O5'-Bindung, bei dem die *ap*-Konformation ( $\beta = 180^\circ$ ) vorherrschend ist (Abbildung 6-2 d, Tabelle 6-1). Insgesamt existiert bei diesen beiden Torsionswinkeln eine *gg/ap*-Korrelation. In anderen Orientierungen sind die Torsionswinkel nicht miteinander korreliert (Abbildung 6-5 d). Die Konformationswechsel der Torsionswinkel  $\gamma$  (Abbildung 6-3 c) und  $\beta$  finden zwar häufig statt, dennoch lässt sich von einem rigiden Nucleotid sprechen, wenn man darunter versteht, dass sie eine stark bevorzugte Orientierung besitzen.

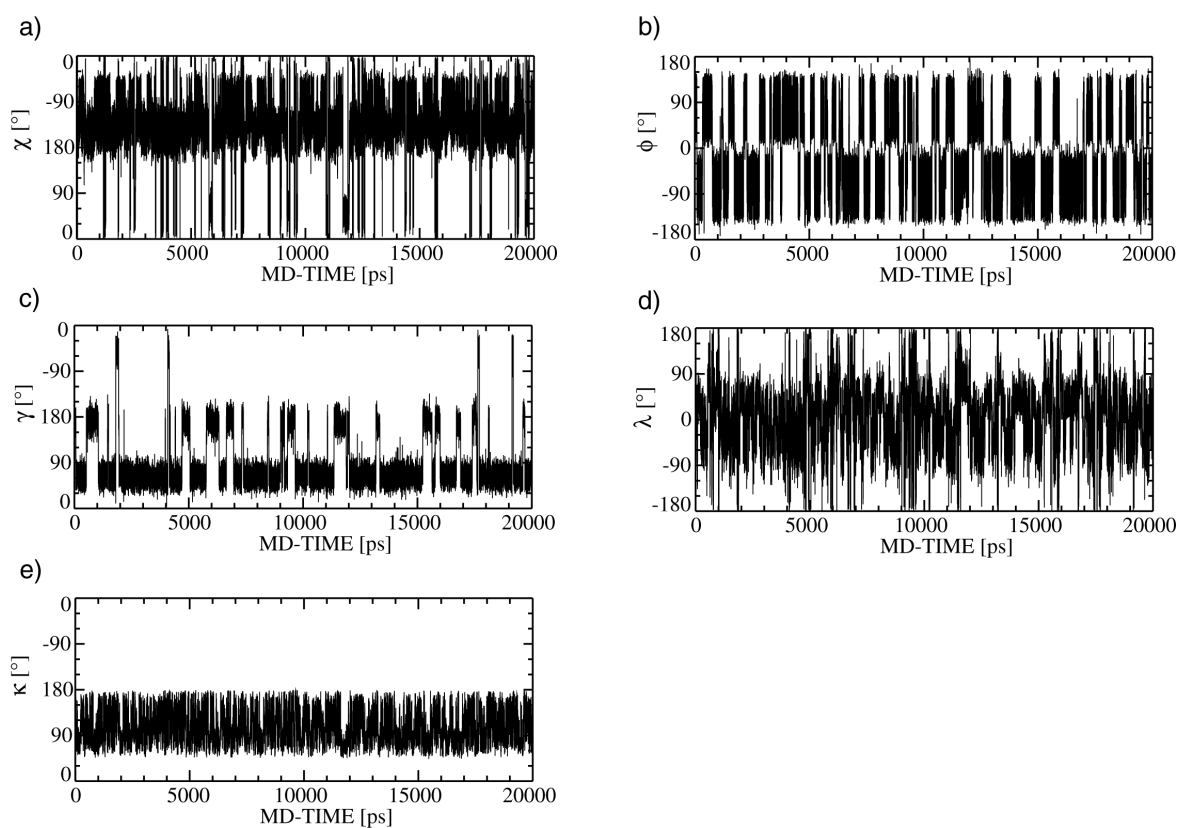
Der Torsionswinkel  $\alpha$  entlang der O5'-P $_{\alpha}$ -Bindung nimmt hauptsächlich *gauche*-Orientierungen ( $\alpha = 60^\circ$  und  $\alpha = -60^\circ$ ) ein (Abbildung 6-2 e, Tabelle 6-1). Wie bei DMDP sind die inneren Torsionswinkel des Pyrophosphats  $\mu$  und  $\nu$  stark korreliert (Abbildung 6-5 e), so dass sie zum Diederwinkel  $\delta'$  zusammengefasst werden können. Dieser befindet sich wie bei DMDP im Gleichgewicht zwischen den beiden *gauche*-Orientierungen ( $\delta' = 60^\circ$  und  $\delta' = -60^\circ$ ), mit einer leichten Bevorzugung der *-sc*-Orientierung (Abbildung 6-2 f, Tabelle 6-1). Die Substituenten Glc und U scheinen die Konformation des Pyrophosphats also nicht wesentlich zu beeinflussen. Der Torsionswinkel  $\psi$  entlang der O1'-P $_{\beta}$ -Bindung liegt in allen drei gestaffelten Konformationen vor (Abbildung 6-2 g, Tabelle 6-1). Am anomeren Zentrum der Pyranose ist der Torsionswinkel  $\phi_G$  in seiner Rotation eingeschränkt und besitzt ein Populationsmaximum bei  $\phi_G = 90^\circ$  mit einem Nebenmaximum bei  $\phi_G = 120^\circ$  (Abbildung 6-2 h, Tabelle 6-1).

Glc verweilt in einer recht starren Sesselkonformation mit kurzfristigen Auslenkungen zu einer Halbsessel- bzw. Halbbootkonformation. Die exocyclische Gruppe der Glc liegt in typischen *gauche*-Konformationen vor, bei der die *gg*-Orientierung ( $\omega = -60^\circ$ ) etwa doppelt so stark besetzt ist wie *gt* ( $\omega = 60^\circ$ , Abbildung 6-2 i, Tabelle 6-1).

## 6. Konformation von Zuckernucleotiden



**Abbildung 6-2:** Ergebnisse einer MD-Simulation von UDP-Glc unter Verwendung des neu parametrisierten AMBER91/GLYCAM93-Kraftfelds und zusätzlichen NMR-Randbedingungen. Populationverteilungen [%] des a) Torsionswinkels  $\chi$  der Base, b) Pseudorotationsparameters  $\phi$  der Ribose c) Torsionswinkels  $\gamma$  ihrer exocyclischen Gruppe d) Torsionswinkels  $\beta$  entlang der C5'-O5'-Bindung, e) Torsionswinkels  $\alpha$  entlang der O5'-P $_{\alpha}$ -Bindung f) Diederwinkels  $\delta'$  des Pyrophosphats, g) Torsionswinkels  $\psi$  entlang der P $_{\beta}$ -O1''-Bindung h) Torsionswinkels  $\phi_G$  am anomeren Zentrum, i) Torsionswinkels  $\omega$  der exocyclischen Gruppe der Pyranose, j) Diederwinkels  $\lambda$  und k) Winkels  $\kappa$  der Gesamtkonformation.



**Abbildung 6-3:** Ergebnisse einer MD-Simulation von UDP-Glc unter Verwendung des neu parametrisierten AMBER91/GLYCAM93-Kraftfelds und zusätzlicher NMR-Randbedingungen. Trajektorien des a) Torsionswinkels  $\chi$  der Base, b) Pseudorotationsparameters  $\phi$  der Ribose, c) Torsionswinkels  $\gamma$  ihrer exocyclischen Gruppe, d) Diederwinkels  $\lambda$  und e) Winkels  $\kappa$  der Gesamtkonformation.

## 6. Konformation von Zuckernucleotiden

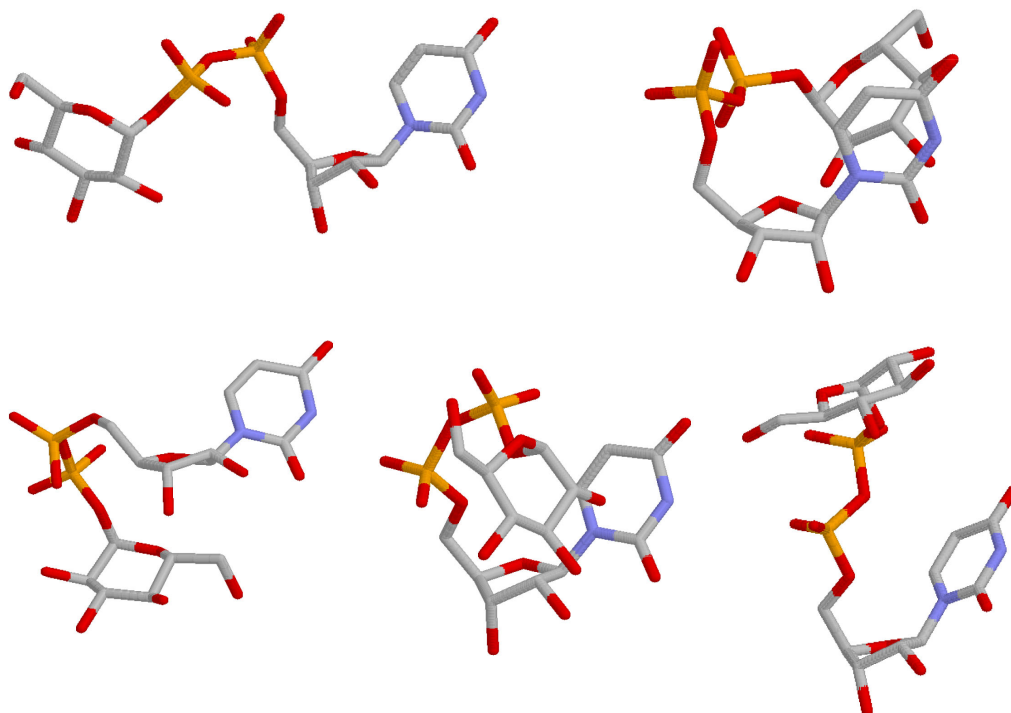
**Tabelle 6-1:** Ergebnisse einer MD-Simulation von UDP-Glc unter Verwendung des neu parametrisierten AMBER91/GLYCAM93-Kraftfelds und zusätzlichen NMR-Randbedingungen bei 300 K über einen Zeitraum von 20 ns.

| UDP-Glc                          |            |                     |
|----------------------------------|------------|---------------------|
|                                  | Population | $\Delta G$ [kJ/mol] |
| $X_{\text{syn}}(\chi)$           | 0.10       | 4.65                |
| $X_{\text{anti}}(\chi)$          | 0.65       | 0.00                |
| $X_{\text{high-anti}}(\chi)$     | 0.25       | 2.33                |
| $X_{\text{N}}(\phi)$             | 0.59       | 0.00                |
| $X_{\text{S}}(\phi)$             | 0.41       | 0.87                |
| $X_{\text{gg}}(\gamma)$          | 0.76       | 0.00                |
| $X_{\text{gt}}(\gamma)$          | 0.22       | 3.03                |
| $X_{\text{tg}}(\gamma)$          | 0.02       | 9.70                |
| $X_{\text{sc}}(\beta)$           | 0.14       | 4.40                |
| $X_{\text{-sc}}(\beta)$          | 0.04       | 7.76                |
| $X_{\text{ap}}(\beta)$           | 0.82       | 0.00                |
| $X_{\text{sc}}(\alpha)$          | 0.39       | 0.31                |
| $X_{\text{-sc}}(\alpha)$         | 0.44       | 0.00                |
| $X_{\text{ap}}(\alpha)$          | 0.16       | 2.49                |
| $X_{\text{sc}}(\delta')$         | 0.38       | 1.07                |
| $X_{\text{-sc}}(\delta')$        | 0.58       | 0.00                |
| $X_{\text{ap}}(\delta')$         | 0.04       | 6.33                |
| $X_{\text{sc}}(\psi)$            | 0.32       | 0.65                |
| $X_{\text{-sc}}(\psi)$           | 0.26       | 1.16                |
| $X_{\text{ap}}(\psi)$            | 0.42       | 0.00                |
| $X_{\text{sc}}(\phi_{\text{G}})$ | 0.75       | 0.00                |
| $X_{\text{ac}}(\phi_{\text{G}})$ | 0.25       | 2.70                |
| $X_{\text{gg}}(\omega)$          | 0.63       | 0.00                |
| $X_{\text{gt}}(\omega)$          | 0.37       | 1.31                |
| $X_{\text{tg}}(\omega)$          | 0.00       | 13.23               |
| $X_{\text{E}}$                   | 0.35       | 0.18                |
| $X_{\text{G,behind}}$            | 0.38       | 0.00                |
| $X_{\text{G,front}}$             | 0.15       | 2.31                |
| $X_{\text{G,up}}$                | 0.06       | 4.35                |
| $X_{\text{G,down}}$              | 0.06       | 4.69                |
| $\langle \kappa \rangle$ [°]     | 106.1      |                     |
| $\phi(\text{N})$ [°]             | -77.7      |                     |
| $q(\text{N})$ [Å]                | 0.309      |                     |
| $\phi(\text{S})$ [°]             | 73.3       |                     |
| $q(\text{S})$ [Å]                | 0.303      |                     |
| $Q_{\text{Pyr}}$ [Å]             | 0.555      |                     |
| $\phi_{\text{Pyr}}$ [°]          | -166.7     |                     |
| $\theta_{\text{Pyr}}$ [°]        | 171.5      |                     |

Obwohl die einzelnen Freiheitsgrade von UDP-Glc durch die eindimensionale Populationsanalyse korrekt beschrieben werden, ergibt sich noch kein Gesamtbild des komplexen Moleküls. Deshalb wird in dieser Arbeit der Konformationsraum von Zuckernucleotiden in fünf Familien eingeteilt, die sich in der Lage der Pyranose zum Nucleosid unterscheiden. Danach existieren eine gestreckte (*extended*), die im weiteren Verlauf mit E bezeichnet werden wird, und vier gefaltete (*globular*) Konformationsfamilien. Die gefalteten unterteilen sich in die  $G_{up}$ -Familie, bei der sich die Glucose oberhalb des Nucleosids befindet, in die  $G_{down}$ -Familie mit der Glucose unterhalb des Nucleosids und entsprechend in die Familien  $G_{front}$  und  $G_{behind}$ .

Zur Beschreibung dieser fünf Konformationsfamilien aus molekularen Eigenschaften wird ein Idee von *Kim et al.* aufgegriffen<sup>139</sup> und etwas weiter verfeinert. Ein Winkel  $\kappa$  wird durch die Atome C1', C4' und C1'' und ein Diederwinkel  $\lambda$  wird durch die Atome N1, C1', C4' und C1'' definiert.  $\kappa$  gibt Aufschluss über die Stärke der Faltung des Moleküls. Bei kleinem Winkel ist UDP-Glc gefaltet ( $\kappa < 120^\circ$ ), bei großem gestreckt. Bei gefaltetem Molekül beschreibt  $\lambda$  die vier globulären Konformationen. In  $G_{front}$  nimmt  $\lambda$  Werte zwischen  $-90^\circ$  und  $-30^\circ$  an, in  $G_{up}$  liegt  $\lambda$  zwischen  $-30^\circ$  und  $0^\circ$ , in  $G_{behind}$  zwischen  $0^\circ$  und  $90^\circ$  und in  $G_{down}$  zwischen  $90^\circ$  und  $-90^\circ$ .

Nach diesem Modell liegt UDP-Glc im Wesentlichen in den Konformationsfamilien  $G_{front}$  ( $\lambda = -60^\circ$ ),  $G_{behind}$  ( $\lambda = 45^\circ$ ) und E ( $\kappa > 120^\circ$ ) vor. Bei  $G_{behind}$  ist die Pyranose relativ dicht bei der Base lokalisiert und das Gesamtmolekül ist stark gefaltet (kleines  $\kappa$ , Abbildung 6-5 k). Das Populationsmaximum von  $G_{behind}$  ist scharf und stark ausgeprägt. Auch  $G_{front}$  ist recht stark populiert. Die Pyranose ist jedoch deutlich weiter von der Base entfernt (Abbildung 6-5 k), so dass das Molekül in dieser Konformationsfamilie weniger stark gefaltet ist als bei  $G_{behind}$  (größeres  $\kappa$ ). Das Populationsmaximum ist recht breit. Da die  $G_{front}$ -Familie eine weniger starke Faltung aufweist, ist der Übergang zur E-Konformationsfamilie fließend und nicht klar abgegrenzt. Jedoch ist definitiv auch eine größere Menge der E-Familie vorhanden. Die Familien  $G_{down}$  ( $\lambda = 180^\circ$ ), bei der sich die Glucose unterhalb des Nucleosids befindet und  $G_{up}$  ( $\lambda = -15^\circ$ ) mit der Glucose oberhalb des Riboserings sind wenig stabil (Abbildung 6-2 j, Tabelle 6-1).

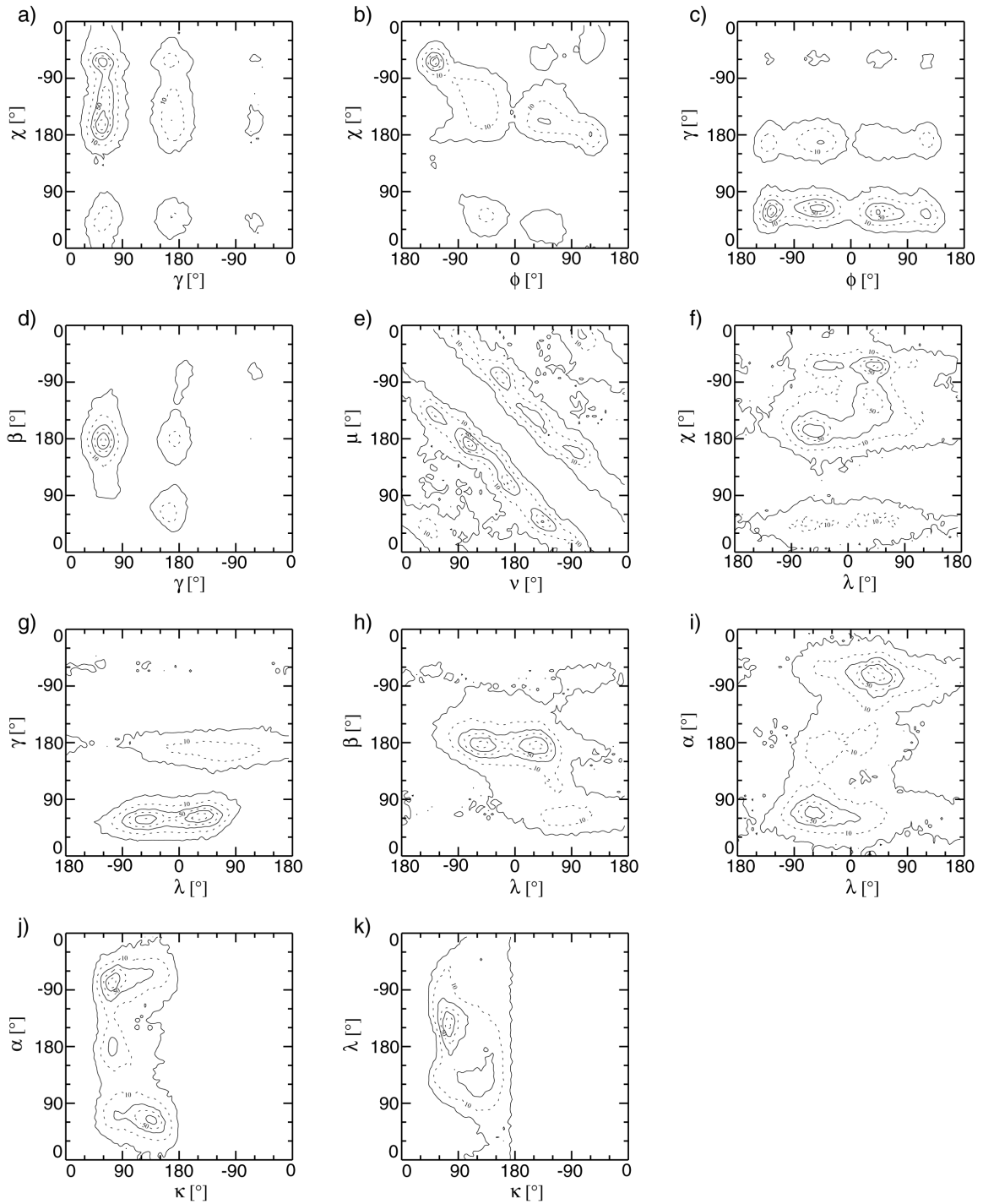


**Abbildung 6-4:** Konformationsfamilien am Beispiel von UDP-Glc von links oben nach rechts unten: E,  $G_{\text{behind}}$ ,  $G_{\text{down}}$ ,  $G_{\text{front}}$  und  $G_{\text{up}}$ .

Die MD-Simulation berechnet eine Korrelation der Base mit der Gesamtkonformation des Moleküls (Abbildung 6-5 f). In der  $G_{\text{front}}$ -Familie ( $\lambda = -60^\circ$ ) weist die Base eine Populationsverteilung wie etwa bei den Nucleosiden auf. Die *anti*-Orientierung ( $\chi = -160^\circ$ ) ist stark besetzt, *syn*- ( $\chi = 45^\circ$ ) und *high-anti*-Orientierungen ( $\chi = -60^\circ$ ) dagegen wenig. Die  $G_{\text{behind}}$ -Familie hingegen zeigt eine ungewöhnliche Orientierung der Base. Das Populationsmaximum der *anti*-Orientierung ist nach *high-anti* verschoben ( $\chi = -120^\circ$ ), weniger besetzt und die Menge an *high-anti*-Orientierungen hat deutlich zugenommen.

Sowohl die *gg*-Orientierung der exocyclischen Gruppe des Nucleotids, die durch den Torsionswinkel  $\gamma$  definiert ist, als auch die *ap*-Konformation vom benachbarten Torsionswinkel  $\beta$  entlang der C5'-O5'-Bindung stabilisieren laut MD-Rechnung die  $G_{\text{behind}}$ - und die  $G_{\text{front}}$ -Familie. Während in diesen beiden Konformationsfamilien die *gg/ap*-Orientierung verstärkt auftritt (Abbildung 6-5 g, h), wird keine klare Bevorzugung einer Konformationsfamilie bei einer abweichenden Orientierung von der *gg/ap*-Konformation sichtbar. Außerdem fällt auf, dass der Torsionswinkel  $\alpha$  entlang der O5'-P $_{\alpha}$ -Bindung entscheidend die Gesamtkonformation des Moleküls bestimmt. Bei einer *sc*-Orientierung von  $\alpha$  liegt meist eine  $G_{\text{front}}$ -Familie vor, bei einer *-sc*-Konformation nimmt UDP-Glc verstärkt  $G_{\text{behind}}$  ein (Abbildung 6-5 i, j).

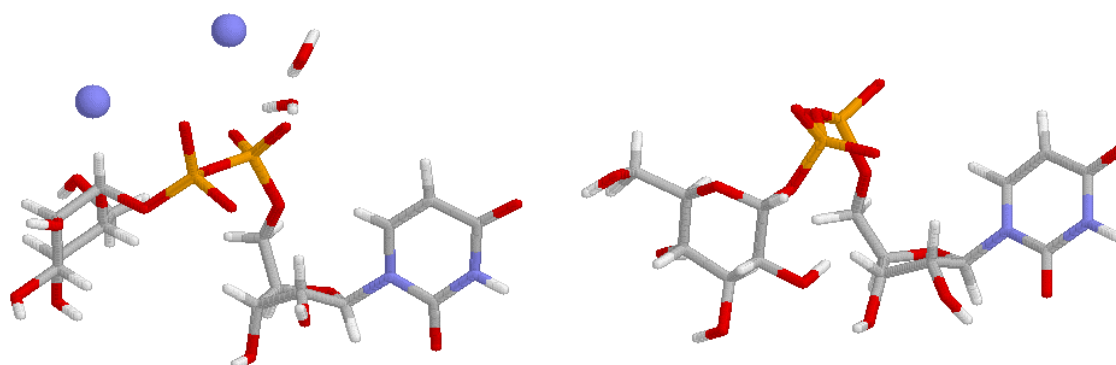




**Abbildung 6-5:** Ergebnisse einer MD-Simulation von UDP-Glc unter Verwendung des neu parametrisierten AMBER91/GLYCAM93-Kraftfelds und zusätzlicher NMR-Randbedingungen. Konturdiagramme der Populationen der a) Torsionswinkel  $\chi$  der Base und  $\gamma$  der exocyclischen Gruppe der Ribose b) Freiheitsgrade  $\chi$  und  $\phi$  der Ribose c) Freiheitsgrade  $\gamma$  und  $\phi$ , d) Torsionswinkel  $\beta$  entlang der C5'-O5'-Bindung und  $\gamma$ , e) inneren Torsionswinkel des Pyrophosphats  $\mu$  und  $\nu$ , f) Diederwinkel  $\chi$  und  $\lambda$  der Gesamtkonformation g) Diederwinkel  $\gamma$  und  $\lambda$ , h) Diederwinkel  $\beta$  und  $\lambda$ , i) Diederwinkel  $\alpha$  entlang der O5'-P $_{\alpha}$ -Bindung und  $\lambda$ , j) Freiheitsgrade  $\alpha$  und  $\kappa$  der Gesamtkonformation und k) Freiheitsgrade  $\lambda$  und  $\kappa$ .

## 6. Konformation von Zuckernucleotiden

Eine noch genauere Unterteilung der einzelnen Freiheitsgrade in ihre möglichen Populationsmaxima ergibt eine Konformation des Gesamtmoleküls mit  $\chi$  in *anti*-,  $\phi$  in Süd-,  $\gamma$  in gg-,  $\beta$  in *ap*-,  $\alpha$  in *sc*-,  $\delta'$  in *-sc*-,  $\psi$  in *ap*-,  $\phi_G$  in *sc*- und  $\omega$  in gg-Konformation, die zu 2.5 % der MD-Simulationszeit am häufigsten besetzt ist und zur E-Familie gehört. Sie ähnelt der Kristallstruktur von UDP-Glc<sup>28</sup> ( $\chi = -105.0^\circ$ ,  $\phi = 78.1^\circ$ ,  $\gamma = 65.5^\circ$ ,  $\beta = -151.1^\circ$ ,  $\alpha = 76.2^\circ$ ,  $\delta' = -74.6^\circ$ ,  $\psi = -72.6^\circ$ ,  $\phi_G = 75.7^\circ$ ,  $\omega = -49.2^\circ$ ), die ebenfalls der E-Familie zuzuordnen ist, und unterscheidet sich lediglich im Torsionswinkel  $\psi$  entlang der O1"-P $\beta$ -Bindung und im Torsionswinkel  $\omega$  der exocyclischen Gruppe der Pyranose.



**Abbildung 6-6:** Kristallstruktur<sup>28</sup> (links) und häufigste Konformation in Lösung (rechts) von UDP-Glc.

### 6.1.2. Vergleich theoretischer und experimenteller NMR-Daten

<sup>1</sup>H-NMR-Spektren des natürlichen Zuckernucleotids UDP-Glc sind Spektren höherer Ordnung, da die Resonanzen von H2' und H3' der Ribose annähernd dieselbe chemische Verschiebung aufweisen. Bei der rechnerischen Ermittlung der Kopplungskonstanten und chemischen Verschiebungen wurde eine Quadratwurzelabweichung von etwa 0.2 Hz festgestellt. Die experimentellen Kopplungskonstanten sind also mit einer gewissen Ungenauigkeit behaftet. Die Resonanzen H5 und H1' überlagern sich, so dass sie bei den NOE-Aufbaukurven zusammen integriert wurden. Obwohl einerseits H4', H5'b und H5'a und andererseits H5'' und H6''b im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum gut separiert waren, reichte die Auflösung des NOESY-Spektrums nicht aus, um diese Signale getrennt zu integrieren. Auch diese NOEs wurden zusammen integriert. Das führt zwar zu korrekten Resultaten, vermindert je-

doch den Informationsgehalt der NOEs. Nach der Integration der Signale wurde auf das Diagonalsignal von H6 referenziert. Auf Grund der räumlichen Entfernung von Uridin und Glucose und dem Fehlen von Protonen am Pyrophosphat waren nur wenige aussagekräftige NOE-Kontakte bezüglich der Gesamtkonformation zu erwarten. Dennoch konnten drei NOE-Kontakte  $H2'+H3'/H1''$ ,  $H2'+H3'/H5''+H6''S$  und  $H4'+H5'R+S/H1''$  identifiziert werden, die trotz ihrer geringen Signalintensitäten ( $< 0.5\%$  des Referenzsignals) Hinweise auf eine räumliche Nähe zwischen der Glucose und dem Uridin geben (Abbildung 6-7 j-l, Tabelle 6-3).

Alle H,H-, H,P- und C,P-Torsionswinkel der MD-Simulation wurden in Kopplungskonstanten umgeformt. Die vergleichende Betrachtung zwischen den experimentell ermittelten<sup>29</sup> und aus der MD-Simulation berechneten Kopplungskonstanten zeigt im hohen Maße Übereinstimmung. Größere Abweichungen treten lediglich bei Protonen der exocyclischen Gruppen der Ribose und der Glucose auf. Insbesondere die vicinalen Kopplungen  $^3J_{H4',H5'S}$  und  $^3J_{H5''/H6''S}$  zeigen diese Abweichung. Wie bereits festgestellt wurde, ist der Fehler in der Karplus-Beziehung zu suchen. Denn einerseits zeigen die entsprechenden experimentellen und theoretischen NOE-Aufbaukurven gute Konformität (s.u.), andererseits deutet die große Kopplungskonstante  $^3J_{H4',H5'S}$  der MD-Simulation auf einen zu hohen Anteil an tg-Rotameren des Torsionswinkels  $\gamma$  hin. Da dieser Anteil allerdings lediglich 2% beträgt, wäre eine kleinere Kopplungskonstante nur zu realisieren, wenn die Substituenten keine optimal gestaffelte Position einnehmen würden, was aus chemischer Sicht zweifelhaft ist.

In der Summe bestätigen die Kopplungskonstanten eine korrekte MD-Simulation bezüglich der Pseudorotationsparameter  $\phi$  der Ribose und  $\phi_{\text{Pyr}}$  und  $\theta_{\text{Pyr}}$  der Glucose, der Orientierung ihrer exocyclischen Gruppen, die durch die Torsionswinkel  $\gamma$  und  $\omega$  definiert sind, und der Rotamerenverteilung der Torsionswinkel  $\beta$  entlang der C5'-O5'-Bindung und  $\phi_G$  entlang der C1''-O1''-Bindung. Damit reduziert sich eine weitere Fehlerbetrachtung, die mittels NOE-Aufbaukurven durchgeführt wird, auf wenige Freiheitsgrade.

## 6. Konformation von Zuckernucleotiden

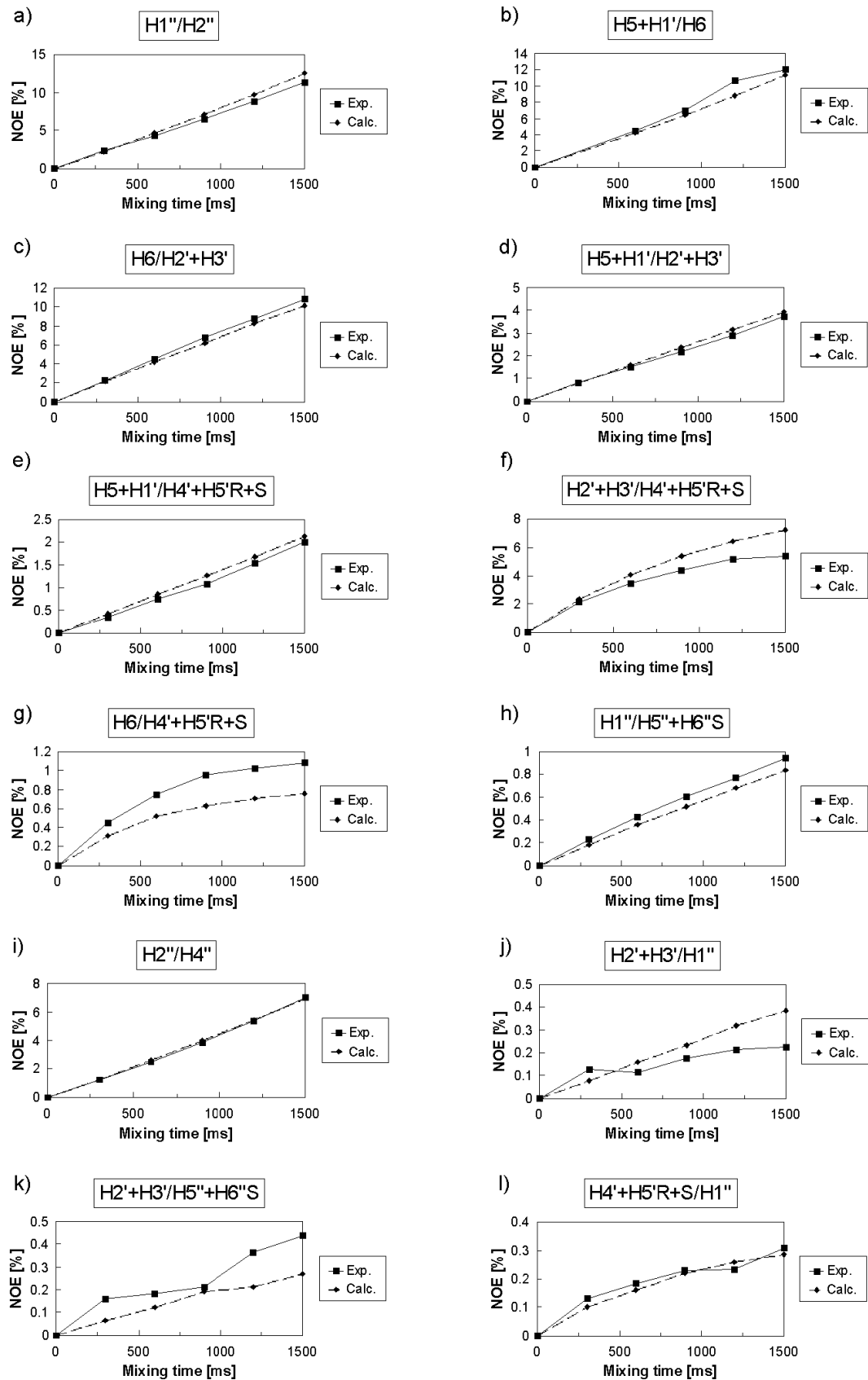
**Tabelle 6-2:** Durch eigene Experimente ergänzte experimentelle<sup>29</sup> und berechnete Kopplungskonstanten von UDP-Glc.

|                                      | UDP-Glc [Hz]       |                    |
|--------------------------------------|--------------------|--------------------|
|                                      | exp. <sup>a)</sup> | ber. <sup>b)</sup> |
| <sup>3</sup> J <sub>H1',H2'</sub>    | 4.6                | 4.1                |
| <sup>3</sup> J <sub>H2',H3'</sub>    | 4.8                | 5.5                |
| <sup>3</sup> J <sub>H3',H4'</sub>    | 4.9                | 4.8                |
| <sup>3</sup> J <sub>H4',H5'R</sub>   | 3.0                | 3.3                |
| <sup>3</sup> J <sub>H4',H5'S</sub>   | 2.6                | 3.6                |
| <sup>3</sup> J <sub>H5'R,Pα</sub>    | 5.6                | 5.8                |
| <sup>3</sup> J <sub>H5'S,Pα</sub>    | 4.6                | 4.1                |
| <sup>3</sup> J <sub>C4',Pα</sub>     | 9.1                | 8.5                |
| <sup>3</sup> J <sub>C2'',Pβ</sub>    | 8.7                | 8.0                |
| <sup>3</sup> J <sub>H1'',Pβ</sub>    | 7.3                | 7.2                |
| <sup>3</sup> J <sub>H1'',H2''</sub>  | 3.5                | 4.0                |
| <sup>3</sup> J <sub>H2'',H3''</sub>  | 9.8                | 9.3                |
| <sup>3</sup> J <sub>H3'',H4''</sub>  | 9.3                | 9.4                |
| <sup>3</sup> J <sub>H4'',H5''</sub>  | 10.0               | 9.7                |
| <sup>3</sup> J <sub>H5'',H6''R</sub> | 4.5                | 4.6                |
| <sup>3</sup> J <sub>H5'',H6''S</sub> | 2.4                | 3.5                |

a) in D<sub>2</sub>O bei 300 K und LAOCOON Simulation

b) mit Karplus-Beziehung<sup>76,90</sup>

Entlang der C1'-N1-Bindung der Base und innerhalb des Diphosphats können keine Kopplungskonstanten gemessen werden. NOE-Aufbaukurven geben jedoch Information über die Konformationen der Diederwinkel  $\chi$ ,  $\alpha$ ,  $\delta'$  und  $\psi$ , so dass sie insbesondere zur Überprüfung dieser Freiheitsgrade zweckdienlich sind. Der Vergleich zwischen experimentellen und theoretisch ermittelten NOE-Aufbaukurven belegt ein korrekt berechnetes Gleichgewicht der Basenorientierung (Abbildung 6-7 b, c, Tabelle 6-3). Auch die Konformation der Ribose inklusive ihrer exocyclischen Gruppe ist korrekt simuliert worden (Abbildung 6-7 d-f, Tabelle 6-3). Größere Abweichungen sind in dem experimentellen und berechneten NOE zwischen dem Proton H6 der Base und der exocyclischen Gruppe festzustellen. Da es sich jedoch um einen nichtbindenden Atomabstand handelt, ist der geschätzte Fehler von  $< 0.3 \text{ \AA}$  in akzeptablen Grenzen, so dass die Gesamtkonformation des Nucleosids durch die MD-Rechnung ebenfalls recht gut beschrieben wird (Abbildung 6-7 g, Tabelle 6-3). Auch hinsichtlich der Pyranose liefert die MD-Simulation korrekte Ergebnisse (Abbildung 6-7 g, h). Die drei NOE-Kontakte, die zwischen dem Nucleosid und der Pyranose gemessen wurden, zeigen ebenfalls eine gute Übereinstimmung mit den Resultaten der MD-Simulation (Abbildung 6-7 j-l, Tabelle 6-3) und untermauern somit korrekte Ergebnisse der MD-Rechnung hinsichtlich der Pyrophosphatkonformation einschließlich der Torsionswinkel  $\alpha$  und  $\psi$  und der Gesamtkonformation von UDP-Glc.



**Abbildung 6-7:** Experimentelle (Exp.) und aus der MD-Simulation erhaltene (Calc.) NOE-Aufbaukurven von UDP-Glc.

## 6. Konformation von Zuckernucleotiden

---

Aus den Differenzen aller gemessenen zu den theoretisch ermittelten NOE-Aufbaukurven von UDP-Glc wurden in Näherung die Fehler der MD-Simulation der Kernabstände berechnet (Tabelle 6-3). Größere Abweichungen treten bei den NOEs H2'+H3'/H1'' und H2'+H3'/H5''+H6''S auf. Da es sich aber um nichtbindende Atomabstände handelt, liegt der geschätzte Fehler von  $< 0.5 \text{ \AA}$  in akzeptablen Grenzen. Alles in allem kann von einer hohen Zuverlässigkeit der hier durchgeführten MD-Simulation ausgegangen werden, die das dynamische Verhalten von UDP-Glc in Lösung sehr genau beschreibt.

Die MD-Simulation berechnet Kernabstände (Tabelle 6-3) der beteiligten Protonen der NOEs H2'+H3'/H1'' und H2'+H3'/H5''+H6''S, die deutlich größer sind als die normalerweise detektierbaren Abstände von  $4\text{--}5 \text{ \AA}$  (z.B.  $d_{\text{H3'/H1''}} = 6.42 \text{ \AA}$ ). Auf Grund der Flexibilität des Moleküls variiert der Abstand erheblich (z.B.  $1.90 \text{ \AA} < d_{\text{H3'/H1''}} < 10.89 \text{ \AA}$ ). Dabei dominieren kurze Kernabstände den NOE, so dass sie nach der Theorie stärker gewichtet werden, in dem die Protonenmatrix aus  $\langle r^{-6} \rangle$  gemittelten Abständen berechnet wird. Das führt zu einem  $\langle r^{-6} \rangle$ -gemittelten Abstand für beispielsweise H3'/H1'' von  $4.29 \text{ \AA}$ , der noch innerhalb der Detektionsgrenze liegt. Auch die Signalüberlagerung von H2' und H3' führt zu einer additiven Verstärkung der betreffenden NOEs. Dennoch sind die experimentellen NOEs zwischen der Pyranose und dem Nucleosid selbst bei längeren Mischzeiten sehr klein ( $< 0.5\%$  des Referenzsignals von H6), wodurch sich das Signal-Rausch-Verhältnis deutlich verschlechtert und zu einer größeren experimentellen Unsicherheit führt.

**Tabelle 6-3:** Arithmetisch gemittelte Abweichungen der experimentellen von den berechneten NOEs ( $\Delta\text{NOE}$ ), über die MD-Zeit gemittelte Protonenabstände ( $\langle d_{\text{Calc}} \rangle$ ) und in Näherung berechnete Fehler der MD-Simulation von UDP-Glc bei 300 K ( $\Delta\langle d \rangle$ ).

| Name                 | $\Delta\text{NOE}$ [%] | $\langle d_{\text{Calc}} \rangle$ [Å] <sup>a)</sup> | $\Delta\langle d \rangle$ [Å] |
|----------------------|------------------------|-----------------------------------------------------|-------------------------------|
| H5+H1'/H6            | 13.1                   | 2.38                                                | -0.04                         |
| H5+H1'/H2'+H3'       | 7.5                    | 2.89                                                | 0.03                          |
| H5+H1'/H4'+H5'R+S    | 10.2                   | 3.32                                                | 0.06                          |
| H6/H2'+H3'           | 7.0                    | 2.95                                                | -0.03                         |
| H6/H4'+H5'R+S        | 46.4                   | 4.47                                                | -0.29                         |
| H2'+H3'/H4'+H5'R+S   | 21.7                   | 2.61                                                | 0.09                          |
| H2'+H3'/H1''         | 34.0                   | 6.42                                                | 0.40                          |
| H2'+H3'/H5''+H6''S   | 55.7                   | 7.20                                                | -0.49                         |
| H4'+H5'R+S/H1''      | 7.3                    | 5.52                                                | -0.04                         |
| H1''/H2''            | 9.0                    | 2.35                                                | 0.03                          |
| H1''/H3''+H6''R      | 21.6                   | 3.83                                                | -0.12                         |
| H1''/H5''+H6''S      | 14.3                   | 3.65                                                | -0.09                         |
| H2''/H3''+H6''R      | 20.5                   | 1.77                                                | -0.07                         |
| H2''/H4''            | 1.7                    | 2.60                                                | 0.01                          |
| H3''+H6''R/H4''      | 12.4                   | 2.85                                                | 0.04                          |
| H5''+H6''S/H2''+H4'' | 53.5                   | 2.60                                                | 0.28                          |

<sup>a)</sup> bei Signalüberlagerungen wurde der kleinste Protonenabstand verwendet.

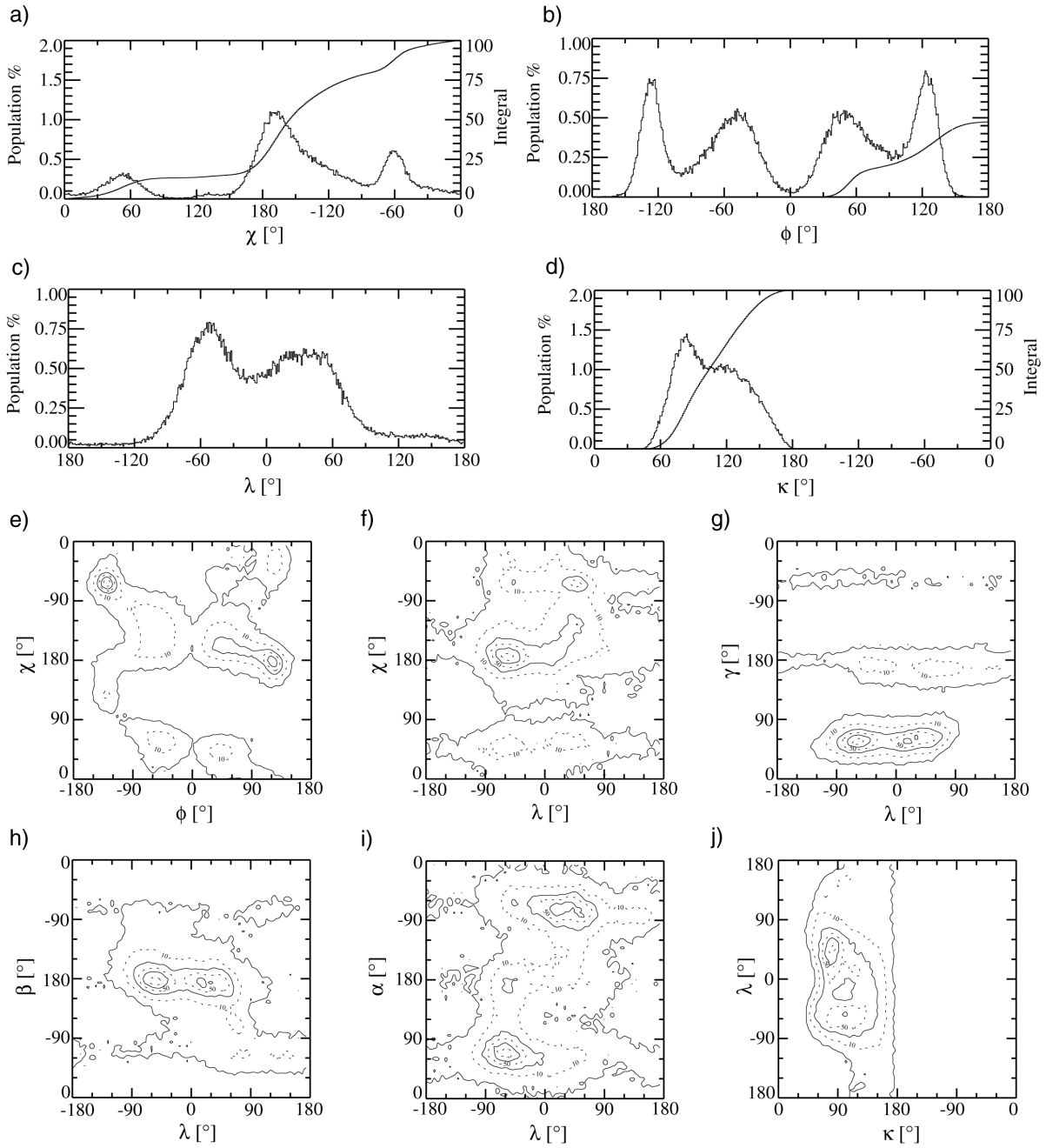
### 6.2. Uridin-5'-O-diphosphor- $\alpha$ -galactose (UDP-Gal)

#### 6.2.1. Ergebnisse einer MD-Simulation

Die strukturellen Unterschiede zwischen UDP-Gal und UDP-Glc sind sehr gering und insofern waren große Übereinstimmungen in ihrem konformativen Verhalten zu erwarten. Tatsächlich wurde durch die hier durchgeführte MD-Simulation auch große Ähnlichkeiten in ihren Konformationen festgestellt (Abbildung 6-8, Tabelle 6-4). Viele Torsionswinkel weisen nahezu identische Populationsverteilungen auf, so dass auf eine eingehende Beschreibung verzichtet wird. Im Folgenden soll lediglich näher auf die Unterschiede zwischen der Konformation von UDP-Gal und UDP-Glc eingegangen werden.

Eine wesentliche Differenz in der Konformation von UDP-Glc und UDP-Gal besteht in der Stellung der Hydroxylgruppe am Kohlenstoffatom C4'' der Pyranose und eine dadurch bedingte Veränderung in der Rotamerenverteilung ihrer exocyclischen Gruppe. Während in UDP-Glc das Rotamerenverhältnis etwa gg : gt : tg = 3 : 2 : 0 beträgt, ergibt sich aus den MD-Simulationen für UDP-Gal ein Verhältnis von etwa gg : gt : tg = 0 : 3 : 2 (Tabelle 6-4). Darüber hinaus ändert sich ebenfalls das Besetzungsverhältnis des Diederwinkels  $\delta'$ , der die Konformation des Pyrophosphats bestimmt, so dass dieser die *sc*-Orientierung mit 52% favorisiert (Tabelle 6-4). Im Vergleich zu UDP-Glc ist die *sc*-Orientierung des Torsionswinkels  $\psi$  entlang der P $_{\beta}$ -O1''-Bindung deutlich weniger populiert, die *ap*-Orientierung wird hingegen häufiger eingenommen (Tabelle 6-4). Diese Änderungen der Diederwinkel  $\delta'$  und  $\psi$  bewirken eine etwas andere Orientierung der Pyranose zur Ribose. Die gestreckte E- ( $\kappa > 120^\circ$ ) und die gefaltete G<sub>behind</sub>-Familie ( $\lambda = 45^\circ$ ) bleiben vorherrschend, jedoch mit einem leichten Unterschied in den Populationen (Abbildung 6-8 c, d, Tabelle 6-4). Die Stärke der Faltung, die durch den Winkel  $\kappa$  definiert ist, bleibt jedoch weitgehend unverändert ( $\langle \kappa \rangle = 107.6^\circ$ , Tabelle 6-4).





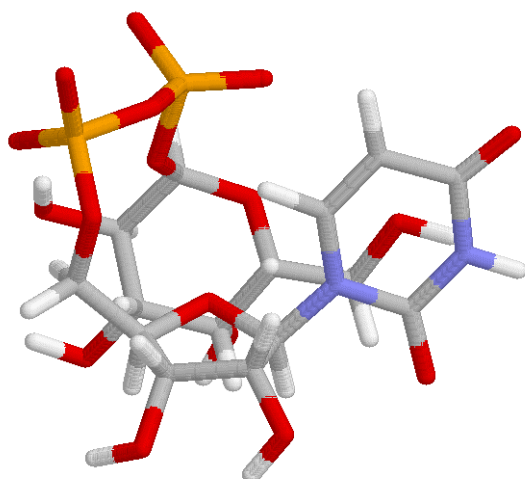
**Abbildung 6-8:** Ergebnisse einer MD-Simulation von UDP-Gal unter Verwendung des neu parametrisierten AMBER91/GLYCAM93-Kraftfelds und zusätzlicher NMR-Randbedingungen. Populationverteilungen [%] des a) Torsionswinkels  $\chi$  der Base, b) Pseudorotationsparameters  $\phi$  der Ribose, c) Diederwinkels  $\lambda$  der Gesamtkonformation und d) Winkels  $\kappa$  der Gesamtkonformation. Konturdiagramme der Populationen der e) Freiheitsgrade der Base  $\chi$  und  $\phi$ , f) Diederwinkel  $\chi$  und  $\lambda$  der Gesamtkonformation g) Diederwinkel  $\gamma$  der exocyclischen Gruppe und  $\lambda$ , h) der Diederwinkel entlang der C5'-O5'-Bindung  $\beta$  und  $\lambda$  und i) der Diederwinkel entlang der O5'-P $_{\alpha}$ -Bindung  $\alpha$  und  $\lambda$  und j) der Parameter  $\lambda$  und  $\kappa$ .

## 6. Konformation von Zuckernucleotiden

**Tabelle 6-4:** Ergebnisse einer MD-Simulation von UDP-Gal unter Verwendung des neu parametrisierten AMBER91/GLYCAM93-Kraftfelds und zusätzlichen NMR-Randbedingungen bei 300 K über einen Zeitraum von 20 ns.

| UDP-Gal                           |            |                     |
|-----------------------------------|------------|---------------------|
|                                   | Population | $\Delta G$ [kJ/mol] |
| $X_{\text{syn}}(\chi)$            | 0.13       | 3.98                |
| $X_{\text{anti}}(\chi)$           | 0.65       | 0.00                |
| $X_{\text{high-anti}}(\chi)$      | 0.22       | 2.70                |
| $X_{\text{N}}(\phi)$              | 0.53       | 0.00                |
| $X_{\text{S}}(\phi)$              | 0.47       | 0.27                |
| $X_{\text{gg}}(\gamma)$           | 0.76       | 0.00                |
| $X_{\text{gt}}(\gamma)$           | 0.21       | 3.14                |
| $X_{\text{tg}}(\gamma)$           | 0.03       | 8.05                |
| $X_{\text{sc}}(\beta)$            | 0.13       | 4.67                |
| $X_{\text{-sc}}(\beta)$           | 0.05       | 7.07                |
| $X_{\text{ap}}(\beta)$            | 0.84       | 0.00                |
| $X_{\text{sc}}(\alpha)$           | 0.36       | 0.37                |
| $X_{\text{-sc}}(\alpha)$          | 0.42       | 0.00                |
| $X_{\text{ap}}(\alpha)$           | 0.22       | 1.69                |
| $X_{\text{sc}}(\delta')$          | 0.52       | 0.00                |
| $X_{\text{-sc}}(\delta')$         | 0.43       | 0.47                |
| $X_{\text{ap}}(\delta')$          | 0.05       | 5.97                |
| $X_{\text{sc}}(\psi)$             | 0.18       | 2.76                |
| $X_{\text{-sc}}(\psi)$            | 0.26       | 1.87                |
| $X_{\text{ap}}(\psi)$             | 0.55       | 0.00                |
| $X_{\text{sc}}(\phi_{\text{G}})$  | 0.73       | 0.00                |
| $X_{\text{ac}}(\phi_{\text{G}})$  | 0.27       | 2.55                |
| $X_{\text{gg}}(\omega)$           | 0.04       | 6.69                |
| $X_{\text{gt}}(\omega)$           | 0.60       | 0.00                |
| $X_{\text{tg}}(\omega)$           | 0.35       | 1.28                |
| $X_{\text{E}}$                    | 0.35       | 0.00                |
| $X_{\text{G,behind}}$             | 0.31       | 0.27                |
| $X_{\text{G,front}}$              | 0.22       | 1.21                |
| $X_{\text{G,up}}$                 | 0.07       | 3.92                |
| $X_{\text{G,down}}$               | 0.05       | 4.84                |
| $\langle \kappa \rangle [^\circ]$ | 107.6      |                     |
| $\phi(\text{N}) [^\circ]$         | 279.2      |                     |
| $q(\text{N}) [\text{\AA}]$        | 0.305      |                     |
| $\phi(\text{S}) [^\circ]$         | 83.8       |                     |
| $q(\text{S}) [\text{\AA}]$        | 0.314      |                     |
| $Q_{\text{Pyr}} [\text{\AA}]$     | 0.558      |                     |
| $\phi_{\text{Pyr}} [^\circ]$      | 199.3      |                     |
| $\theta_{\text{Pyr}} [^\circ]$    | 171.7      |                     |

Laut MD-Rechnung nimmt UDP-Gal am häufigsten eine Konformation in Lösung ein, bei der  $\chi$  in *anti*-,  $\phi$  in Süd-,  $\gamma$  in gg-,  $\beta$  in *ap*-,  $\alpha$  in *-sc*-,  $\delta'$  in *sc*-,  $\psi$  in *ap*-,  $\phi_G$  in *sc*- und  $\omega$  in *gt*-Konformation vorliegt. Sie ist zu 3.0 % der MD-Simulationszeit besetzt und gehört der  $G_{\text{behind}}$ -Familie an:



**Abbildung 6-9:** Häufigste Konformation von UDP-Gal in Lösung.

### 6.2.2. Vergleich theoretischer und experimenteller NMR-Daten

Das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von UDP-Gal ist, wie das von UDP-Glc, ein Spektrum höherer Ordnung auf Grund der annähernd gleichen chemischen Verschiebung der Resonanzen  $\text{H}2'$  und  $\text{H}3'$ . Bei der rechnerischen Lösung des Spektrums wurde eine Quadratwurzelabweichung von  $< 0.2$  Hz festgestellt, so dass die chemischen Verschiebungen und die Kopplungskonstanten mit einer experimentellen Unsicherheit behaftet sind. Darüber hinaus überlagern die Resonanzen  $\text{H}5+\text{H}1'$  sowie  $\text{H}2''+\text{H}6''\text{R}+\text{S}$  und  $\text{H}5'\text{R}+\text{S}+\text{H}5''$ , so dass sie für die NOE-Aufbaukurven meistens zusammen integriert wurden. In einigen Fällen ließen sich die Signale separieren. Bei UDP-Gal wurden insgesamt fünf interessanten NOE-Kontakte zwischen dem Nucleosid und der Pyranose gemessen:  $\text{H}5+\text{H}1'/\text{H}1''$ ,  $\text{H}5+\text{H}1'/\text{H}3''$ ,  $\text{H}6/\text{H}2''+\text{H}6''\text{R}+\text{S}$ ,  $\text{H}2'+\text{H}3'/\text{H}1''$  und  $\text{H}2'+\text{H}3'/\text{H}3''$  (Abbildung 6-10). Sie gaben Hinweise auf eine Nähe zwischen beiden Molekülteilen und wurden zur Überprüfung der Gesamtkonformation verwendet.

## 6. Konformation von Zuckernucleotiden

Aus der MD-Simulation wurden Kopplungskonstanten berechnet und mit den experimentellen verglichen (Tabelle 6-5). Es ergab sich eine gute Übereinstimmung mit Ausnahme der Kopplungskonstante  $^3J_{H4',H5'S}$ . Wie bei UDP-Glc bereits diskutiert wurde (vgl. Kapitel 6.1.2) liegt der Ursache vermutlich in der fehlerhaften Parametrisierung der Karplus-Beziehung. Insgesamt wird durch den Vergleich der Kopplungskonstanten eine korrekte Berechnung der Konformationen der Ribose und der Galactose einschließlich ihrer exocyclischen Gruppen, des Torsionswinkel  $\alpha$  entlang der C5'-O5'-Bindung und des Torsionswinkel  $\phi_G$  am anomeren Zentrum der Pyranose durch die MD-Simulation festgestellt.

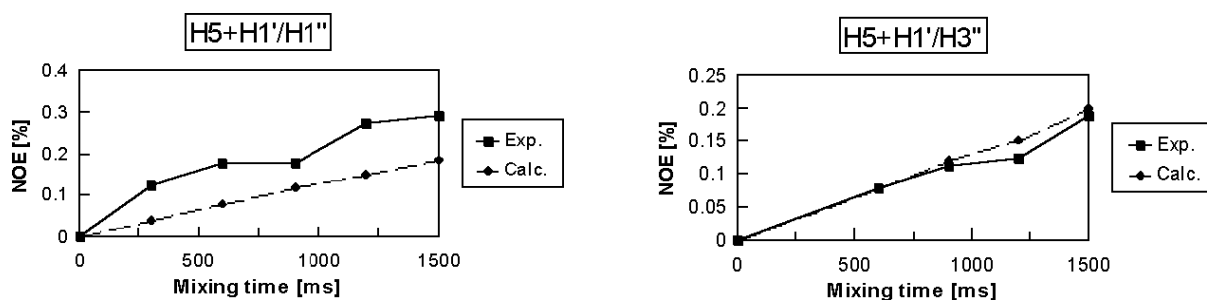
**Tabelle 6-5:** Durch eigene Experimente ergänzte experimentelle<sup>29</sup> und berechnete Kopplungskonstanten von UDP-Gal.

|                      | UDP-Gal [Hz]       |                    |
|----------------------|--------------------|--------------------|
|                      | exp. <sup>a)</sup> | ber. <sup>b)</sup> |
| $^3J_{H1',H2'}$      | 4.6                | 4.3                |
| $^3J_{H2',H3'}$      | 4.9                | 5.6                |
| $^3J_{H3',H4'}$      | 4.8                | 4.3                |
| $^3J_{H4',H5'R}$     | 3.2                | 3.3                |
| $^3J_{H4',H5'S}$     | 2.7                | 3.7                |
| $^3J_{H5'R,P\alpha}$ | 5.7                | 5.7                |
| $^3J_{H5'S,P\alpha}$ | 4.6                | 4.3                |
| $^3J_{C4',P\alpha}$  | 9.1                | 8.5                |
| $^3J_{C2'',P\beta}$  | 8.3                | 7.9                |
| $^3J_{H1'',P\beta}$  | 7.2                | 7.2                |
| $^3J_{H1'',H2''}$    | 3.6                | 3.9                |
| $^3J_{H2'',H3''}$    | 10.3               | 9.5                |
| $^3J_{H3'',H4''}$    | 3.3                | 3.0                |
| $^3J_{H4'',H5''}$    | 0.7                | 1.2                |
| $^3J_{H5'',H6''a}$   | 7.2                | 7.3                |
| $^3J_{H5'',H6''b}$   | 5.2                | 5.2                |

<sup>a)</sup> in D<sub>2</sub>O bei 300 K und LAOCOON Simulation

<sup>b)</sup> mit Karplus-Beziehung<sup>76,90</sup>

In UDP-Gal wurden zwei NOE-Kontakte H5+H1'/H1'' und H5+H1'/H3'' gemessen, die bei UDP-Glc nicht festgestellt werden konnten und die vermutlich lediglich vom Proton H5 mit den Protonen der Pyranose stammen. Sie geben Hinweise auf eine relativ nahe räumliche Anordnung des Uracilrings mit der Galactose, die durch die MD-Simulation bestätigt wird (Abbildung 6-10). Auf eine detaillierte Beschreibung der weiteren NOE-Aufbaukurven wird hier und bei den übrigen Zuckernucleotiden verzichtet. Es ist ausreichend sich auf die Differenz zwischen experimentellen und theoretisch ermittelten NOEs zu konzentrieren (Tabelle 6-6).



**Abbildung 6-10:** Experimentelle (Exp.) und aus der MD-Simulation erhaltene (Calc.) NOE-Aufbaukurven von UDP-Gal.

Der Vergleich experimenteller<sup>29</sup> und aus der MD-Simulation berechneter NOE-Aufbaukurven und den daraus ermittelten Fehlern in den Protonendistanzen ergab weitgehend gute Übereinstimmungen. Größere Abweichungen sind in den NOEs H5+H1'/H1'' und H2'+H3'/H3'' vorhanden (Tabelle 6-6). Da die Abstände der beteiligten Protonen jedoch eine große Varianz aufweisen (z.B.  $1.89 \text{ \AA} < d_{\text{H5/H1''}} < 16.98 \text{ \AA}$ ), ist der geschätzte Fehler von etwa z.B.  $\langle \Delta d_{\text{H5/H1''}} \rangle = 0.8 \text{ \AA}$  noch in einer akzeptablen Größenordnung. Weitere Abweichungen existieren bei NOE-Kontakten zwischen 1,3-diaxialen Pyranoseringprotonen trotz zusätzlicher NMR-Randbedingungen und sind auf eine ungenügende Parametrisierung im GLYCAM93-Kraftfeld zurückzuführen. Sie deuten darauf hin, dass die Pyranose zeitweilig zu große Abweichungen aus der idealen Sesselkonformation einnimmt. Dieser Fehler beeinflusst vermutlich aber nicht die übrigen konformativen Freiheitsgrade von UDP-Gal, so dass die MD-Simulation als korrekt angesehen wurde.

## 6. Konformation von Zuckernucleotiden

**Tabelle 6-6:** Arithmetisch gemittelte Abweichungen der experimentellen von den berechneten NOEs ( $\Delta\text{NOE}$ ), über die MD-Zeit gemittelte Protonenabstände ( $\langle d_{\text{Calc}} \rangle$ ) und in Näherung berechnete Fehler der MD-Simulation von UDP-Gal bei 300 K ( $\Delta\langle d \rangle$ ).

| Name                | $\Delta\text{NOE}$ [%] | $\langle d_{\text{Calc}} \rangle$ [Å] <sup>a)</sup> | $\Delta\langle d \rangle$ [Å] |
|---------------------|------------------------|-----------------------------------------------------|-------------------------------|
| H5+H1'/H6           | 5.9                    | 2.38                                                | 0.01                          |
| H5+H1'/H2'+H3'      | 10.8                   | 2.90                                                | -0.04                         |
| H5+H1'/H4'          | 21.7                   | 3.37                                                | -0.10                         |
| H5+H1'/H1''         | 62.8                   | 8.00                                                | -0.80                         |
| H5+H1'/H3''         | 11.8                   | 8.15                                                | 0.12                          |
| H6/H2'+H3'          | 58.0                   | 3.17                                                | -0.25                         |
| H6/H5'R+S+H5''      | 42.6                   | 4.41                                                | -0.29                         |
| H6/H2''+H6''R+S     | 30.5                   | 8.45                                                | 0.46                          |
| H2'+H3'/H5'R+S+H5'' | 17.2                   | 2.64                                                | 0.09                          |
| H2'+H3'/H1''        | 14.3                   | 6.64                                                | 0.17                          |
| H2'+H3'/H3''        | 70.5                   | 6.87                                                | -0.72                         |
| H5'R+S+H5''/H1''    | 2.5                    | 3.64                                                | 0.01                          |
| H1''/H2''+H6''R+S   | 1.5                    | 2.36                                                | 0.00                          |
| H1''/H3''           | 73.6                   | 3.80                                                | -0.36                         |
| H2''/H4''           | 116.9                  | 3.77                                                | -0.51                         |
| H3''/H4''           | 15.2                   | 2.42                                                | -0.06                         |
| H3''/H5''           | 41.6                   | 2.56                                                | -0.15                         |
| H4''/H5''           | 28.0                   | 2.43                                                | -0.10                         |
| H4''/H6''R+S        | 35.6                   | 2.81                                                | -0.15                         |
| H5''/H6''R+S        | 18.5                   | 2.70                                                | -0.09                         |

<sup>a)</sup> bei Signalüberlagerungen wurde der kleinste Protonenabstand verwendet.

### 6.3. 5,6-Dihydrouridin-5'-O-diphosphor- $\alpha$ -galactose (56dihydroUDP-Gal)

#### 6.3.1. Ergebnisse

Wie die übrigen Zuckernucleotiden wurde 56dihydroUDP-Gal mit dem neu parametrisierten AMBER91/GLYCAM93-Kraftfeld molekülmechanisch berechnet. Problematisch für eine Kraftfeldrechnung sind die Modifikationen in der Base, die nicht im AMBER-Kraftfeld parametrisiert sind. Deshalb wurde zunächst das Nucleosid 56dihydroU quantenmechanisch auf HF/6-31G\*-Niveau geometrieoptimiert, mit den Resultaten einer Kraftfeldrechnung verglichen und untersucht, ob die AMBER91-Parameter die Konformation des modifizierten Uracilrings in genügendem Maße beschreiben. Anschließend wurde die Flexibilität und der Konformationsraum von 56dihydroUDP-Gal mit dem neu parametrisierten AMBER91/GLYCAM93-Kraftfeld und zusätzlichen NMR-Randbedingungen moleküldynamisch berechnet.

Durch die Hydrierung der C-C-Doppelbindung verliert der Uracilring seinen aromatischen Charakter. Amidische Bindungen sind in ihrer Rotation jedoch stark eingeschränkt und nehmen gewöhnlich entlang der C-N-Bindung nur *ap*- und *sp*-Orientierungen ein. Insofern war eine planare Anordnung der Atome N1-C2-N3-C4 zu erwarten. Lediglich die Kohlenstoffatome C5 und C6 sollten aus der Ebene ausgelenkt sein. Die optimierte Struktur auf HF/6-31G\*-Niveau bewies diese Vermutungen und berechnete eine leicht verzerrte Halbbootkonformation des hydrierten Uracilrings mit den Atomen N1-C2-N3-C4 und C5 in einer Ebene und C6 unterhalb dieser Ebene ( $\theta_{\text{Ura}} = 61.4^\circ$ ,  $\phi_{\text{Ura}} = 77.6^\circ$ , Tabelle 6-7). Aus der molekülmechanischen Geometrieoptimierung geht eine sehr ähnliche Konformation des Uracilrings hervor, der eine leicht verzerrte Halbsesselkonformation aufweist mit den Atomen N1-C2-N3-C4 in einer Ebene, C5 unterhalb und C6 oberhalb dieser Ebene ( $\theta_{\text{Ura}} = 125.7^\circ$ ,  $\phi_{\text{Ura}} = 270.0^\circ$ , Tabelle 6-7). Durch beide Methoden wurde also eine planare Konformation der Atome N1-C2-N3-C4 und Auslenkungen an den Kohlenstoffatomen C5 und/oder C6 berechnet, die beide Relevanz in Lösung besitzen, wie die nachfolgende MD-Simulation später zeigte. Da beide Methoden zu vergleichbaren Resultaten führen (Tabelle 6-7), wurden die AMBER91-Parameter als ausreichend zur Konformationsbeschreibung von 56dihydroU angesehen und zur moleküldynamischen Simulation von 56dihydroUDP-Gal verwendet.

## 6. Konformation von Zuckernucleotiden

**Tabelle 6-7:** Ergebnisse der Geometrieoptimierung von 56dihydroU auf HF/6-31G\*-Niveau und 56dihydroUDP-Gal mit dem modifizierten AMBER91/GLYCAM93-Kraftfeld.

| Freiheitsgrad         | HF/6-31G* | AMBER91/GLYCAM93 |
|-----------------------|-----------|------------------|
| $\theta_{\text{Ura}}$ | 61.4°     | 125.7°           |
| $\phi_{\text{Ura}}$   | 77.6°     | 270.0°           |
| $Q_{\text{Ura}}$      | 0.447 Å   | 0.445 Å          |
| $\chi$                | -149.8°   | -149.4°          |
| $\phi$                | 85.5°     | 63.8°            |
| $q$                   | 0.301 Å   | 0.375 Å          |
| $\gamma$              | 56.2°     | 55.0°            |

Die strukturellen Unterschiede von 56dihydroUDP-Gal im Vergleich zu UDP-Gal sind nicht sehr groß. Dennoch berechnet die MD-Simulation weitreichende Auswirkungen der Hydrierung im Uracilring auf die Konformation des Moleküls.

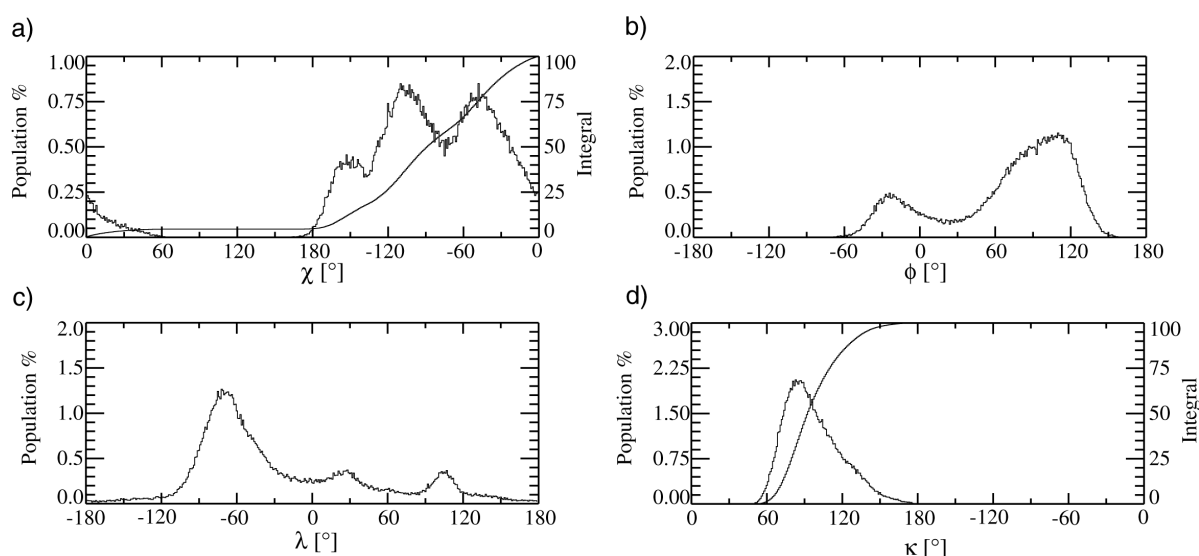
Die Orientierung der Base lässt sich nicht mehr streng in *syn*-, *anti*- und *high-anti*-Konformationen einteilen. Aus Gründen der Vergleichbarkeit wurde sie dennoch entsprechend unterteilt (Tabelle 6-8). Laut MD-Simulation nimmt sie vielmehr einen Konformationsraum ein, der von *anti* bis *high-anti* ( $-180^\circ < \chi < 0^\circ$ ) reicht. Die gering besetzten *syn*-Orientierungen sind eher die Ausläufer des sehr breiten Maximums (Abbildung 6-11 a, Tabelle 6-8). Die Base selbst hat auf Grund der  $sp^3$ -hybridisierten Kohlenstoffe C5 und C6 keine planare Konformation mehr, sondern wechselt zwischen zwei leicht verzerrten Halbsesselkonformationen, bei denen N1-C2-N3-C4 in einer Ebene liegen, und entweder C5 oberhalb und C6 unterhalb der Ebene liegen ( $\theta = 60^\circ$ ,  $\phi = 90^\circ$ ) oder analog C5 unterhalb und C6 oberhalb dieser Ebene lokalisiert sind ( $\theta = 120^\circ$ ,  $\phi = -90^\circ$ , Abbildung 6-12 g).

Die Modifikation im Uracilrings beeinflusst die Konformation der Ribose. Aus den MD-Simulationen ergab sich eine wesentlich stärkere Besetzung der südlichen Konformation ( $\phi = 88.0^\circ$ ) im Vergleich zu UDP-Gal mit einem geringen Anteil an nördlichen Konformationen ( $\phi = -23.0^\circ$ , Abbildung 6-11 a, Tabelle 6-8). Das Populationsmaximum der nördlichen Konformation ist im Vergleich zu UDP-Gal deutlich in östliche Regionen verschoben, so dass die nördliche Konformation von 56dihydroUDP-Gal durch eine pseudoäquatorialere Stellung der Base gekennzeichnet ist. Laut MD-Rechnung sind die Konformationen der Base und der Ribose miteinander korreliert. Die Ribose bevorzugt eine eher westliche Konformation ( $\phi = 90^\circ$ ) bei einer *anti*-Orientierung der Base ( $\chi = -160^\circ$ ), während sie eine östlichere Konformation einnimmt, wenn sich die Base nach *high-anti* orientiert ( $\phi = 120^\circ$ ,  $\chi = -60^\circ$ ,



Abbildung 6-12 a). Die Änderung im konformativen Verhalten der Ribose und der Base wirkt sich auf die Konformation des Gesamtmoleküls aus. 56dihydroUDP-Gal liegt bevorzugt in der  $G_{\text{front}}$ -Familie vor mit lediglich geringen Anteilen an  $G_{\text{behind}}$  und  $G_{\text{down}}$  (Abbildung 6-11 c, Tabelle 6-8). Die von UDP-Gal und UDP-Glc favorisierten Konformationfamilien E und  $G_{\text{behind}}$  sind wesentlich schwächer besetzt. Insgesamt ist 56dihydroUDP-Gal sehr viel stärker gefaltet als UDP-Glc und UDP-Gal, wodurch der über die MD-Zeit gemittelte Winkel  $\kappa$ , der ein Maß für die Stärke der Faltung ist, deutlich abgenommen hat ( $\langle \kappa \rangle = 97.3^\circ$ , Tabelle 6-8, Abbildung 6-11 d), sowie auch die  $G_{\text{front}}$ -Familie eine starke Faltung aufweist (kleines  $\kappa$  bei  $\lambda = 70^\circ$ , Abbildung 6-12 h).

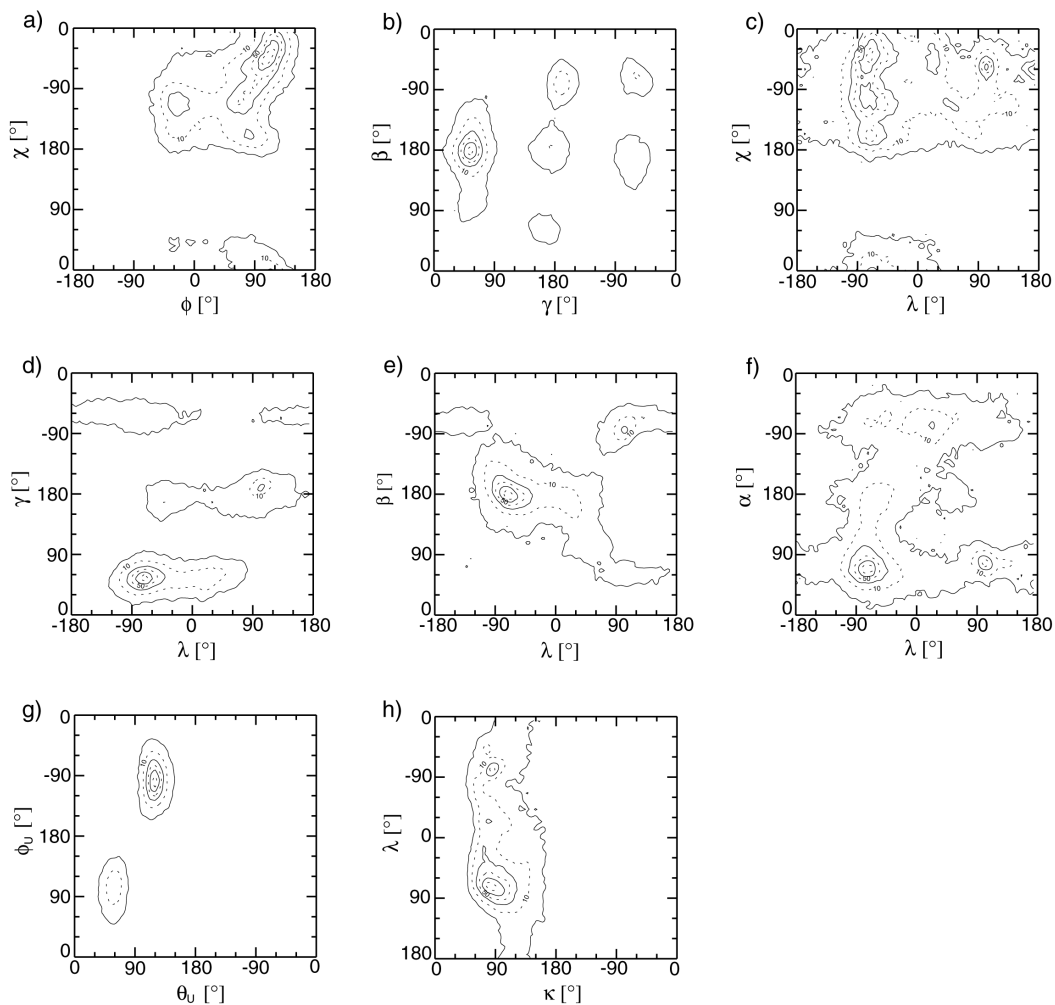
Die stärkere Faltung des Moleküls wirkt sich auf zwei weitere Torsionswinkel aus. Wie bei UDP-Glc und UDP-Gal bereits festgestellt wurde, ist der Torsionswinkel  $\alpha$  entlang der O5'-P $_{\alpha}$ -Bindung sensitiv für die Konformation des Gesamtmoleküls. Er verändert sein Rotamerengleichgewicht zu Gunsten der *sc*-Orientierung (Tabelle 6-8) und ermöglicht somit die bevorzugte  $G_{\text{front}}$ -Familie des Moleküls. Die Orientierung des Torsionswinkels  $\psi$  entlang der P $_{\beta}$ -O1"-Bindung ändert sich ebenfalls auf Grund der veränderten Gesamtkonformation des Moleküls. Dieser bevorzugt klar eine der *ap*-Orientierung (Tabelle 6-8).



**Abbildung 6-11:** Ergebnisse einer MD-Simulation von 56dihydroUDP-Gal unter Verwendung des neu parametrisierten AMBER91/GLYCAM93-Kraftfelds und zusätzlichen NMR-Randbedingungen. Populationverteilungen [%] des a) Torsionswinkels  $\chi$  der Base, b) Pseudorotationsparameters  $\phi$  der Ribose c) Diederwinkels  $\lambda$  der Gesamtkonformation und d) Winkels  $\kappa$  der Gesamtkonformation.

## 6. Konformation von Zuckernucleotiden

Insgesamt sind die Torsionswinkel  $\gamma$  der exocyclischen Gruppe der Ribose,  $\beta$  entlang der C5'-O5'-Bindung und der Torsionswinkel  $\alpha$  stark mit der Gesamtkonformation korreliert. In der  $G_{\text{front}}$ -Familie nimmt der Torsionswinkel  $\gamma$  eine *gg*-,  $\beta$  eine *ap*- und  $\alpha$  eine *sc*-Orientierung ein. In der  $G_{\text{down}}$ -Familie hingegen bevorzugt 56dihydroUDP-Gal eine *gt*-Orientierung des Torsionswinkels  $\gamma$ , einen Wert für  $\beta = -90^\circ$  und eine *sc*-Orientierung des Torsionswinkels  $\alpha$  (Abbildung 6-12 d-f). Wie bei UDP-Gal und UDP-Glc ist die *gg/ap*-Konformation der Torsionswinkel  $\gamma$  und  $\beta$  stark vorherrschend (Abbildung 6-12 b), so dass man auch hier von einer gewissen Rigidität des Nucleotids sprechen kann.



**Abbildung 6-12:** Ergebnisse einer MD-Simulation von 56dihydroUDP-Gal unter Verwendung des neu parametrisierten AMBER91/GLYCAM93-Kraftfelds und zusätzlicher NMR-Randbedingungen. Konturdiagramme der Populationen der a) Freiheitsgrade  $\chi$  der Base und  $\phi$  der Ribose b) Torsionswinkel  $\beta$  entlang der C5'-O5'-Bindung und  $\gamma$  der exocyclischen Gruppe der Ribose c) Diederwinkel  $\chi$  und  $\lambda$  der Gesamtkonformation d) Diederwinkel  $\gamma$  und  $\lambda$ , e) Diederwinkel  $\beta$  und  $\lambda$ , f) Diederwinkel  $\alpha$  entlang der O5'-P $_{\alpha}$ -Bindung und  $\lambda$ , g) Pseudorotationsparameter  $\phi_U$  und  $\theta_U$  des Uracilrings und h) Freiheitsgrade  $\lambda$  und  $\kappa$ .

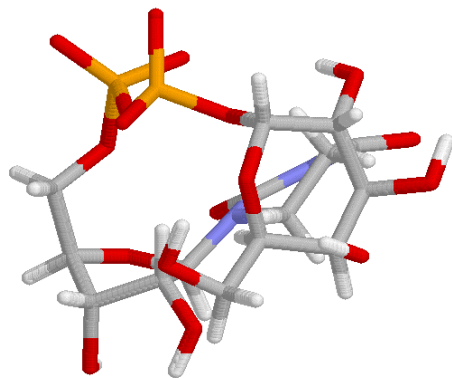
**Tabelle 6-8:** Ergebnisse einer MD-Simulation von 56dihydroUDP-Gal mit dem neu parametrisierten AMBER91/GLYCAM93-Kraftfeld und zusätzlichen NMR-Randbedingungen bei 300 K über einen Zeitraum von 20 ns.

| 56dihydroUDP-Gal                 |            |                     |
|----------------------------------|------------|---------------------|
|                                  | Population | $\Delta G$ [kJ/mol] |
| $X_{\text{syn}}(\chi)$           | 0.05       | 6.97                |
| $X_{\text{anti}}(\chi)$          | 0.21       | 3.11                |
| $X_{\text{high-anti}}(\chi)$     | 0.74       | 0.00                |
| $X_{\text{N}}(\phi)$             | 0.16       | 4.14                |
| $X_{\text{S}}(\phi)$             | 0.84       | 0.00                |
| $X_{\text{gg}}(\gamma)$          | 0.70       | 0.00                |
| $X_{\text{gt}}(\gamma)$          | 0.19       | 3.27                |
| $X_{\text{tg}}(\gamma)$          | 0.11       | 4.72                |
| $X_{\text{sc}}(\beta)$           | 0.06       | 6.42                |
| $X_{\text{-sc}}(\beta)$          | 0.15       | 4.18                |
| $X_{\text{ap}}(\beta)$           | 0.79       | 0.00                |
| $X_{\text{sc}}(\alpha)$          | 0.56       | 0.00                |
| $X_{\text{-sc}}(\alpha)$         | 0.26       | 1.93                |
| $X_{\text{ap}}(\alpha)$          | 0.18       | 2.78                |
| $X_{\text{sc}}(\delta')$         | 0.51       | 0.00                |
| $X_{\text{-sc}}(\delta')$        | 0.48       | 0.16                |
| $X_{\text{ap}}(\delta')$         | 0.01       | 8.34                |
| $X_{\text{sc}}(\psi)$            | 0.15       | 3.92                |
| $X_{\text{-sc}}(\psi)$           | 0.15       | 3.78                |
| $X_{\text{ap}}(\psi)$            | 0.70       | 0.00                |
| $X_{\text{sc}}(\phi_{\text{G}})$ | 0.67       | 0.00                |
| $X_{\text{ac}}(\phi_{\text{G}})$ | 0.33       | 1.77                |
| $X_{\text{gg}}(\omega)$          | 0.06       | 5.46                |
| $X_{\text{gt}}(\omega)$          | 0.56       | 0.00                |
| $X_{\text{tg}}(\omega)$          | 0.38       | 0.96                |
| $X_{\text{E}}$                   | 0.16       | 2.52                |
| $X_{\text{G,behind}}$            | 0.17       | 2.37                |
| $X_{\text{G,front}}$             | 0.44       | 0.00                |
| $X_{\text{G,up}}$                | 0.07       | 4.59                |
| $X_{\text{G,down}}$              | 0.16       | 2.52                |
| $\langle \kappa \rangle$ [°]     | 97.3       |                     |
| $\phi(\text{N})$ [°]             | -23.0      |                     |
| $q(\text{N})$ [Å]                | 0.348      |                     |
| $\phi(\text{S})$ [°]             | 88.0       |                     |
| $q(\text{S})$ [Å]                | 0.372      |                     |
| $Q_{\text{Pyr}}$ [Å]             | 0.561      |                     |
| $\phi_{\text{Pyr}}$ [°]          | -169.5     |                     |
| $\theta_{\text{Pyr}}$ [°]        | 172.0      |                     |

## 6. Konformation von Zuckernucleotiden

---

56dihydroUDP-Gal nimmt am häufigsten eine Konformation in Lösung ein, bei der  $\chi$  in *high-anti*-,  $\phi$  in Süd-,  $\gamma$  in gg-,  $\beta$  in *ap*-,  $\alpha$  in *sc*-,  $\delta'$  in *sc*-,  $\psi$  in *ap*-,  $\phi_G$  in *sc*- und  $\omega$  in *gt*-Konformation vorliegt. Sie gehört der  $G_{\text{front}}$ -Familie an und ist zu 3.8 % der MD-Simulationszeit besetzt (Abbildung 6-13).



**Abbildung 6-13:** Häufigste Konformation von 56dihydroUDPGal in Lösung.

### 6.3.2. Vergleich theoretischer und experimenteller NMR-Daten

Wie bei den Zuckernucleotiden UDP-Gal und UDP-Glc existieren einige NOE-Kontakte zwischen dem Nucleosid und der Pyranose:  $H2'/H3''$ ,  $H3'/H1''$ ,  $H3'/H3''$ ,  $H5'R+S/H1''$  und  $H5'R+S/H3''$  (Tabelle 6-10). Sie belegen die Existenz von einem nicht unbedeutendem Anteil an gefalteten Konformationen. Darüber hinaus gibt es noch weitere NOE-Kontakte zwischen Pyranose und Nucleosid, die von überlagerten Signalen stammen wie z.B. der NOE  $H2'/H4'+H5''$ . Sie werden in ihrer Größe jedoch von den innercyclischen Protonen dominiert, so dass sie wenig sensitiv für Abstandsänderungen der extracyclischen Protonen sind und sich deshalb nicht zur Überprüfung der Gesamtkonformation eignen. Neben dem erwähnten Signal  $H4'+H5''$  wurden die Resonanzen  $H5'R+S$  und  $H6'R+S$  zusammen integriert. Die übrigen Signale waren gut separiert.

Der Vergleich der experimentellen<sup>153</sup> und theoretisch ermittelten Kopplungskonstanten ergab eine gute Korrelation. Eine größere Abweichung besteht, analog zu den bisher untersuchten Nucleosiden, in der vicinalen Kopplung  $^3J_{H4',H5'S}$ , die vermutlich auf die Parametrisierung der Karplus-Beziehung zurückzuführen ist (vgl. Kapitel 5.3.2) und nicht auf eine falsch berechnete Rotamerenverteilung des Torsionswinkels  $\gamma$ . Bezüglich des Torsionswinkels  $\beta$  existie-

ren drei vicinale Kopplungen. Unter der Voraussetzung, dass die Substituenten entlang dieser C5'-P $_{\alpha}$ -Bindung eine optimal gestaffelte Konformationen einnehmen, genügen zwei Kopplungskonstanten zur Überprüfung des Rotamerenverhältnisses, so dass das System überbestimmt ist. Der Vergleich der zwei experimentellen und berechneten H,P-Kopplungen entlang der C5'-P $_{\alpha}$ -Bindung belegt ein korrekt berechnetes Rotamerengleichgewicht. Dennoch existiert eine Abweichung von etwa 1 Hz in der dritten vicinalen Kopplung  $^3J_{C4',P\alpha}$ , die somit auch hier auf eine fehlerhafte Parametrisierung der Karplus-Beziehungen hindeutet.

**Tabelle 6-9:** Durch eigene Messungen ergänzte experimentelle<sup>153</sup> und theoretisch ermittelte Kopplungskonstanten von 56dihydroUDP-Gal.

|                      | 56dihydroUDP-Gal [Hz] |                    |
|----------------------|-----------------------|--------------------|
|                      | exp. <sup>a)</sup>    | ber. <sup>b)</sup> |
| $^3J_{H1',H2'}$      | 7.0                   | 6.5                |
| $^3J_{H2',H3'}$      | 5.5                   | 6.2                |
| $^3J_{H3',H4'}$      | 2.7                   | 2.7                |
| $^3J_{H4',H5'R}$     | 3.2                   | 3.4                |
| $^3J_{H4',H5'S}$     | 3.1                   | 3.8                |
| $^3J_{H5'R,P\alpha}$ | 5.2                   | 4.8                |
| $^3J_{H5'S,P\alpha}$ | 5.6                   | 5.9                |
| $^3J_{C4',P\alpha}$  | 9.1                   | 8.1                |
| $^3J_{C2'',P\beta}$  | 8.3                   | 7.6                |
| $^3J_{H1'',P\beta}$  | 7.2                   | 7.2                |
| $^3J_{H1'',H2''}$    | 3.7                   | 3.9                |
| $^3J_{H2'',H3''}$    | 10.3                  | 9.6                |
| $^3J_{H3'',H4''}$    | 3.4                   | 2.9                |
| $^3J_{H4'',H5''}$    | 1.0                   | 1.2                |
| $^3J_{H5'',H6''R}$   | 7.2                   | 7.0                |
| $^3J_{H5'',H6''S}$   | 5.2                   | 5.4                |

a) LAOCOON-Simulation

b) mit Karplus-Beziehungen<sup>76,90</sup>

Auf Grund fehlender fester Protonenabstände zu bereits zugeordneten Wasserstoffatomen konnten weder die Resonanzen H5a+b noch H6a+b eindeutig den prochiralen Wasserstoffatomen H5R+S und H6R+S mit Hilfe von NOE-Aufbaukurven zugeordnet werden. Vor allem wäre eine Identifizierung der prochiralen Wasserstoffatome H6R+S für die Konformationsbestimmung der Base wichtig. Die MD-Simulation gab zwar Hinweise darauf, dass die Resonanz H6b dem prochiralen Wasserstoffatom H6S zuzuordnen sei, da so die beste Übereinstimmungen zwischen experimentellen und theoretisch ermittelten Daten erzielt wurden. Dennoch wäre eine vertauschte Zuordnung möglich, wodurch sich ein höherer Anteil an *anti*-Konformationen und ein geringerer Anteil an *high-anti*-Orientierungen ergeben

## 6. Konformation von Zuckernucleotiden

würde. Auf eine detaillierte Beschreibung der NOE-Aufbaukurven soll hier verzichtet werden, da die Differenzen in den NOEs und den daraus resultierenden Fehlern in den Protonendistanzen genügend aussagekräftig sind (Tabelle 6-10). Mit der Zuordnung H6b zu H6S ergeben sich gute Übereinstimmungen zwischen experimentellen und theoretisch ermittelten NOE-Aufbaukurven bezüglich der Orientierung der Base, der Ribose und des Gesamtmoleküls. Weniger gute Korrelationen ergaben sich alleine bei den Protonen der Galactose, die auf eine optimalere Sesselkonformation hindeuten. Insgesamt wurde aber eine sehr gute Übereinstimmung zwischen experimentellen und theoretisch ermittelten NMR-Daten berechnet (Tabelle 6-9, Tabelle 6-10), so dass die Ergebnisse der Simulation als zuverlässig angesehen werden können.

**Tabelle 6-10:** Arithmetisch gemittelte Abweichungen der experimentellen von den berechneten NOEs ( $\Delta\text{NOE}$ ), über die MD-Zeit gemittelte Protonenabstände ( $\langle d_{\text{Calc}} \rangle$ ) und in Näherung berechnete Fehler der MD-Simulation von 56dihydroUDP-Gal bei 300 K ( $\Delta\langle d \rangle$ ).

| Name           | $\Delta\text{NOE}$ [%] | $\langle d_{\text{Calc}} \rangle$ [Å] <sup>a)</sup> | $\Delta\langle d \rangle$ [Å] |
|----------------|------------------------|-----------------------------------------------------|-------------------------------|
| H6R/H1'        | 13.89                  | 3.58                                                | -0.02                         |
| H6R/H2'        | 23.07                  | 2.40                                                | -0.08                         |
| H6S/H1'        | 12.44                  | 3.59                                                | -0.06                         |
| H6S/H2'        | 69.22                  | 2.85                                                | -0.26                         |
| H1'/H2'        | 25.93                  | 3.02                                                | -0.10                         |
| H1'/H4'+H5"    | 0.00                   | 3.27                                                | 0.00                          |
| H2'/H4'+H5"    | 25.21                  | 3.82                                                | -0.14                         |
| H2'/H3"        | 11.15                  | 5.73                                                | -0.08                         |
| H2'/H5'R+S     | 9.14                   | 3.77                                                | 0.06                          |
| H3'/H4'+H5"    | 2.37                   | 2.82                                                | 0.00                          |
| H3'/H5'R+S     | 6.92                   | 2.75                                                | 0.03                          |
| H3'/H1"        | 24.02                  | 6.29                                                | 0.26                          |
| H3'/H3"        | 37.88                  | 5.75                                                | -0.21                         |
| H4'+H5"/H1"    | 54.52                  | 3.64                                                | -0.24                         |
| H4'+H5"/H3"    | 29.96                  | 2.55                                                | -0.11                         |
| H4'+H5"/H4"    | 15.68                  | 2.42                                                | -0.06                         |
| H4'+H5"/H6"R+S | 0.00                   | 2.70                                                | 0.00                          |
| H5'R+S/H1"     | 21.23                  | 6.11                                                | -0.20                         |
| H5'R+S/H3"     | 28.25                  | 6.11                                                | 0.31                          |
| H1"/H2"        | 2.24                   | 2.36                                                | -0.01                         |
| H1"/H3"        | 88.69                  | 3.80                                                | -0.42                         |
| H2"/H4"        | 81.70                  | 3.78                                                | -0.39                         |
| H3"/H4"        | 36.70                  | 2.41                                                | 0.18                          |
| H4"/H6"R+S     | 46.08                  | 2.86                                                | -0.19                         |

<sup>a)</sup> bei Signalüberlagerungen wurde der kleinste Protonenabstand verwendet.

## 6.4. 2'-Desoxyuridin-5'-O-diphosphor- $\alpha$ -galactose (2dUDP-Gal)

### 6.4.1. Ergebnisse einer MD-Simulation

Aus den bisherigen Simulationen der Zuckernucleotide wurde ersichtlich, dass die Berechnungen mit dem AMBER-Kraftfeld fehlerhaft bezüglich der Entfernungen zwischen Base und exocyclischer Gruppe sind bzw. die Pyranose eine optimalere Sesselkonformation einnehmen müsste. Signalüberlagerungen auf Grund von Zerfallsprodukten erschwerten jedoch die Integration unter anderem der Kreuzsignale H3"/H5" und H1'/H4' (s.u.), so dass hieraus keine Abstandsrandbedingungen erstellt werden konnten. Die gewählten Randbedingungen H1'/H4', C5'/N1 und H3"/H5" orientieren sich deshalb an den Ergebnissen der übrigen MD-Simulationen.

Die Desoxygenierung am Kohlenstoffatom C2' beeinflusst nicht wesentlich die Orientierung der Base, so dass aus der MD-Simulation ein Populationsgleichgewicht des Torsionswinkels  $\chi$  berechnet wurde, der annähernd dem von UDP-Gal entspricht mit einer stark populierte *anti*-Konformation ( $\chi = -160^\circ$ ) und Nebenmaxima in der *syn*- ( $\chi = 45^\circ$ ) und *high-anti*-Region ( $\chi = -60^\circ$ ) (Abbildung 6-14 a, Tabelle 6-11). Die Orientierung der Base ist wie bei den bisher untersuchten Zuckernucleotiden von der Gesamtkonformation des Moleküls abhängig. In der  $G_{\text{behind}}$ -Familie liegt die Base in der gewöhnlichen *anti*-Orientierung vor ( $\chi = -170^\circ$ ,  $\lambda = -60^\circ$ , Abbildung 6-14 f). In der  $G_{\text{front}}$ -Familie hingegen nimmt die Base etwas häufiger *high-anti*-Orientierungen ein ( $\chi = -150^\circ$ ,  $\lambda = 50^\circ$ , Abbildung 6-14 f).

Auf die Konformation des Riboserings übt die Desoxygenierung hingegen entscheidenden Einfluss aus. Während das Verhältnis von Nord- und Süd-Konformationen bei UDP-Gal nahezu ausgeglichen ist, ergab sich laut MD-Rechnung von 2dUDP-Gal eine Bevorzugung der südlichen Konformere ( $\phi = 63.4^\circ$ ) gegenüber den nördlichen ( $\phi = -93.8^\circ$ , Tabelle 6-11), wobei die Nord-Konformationen durch außergewöhnlich pseudoaxiale Stellung der Base gekennzeichnet sind. Die Nord- und Süd-Konformere weisen jeweils nur noch ein Populationsmaximum auf, sind also im Gegensatz zu UDP-Gal nicht weiter unterteilt (Abbildung 6-14 b, Tabelle 6-11). Wie bei allen in dieser Arbeit untersuchten Nucleosidbausteinen ermittelte die MD-Simulation eine Korrelation zwischen der Konformation der Ribose und der Base, jedoch mit einer veränderten Ursache-Wirkungs-Beziehung. Während bei den bisher untersuchten Nucleosidbausteinen eine direkte Auswirkung der Base auf die Konformation der Ribose zu erkennen war, beeinflusst hier die Kon-

## 6. Konformation von Zuckernucleotiden

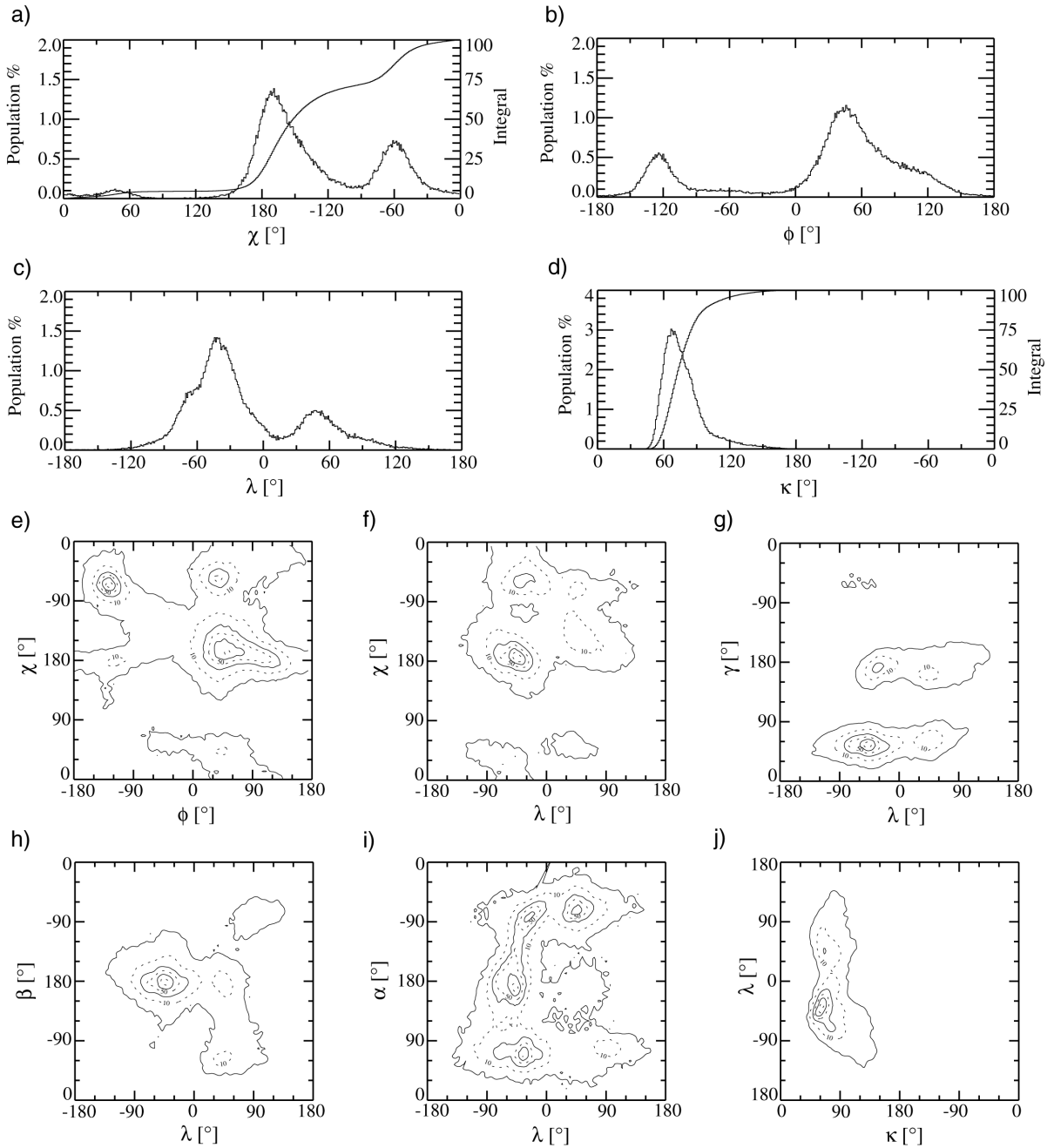
---

formation der Ribose offensichtlich die Populationsverteilung der Base: In der nördlichen Konformation der Ribose tritt verstärkt die *high-anti*-Orientierung auf ( $\chi = -60^\circ$ ,  $\phi = -120^\circ$ , Abbildung 6-14 e). In der Süd-Konformation hingegen bevorzugt die Base eher die *syn*- und die *anti*-Orientierung ( $\chi = 45^\circ$ ,  $\phi = 45^\circ$  und  $\chi = -160^\circ$ ,  $\phi = 45^\circ$  Abbildung 6-14 e).

Die Gesamtkonformation wird ebenfalls durch die Substitution am Kohlenstoffatom C2' deutlich beeinflusst. Laut MD-Simulation weist 2dUDP-Gal eine deutlich stärkere Faltung auf als UDP-Gal ( $\langle \kappa \rangle = 78.4^\circ$ , Tabelle 6-11, Abbildung 6-14 d), so dass kaum noch gestreckte Konformationen vorhanden sind. Die Menge der  $G_{\text{front}}$ -Familie hat ebenfalls deutlich zugenommen (Abbildung 6-14 c, Tabelle 6-11). Die Galactose in sich ist etwas anders zum Nucleosid gedreht, wodurch die Lage der  $G_{\text{up}}$ -Familie verschoben ist ( $0^\circ < \lambda < 30^\circ$ ). Dadurch weist der Diederwinkel  $\lambda$ , der die Gesamtkonformation beschreibt, Verschiebungen in seinen Populationsmaxima auf.

Die Änderung in der Gesamtkonformation wirkt sich auf die Konformation des Pyrophosphats aus. Vor allem der Diederwinkel  $\delta'$  und der Torsionswinkel  $\psi$  entlang der  $P_\beta$ -O1"-Bindung zeigen eine unterschiedliche Rotamerenverteilung im Vergleich zu UDP-Gal, wodurch die veränderte Drehung der Galactose verursacht wird (Tabelle 6-11). Im Gegensatz zu UDP-Gal, ist der Torsionswinkel  $\alpha$  entlang der O5'- $P_\alpha$ -Bindung nicht so eindeutig mit der Gesamtkonformation korreliert. Allerdings existiert noch eine deutliche Bevorzugung der *sc*-Orientierung von  $\alpha$  in der  $G_{\text{behind}}$ -Familie ( $\alpha = -60^\circ$ ,  $\lambda = 45^\circ$ , Abbildung 6-14 i).





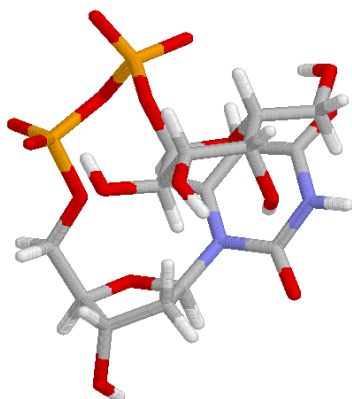
**Abbildung 6-14:** Ergebnisse einer MD-Simulation von 2dUDP-Gal unter Verwendung des neu parametrisierten AMBER91/GLYCAM93-Kraftfelds und zusätzlicher NMR-Randbedingungen. Populationverteilungen [%] des a) Torsionswinkels  $\chi$  der Base, b) Pseudorotationsparameters  $\phi$  der Ribose, c) Diederwinkels  $\lambda$  der Gesamtkonformation und d) Winkels  $\kappa$  der Gesamtkonformation. Konturdiagramme der Populationen der e) Freiheitsgrade der Base  $\chi$  und  $\phi$ , f) Diederwinkel  $\chi$  und  $\lambda$  der Gesamtkonformation g) Diederwinkel  $\gamma$  der exocyclischen Gruppe und  $\lambda$ , h) der Diederwinkel entlang der C5'-O5'-Bindung  $\beta$  und  $\lambda$  und i) der Diederwinkel entlang der O5'-P $_{\alpha}$ -Bindung  $\alpha$  und  $\lambda$  und j) der Parameter  $\lambda$  und  $\kappa$ .

## 6. Konformation von Zuckernucleotiden

**Tabelle 6-11:** Ergebnisse einer MD-Simulation von 2dUDP-Glc mit dem neu parametrisierten AMBER91/GLYCAM93-Kraftfeld und zusätzlichen NMR-Randbedingungen bei 300 K über einen Zeitraum von 20 ns.

| 2dUDP-Gal                         |            |                     |
|-----------------------------------|------------|---------------------|
|                                   | Population | $\Delta G$ [kJ/mol] |
| $X_{\text{syn}}(\chi)$            | 0.05       | 6.76                |
| $X_{\text{anti}}(\chi)$           | 0.67       | 0.00                |
| $X_{\text{high-anti}}(\chi)$      | 0.28       | 2.18                |
| $X_{\text{N}}(\phi)$              | 0.24       | 2.86                |
| $X_{\text{S}}(\phi)$              | 0.76       | 0.00                |
| $X_{\text{gg}}(\gamma)$           | 0.70       | 0.00                |
| $X_{\text{gt}}(\gamma)$           | 0.28       | 0.30                |
| $X_{\text{tg}}(\gamma)$           | 0.02       | 9.34                |
| $X_{\text{sc}}(\beta)$            | 0.05       | 5.32                |
| $X_{\text{-sc}}(\beta)$           | 0.10       | 7.15                |
| $X_{\text{ap}}(\beta)$            | 0.85       | 0.00                |
| $X_{\text{sc}}(\alpha)$           | 0.35       | 0.36                |
| $X_{\text{-sc}}(\alpha)$          | 0.31       | 0.00                |
| $X_{\text{ap}}(\alpha)$           | 0.34       | 0.05                |
| $X_{\text{sc}}(\delta')$          | 0.10       | 5.36                |
| $X_{\text{-sc}}(\delta')$         | 0.89       | 0.00                |
| $X_{\text{ap}}(\delta')$          | 0.01       | 15.27               |
| $X_{\text{sc}}(\psi)$             | 0.66       | 0.00                |
| $X_{\text{-sc}}(\psi)$            | 0.10       | 4.76                |
| $X_{\text{ap}}(\psi)$             | 0.24       | 2.55                |
| $X_{\text{sc}}(\phi_{\text{G}})$  | 0.76       | 0.00                |
| $X_{\text{ac}}(\phi_{\text{G}})$  | 0.24       | 2.86                |
| $X_{\text{gg}}(\omega)$           | 0.04       | 6.52                |
| $X_{\text{gt}}(\omega)$           | 0.59       | 0.00                |
| $X_{\text{tg}}(\omega)$           | 0.37       | 1.18                |
| $X_{\text{E}}$                    | 0.04       | 7.07                |
| $X_{\text{G,behind}}$             | 0.19       | 2.18                |
| $X_{\text{G,front}}$              | 0.68       | 0.00                |
| $X_{\text{G,up}}$                 | 0.05       | 6.51                |
| $X_{\text{G,down}}$               | 0.03       | 7.78                |
| $\langle \kappa \rangle [^\circ]$ | 78.4       |                     |
| $\phi(\text{N}) [^\circ]$         | -93.8      |                     |
| $q(\text{N}) [\text{\AA}]$        | 0.323      |                     |
| $\phi(\text{S}) [^\circ]$         | 63.4       |                     |
| $q(\text{S}) [\text{\AA}]$        | 0.336      |                     |
| $Q_{\text{Pyr}} [\text{\AA}]$     | 0.566      |                     |
| $\phi_{\text{Pyr}} [^\circ]$      | -174.4     |                     |
| $\theta_{\text{Pyr}} [^\circ]$    | 172.1      |                     |

2dUDP-Gal nimmt am häufigsten eine Konformation in Lösung ein, bei der  $\chi$  in *anti*-,  $\phi$  in Süd-,  $\gamma$  in *gg*-,  $\beta$  in *ap*-,  $\alpha$  in *ap*-,  $\delta'$  in *-sc*-,  $\psi$  in *sc*-,  $\phi_G$  in *sc*- und  $\omega$  in *gt*-Konformation vorliegt. Sie ist zu 5.5 % der MD-Simulationszeit besetzt und ist der  $G_{\text{front}}$ -Familie zuzuordnen.



**Abbildung 6-15:** Häufigste Konformation von 2dUDP-Gal in Lösung.

#### 6.4.2. Vergleich theoretischer und experimenteller NMR-Daten

Zur NMR-spektroskopischen Untersuchung von 2dUDP-Gal stand lediglich eine Probe mit einem Reinheitsgrad von 75% zur Verfügung. 25% waren die Zerfallsprodukte 2dUMP und GalP. Die Signale der  $^1\text{H}$  NMR-Spektren konnten trotz Überlagerungen zugeordnet und ihre Kopplungskonstanten eindeutig analysiert werden. Probleme gab es hingegen bei den NOE-Aufbaukurven. Praktisch alle Protonen der Zerfallsprodukte weisen eine ähnliche chemische Verschiebung wie die des Zuckernucleotids auf, so dass die Kreuzsignale zusammen integriert wurden. Das führte zu verfälschten NOE-Aufbaukurven. Alleine die Resonanz von H6 war gut separiert, wodurch alle betreffenden NOEs eindeutig vom Zuckernucleotid stammen. Die übrigen NOE-Kreuzsignale sind durch Verunreinigungen beeinflusst. Allerdings wurde davon ausgegangen, dass die aussagekräftigen NOE-Kontakte zwischen Nucleosid und Pyranose lediglich vom Zuckernucleotid stammen und nicht bei den Verunreinigungen auftreten, da intermolekulare NOEs in verdünnten Lösungen prinzipiell keine Rolle spielen. Aus diesem Grund wurden mit der Ausnahme von H1'/H4', C5'/N1 und H3''/H5'' nur Abstandsrandbedingungen zwischen Nucleosid und Galactose verwendet.

Die experimentellen und theoretisch ermittelten Kopplungskonstanten korrelieren gut hinsichtlich der Rotamerengleichgewichte des Torsionswinkels  $\beta$  entlang der C5'-O5'-Bindung

## 6. Konformation von Zuckernucleotiden

und der Torsionswinkel  $\gamma$  und  $\omega$  der exocyclischen Gruppe der Ribose und der Pyranose. Die Pyranose selbst ist laut Kopplungskonstanten ebenfalls gut berechnet worden. Bezüglich der vicinalen Kopplungskonstanten  $^3J_{H1,H2'S}$  und  $^3J_{H1,H2'R}$  treten etwas größere Diskrepanzen auf (Tabelle 6-12), die zwei Ursachen haben können. Entweder ist die Position der Base zu sehr in äquatorialer Stellung berechnet worden, so dass die Populationsmaxima des Pseudorotationsparameters  $\phi$  in Richtung Westen verschoben werden müsste, oder es ist ein zu hoher Anteil an Süd-Konformeren berechnet worden. Die Qualität der zur Verfügung stehenden NMR-Probe (siehe Kapitel 6.4.1) ließ weder eine gesicherte Aufstellung einer Randbedingung bezüglich des Protonenabstands H1'/H4' noch eine Überprüfungen dieser Distanz zu. Insofern lässt sich die Herkunft des Fehlers nicht eindeutig klären. Die Größe der Abweichungen in den Kopplungskonstanten deutet aber darauf hin, dass sich der Fehler in akzeptablen Größenordnungen bewegt.

**Tabelle 6-12:** Durch eigene Messungen ergänzte experimentelle<sup>153</sup> und berechnete Kopplungskonstanten von 2dUDP-Gal.

|                      | 2dUDP-Gal [Hz]     |                    |
|----------------------|--------------------|--------------------|
|                      | exp. <sup>a)</sup> | ber. <sup>b)</sup> |
| $^3J_{H1',H2'S}$     | 6.8                | 8.1                |
| $^3J_{H1',H2'R}$     | 6.8                | 6.0                |
| $^3J_{H2'S,H3'}$     | 6.2                | 6.9                |
| $^3J_{H2'R,H3'}$     | 3.6                | 3.1                |
| $^3J_{H3',H4'}$      | 3.2                | 3.2                |
| $^3J_{H4',H5'R}$     | 3.0                | 3.9                |
| $^3J_{H4',H5'S}$     | 3.2                | 3.3                |
| $^3J_{H5'R,P\alpha}$ | 5.6                | 5.3                |
| $^3J_{H5'S,P\alpha}$ | 4.6                | 4.1                |
| $^3J_{H1'',P\beta}$  | 7.2                | 6.7                |
| $^3J_{H1'',H2''}$    | 3.7                | 3.6                |
| $^3J_{H2'',H3''}$    | 10.2               | 9.7                |
| $^3J_{H3'',H4''}$    | 3.3                | 2.9                |
| $^3J_{H4'',H5''}$    | 0.9                | 1.2                |
| $^3J_{H5'',H6''R}$   | 7.2                | 7.3                |
| $^3J_{H5'',H6''S}$   | 5.2                | 5.3                |

<sup>a)</sup> LAOCOON-Simulation

<sup>b)</sup> mit Karplus-Beziehungen<sup>76,90</sup>

Auf Grund der Verunreinigungen der NMR-Probe waren lediglich die NOE-Aufbaukurven des Protons H6 mit allen übrigen Resonanzen und der Protonen der Pyranose mit dem Nucleosid fehlerfrei auswertbar. Die experimentellen und theoretisch ermittelten NOE-Aufbaukurven dieser Signale stimmen weitgehend überein, mit Ausnahme des Kernabstands

H5/H3'', der über die MD-Simulation gemittelte 6.86 Å beträgt und nach der Zweispinnäherung etwa um 1.14 Å zu hoch liegt (Tabelle 6-13). Er ist sensitiv für die Gesamtkonformation des Moleküls und kann durch die fehlerhafte Berechnung praktisch aller Freiheitsgrade ( $\chi$ ,  $\phi$ ,  $\gamma$ ,  $\beta$ ,  $\alpha$ ,  $\delta'$ ,  $\psi$  und  $\phi_G$ ) oder ihrer additiven Verstärkung zu Stande kommen. Die Integrale der übrigen Kreuzsignale wurden durch die Zerfallsprodukte beeinflusst. Durch diesen experimentellen Fehler sind sie nicht korrekt analysierbar.

Insgesamt zeigt der Vergleich der experimentellen und theoretisch ermittelten vicinalen Kopplungskonstanten sowie die auswertbaren NOE-Aufbaukurven dennoch recht gute Übereinstimmungen, so dass die Ergebnisse der MD-Rechnung weitgehend zuverlässig erscheinen.

**Tabelle 6-13:** Arithmetisch gemittelte Abweichungen der experimentellen von den berechneten NOEs ( $\Delta\text{NOE}$ ), über die MD-Zeit gemittelte Protonenabstände ( $\langle d_{\text{Calc}} \rangle$ ) und in Näherung berechnete Fehler der MD-Simulation von 2dUDP-Gal bei 300 K ( $\Delta\langle d \rangle$ ).

| Name                   | $\Delta\text{NOE}$ [%] | $\langle d_{\text{Calc}} \rangle$ [Å] <sup>a)</sup> | $\Delta\langle d \rangle$ [Å] |
|------------------------|------------------------|-----------------------------------------------------|-------------------------------|
| H5/H6                  | 12.3                   | 2.38                                                | 0.05                          |
| H5/H1''                | 48.3                   | 5.36                                                | 0.54                          |
| H5/H3''                | 165.5                  | 6.86                                                | -1.14                         |
| H6/H1'                 | 22.9                   | 3.44                                                | -0.12                         |
| H6/H2'R+S              | 36.0                   | 3.03                                                | -0.16                         |
| H6/H3'                 | 10.3                   | 4.24                                                | -0.07                         |
| H6/H4'+H5'R+S          | 96.4                   | 4.51                                                | -0.54                         |
| H1'/H2'R+S             | 59.0                   | 2.35                                                | -0.19                         |
| H1'/H3'                | 91.5                   | 3.85                                                | -0.44                         |
| H1'/H4'+H5'R+S         | 22.0                   | 3.21                                                | -0.11                         |
| H1'/H1''               | 29.8                   | 5.46                                                | -0.08                         |
| H2'R+S/H3'             | 64.0                   | 2.34                                                | -0.20                         |
| H2'R+S/H4'+H5'R+S+H5'' | 136.7                  | 3.72                                                | -0.57                         |
| H3'/H4'+H5'R+S+H5''    | 16.1                   | 2.88                                                | -0.07                         |
| H3'/H1''               | 51.3                   | 4.76                                                | 0.51                          |
| H3'/H2''+H6''R+S       | 13.2                   | 5.42                                                | -0.05                         |
| H3'/H3''               | 89.5                   | 6.59                                                | -0.68                         |
| H4'+H5'R+S+H5''/H1''   | 46.3                   | 3.64                                                | 0.36                          |
| H4'+H5'R+S+H5''/H2''   | 71.4                   | 3.90                                                | -0.36                         |
| H4'+H5'R+S+H5''/H3''   | 89.2                   | 2.53                                                | -0.28                         |
| H4'+H5'R+S+H5''/H4''   | 14.7                   | 2.42                                                | -0.05                         |
| H1''/H2''+H6''R+S      | 15.1                   | 2.38                                                | -0.06                         |
| H1''/H3''              | 104.1                  | 3.77                                                | -0.48                         |
| H2''+H6''R+S/H4''      | 114.2                  | 2.83                                                | -0.38                         |
| H3''/H4''              | 12.1                   | 2.42                                                | -0.04                         |

a) bei Signalüberlagerungen wurde der kleinste Protonenabstand verwendet.

### 6.5. 3'-Desoxyuridin-5'-O-diphosphor- $\alpha$ -galactose (3dUDP-Gal)

#### 6.5.1. Ergebnisse

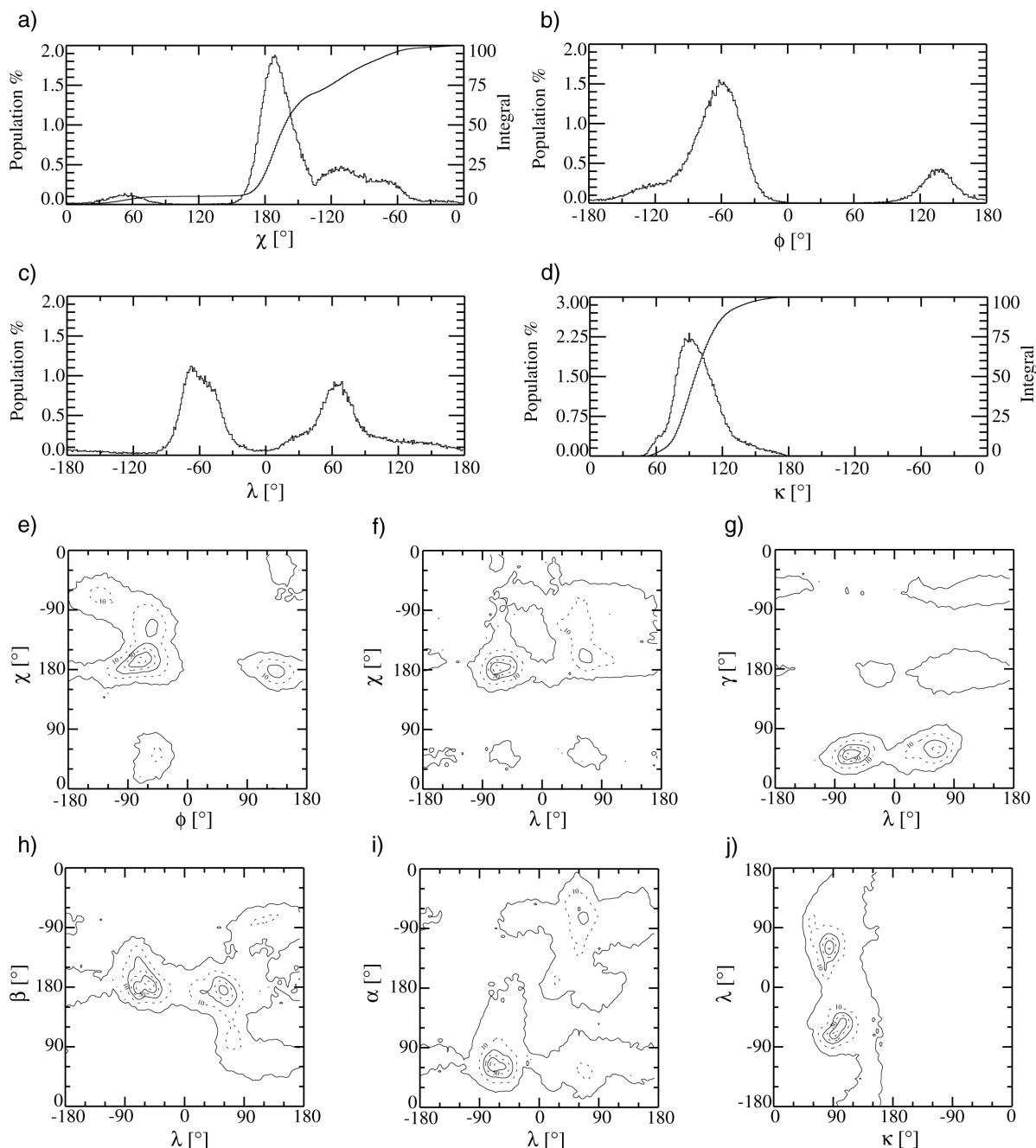
Wie die übrigen Zuckernucleotide wurde auch 3dUDP-Gal mit dem neu parametrisierten AMBER91/GLYCAM93-Kraftfeld moleküldynamisch berechnet. Laut diesen Rechnungen beeinflusst die Desoxygenierung am Kohlenstoffatom C3' entscheidend die Konformation des Riboserings. Ähnlich wie bei dem Nucleosid 3dU (vgl. Kapitel 5.1) herrschen die Nord-Konformationen bei der Ribose vor ( $\phi = -70.5^\circ$ , Abbildung 6-16 b, Tabelle 6-14). Die geringer besetzten südlichen Konformationen weisen ein Populationsmaximum in der westlichen Region auf ( $\phi = 135.3^\circ$ , C4'-*endo*), so dass die Base und die exocyclische Gruppe pseudo-axiale Stellungen einnehmen.

Die MD-Simulation berechnet eine bevorzugte *anti*-Orientierung ( $\chi = -160^\circ$ ) der Base mit einem kleinen Nebenmaximum bei  $\chi = -120^\circ$  (Abbildung 6-16 a, Tabelle 6-14). Die *syn*- ( $\chi = 45^\circ$ ) und *high-anti*-Konformationen ( $\chi = -60^\circ$ ) sind nur gering besetzt. Die Orientierung der Base ist laut MD-Rechnung mit der Konformation der Ribose korreliert. Während die Ribose eine westliche Region favorisiert, wenn die Base in der *high-anti* Konformation vorliegt ( $\phi = -120^\circ$ ,  $\chi = -60^\circ$ ), orientiert sie sich bevorzugt in die östliche Region ( $\phi = -60^\circ$ ) bei allen übrigen Orientierungen der Base (Abbildung 6-16 e). Eine weitere allerdings schwach ausgeprägte Korrelation der Base existiert mit der Gesamtkonformation. In der G<sub>front</sub>-Familie ( $\lambda = -60^\circ$ ) bevorzugt die Base eine *anti*-Orientierung. Die G<sub>behind</sub>-Familie ( $\lambda = 60^\circ$ ) hingegen ist durch eine etwas stärkere *high-anti*-Population der Base gekennzeichnet (Abbildung 6-16 f).

Weitere signifikante Änderungen in der Konformation relativ zu UDP-Gal sind laut MD-Rechnung in den Pyrophosphat betreffenden Diederwinkeln  $\alpha$ ,  $\delta'$  und  $\psi$  zu verzeichnen, die eine veränderte Rotamerenverteilung aufweisen (Tabelle 6-14). Dadurch ist 3dUDP-Gal insgesamt stärker gefaltet als UDP-Gal ( $\langle\kappa\rangle = 98.8^\circ$ , Tabelle 6-14, Abbildung 6-16 d), weist jedoch eine wesentlich geringere Faltung auf als 2dUDP-Gal. Der Anteil der E-Familie ist mit nur noch 14% deutlich geringer als bei UDP-Gal und UDP-Glc. 3dUDP-Gal nimmt vorwiegend eine G<sub>front</sub>- und G<sub>behind</sub>-Konformation ein mit etwa gleichen Besetzungsverhältnissen (Abbildung 6-16 e). Die G<sub>front</sub>-Familie ist zwar etwas weniger stark gefaltet als G<sub>behind</sub> aber wesentlich stärker als bei UDP-Gal und UDP-Glc (Abbildung 6-16 j).

Wie bei allen hier untersuchten Zuckernucleotiden wird durch die MD-Simulation von 3dUDP-Gal eine Korrelation der gg-Konformation der Torsionswinkel  $\gamma$  der exocyclischen Gruppe mit den Familien  $G_{\text{front}}$  und  $G_{\text{behind}}$  berechnet (Abbildung 6-16 g), sowie der Torsionswinkel  $\beta$  entlang der C5'-O5'-Bindung ebenfalls mit diesen Konformationen korreliert ist (Abbildung 6-16 h): Speziell in diesen Orientierungen der beiden genannten Torsionswinkel ist die  $G_{\text{front}}$ - und die  $G_{\text{behind}}$ -Familie stark vertreten, während sie bei abweichenden Orientierungen kaum noch auftreten. Wie bei den übrigen Zuckernucleotiden ist der Torsionswinkel  $\alpha$  entlang der O5'-P $_{\alpha}$ -Bindung ausschlaggebend für die Gesamtkonformation von 3dUDP-Gal: In der *sc*-Orientierung befindet sich das Molekül bevorzugt in der globulären  $G_{\text{front}}$ -Familie ( $\alpha = 60^{\circ}$ ,  $\lambda = -60^{\circ}$ ), in der *-sc*-Orientierung hingegen favorisiert 3dUDP-Gal die  $G_{\text{behind}}$ -Familie ( $\alpha = -60^{\circ}$ ,  $\lambda = 60^{\circ}$ , Abbildung 6-16 i).

## 6. Konformation von Zuckernucleotiden



**Abbildung 6-16:** Ergebnisse einer MD-Simulation von 3dUDP-Gal unter Verwendung des neu parametrisierten AMBER91/GLYCAM93-Kraftfelds und zusätzlicher NMR-Randbedingungen. Populationverteilungen [%] des a) Torsionswinkels  $\chi$  der Base, b) Pseudorotationsparameters  $\phi$  der Ribose, c) Diederwinkels  $\lambda$  der Gesamtkonformation und d) Winkels  $\kappa$  der Gesamtkonformation. Konturdiagramme der Populationen der e) Freiheitsgrade der Base  $\chi$  und  $\phi$ , f) Diederwinkel  $\chi$  und  $\lambda$  der Gesamtkonformation g) Diederwinkel  $\gamma$  der exocyclischen Gruppe und  $\lambda$ , h) der Diederwinkel entlang der C5'-O5'-Bindung  $\beta$  und  $\lambda$  und i) der Diederwinkel entlang der O5'-P $_{\alpha}$ -Bindung  $\alpha$  und  $\lambda$  und j) der Parameter  $\lambda$  und  $\kappa$ .



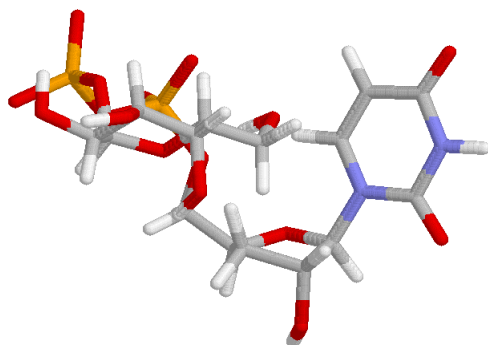
**Tabelle 6-14:** Ergebnisse einer MD-Simulation von 3dUDP-Gal mit dem neu parametrisierten AMBER91/GLYCAM93-Kraftfeld und zusätzlichen NMR-Randbedingungen bei 300 K über einen Zeitraum von 20 ns.

| 3dUDP-Gal                         |            |                     |
|-----------------------------------|------------|---------------------|
|                                   | Population | $\Delta G$ [kJ/mol] |
| $X_{\text{syn}}(\chi)$            | 0.05       | 6.98                |
| $X_{\text{anti}}(\chi)$           | 0.82       | 0.00                |
| $X_{\text{high-anti}}(\chi)$      | 0.13       | 4.66                |
| $X_{\text{N}}(\phi)$              | 0.84       | 0.00                |
| $X_{\text{S}}(\phi)$              | 0.16       | 4.09                |
| $X_{\text{gg}}(\gamma)$           | 0.73       | 0.00                |
| $X_{\text{gt}}(\gamma)$           | 0.15       | 3.93                |
| $X_{\text{tg}}(\gamma)$           | 0.11       | 4.73                |
| $X_{\text{sc}}(\beta)$            | 0.09       | 5.56                |
| $X_{\text{-sc}}(\beta)$           | 0.08       | 5.69                |
| $X_{\text{ap}}(\beta)$            | 0.83       | 0.00                |
| $X_{\text{sc}}(\alpha)$           | 0.54       | 0.00                |
| $X_{\text{-sc}}(\alpha)$          | 0.33       | 1.26                |
| $X_{\text{ap}}(\alpha)$           | 0.13       | 3.48                |
| $X_{\text{sc}}(\delta')$          | 0.74       | 0.00                |
| $X_{\text{-sc}}(\delta')$         | 0.26       | 3.58                |
| $X_{\text{ap}}(\delta')$          | 0.00       | 17.36               |
| $X_{\text{sc}}(\psi)$             | 0.09       | 4.03                |
| $X_{\text{-sc}}(\psi)$            | 0.45       | 0.05                |
| $X_{\text{ap}}(\psi)$             | 0.46       | 0.00                |
| $X_{\text{sc}}(\phi_{\text{G}})$  | 0.63       | 0.00                |
| $X_{\text{ac}}(\phi_{\text{G}})$  | 0.37       | 1.76                |
| $X_{\text{gg}}(\omega)$           | 0.07       | 5.36                |
| $X_{\text{gt}}(\omega)$           | 0.62       | 0.00                |
| $X_{\text{tg}}(\omega)$           | 0.31       | 1.32                |
| $X_{\text{E}}$                    | 0.14       | 2.36                |
| $X_{\text{G,behind}}$             | 0.35       | 0.01                |
| $X_{\text{G,front}}$              | 0.36       | 0.00                |
| $X_{\text{G,up}}$                 | 0.02       | 7.21                |
| $X_{\text{G,down}}$               | 0.13       | 2.54                |
| $\langle \kappa \rangle [^\circ]$ | 98.9       |                     |
| $\phi(\text{N}) [^\circ]$         | -70.5      |                     |
| $q(\text{N}) [\text{\AA}]$        | 0.343      |                     |
| $\phi(\text{S}) [^\circ]$         | 135.3      |                     |
| $q(\text{S}) [\text{\AA}]$        | 0.290      |                     |
| $Q_{\text{Pyr}} [\text{\AA}]$     | 0.565      |                     |
| $\phi_{\text{Pyr}} [^\circ]$      | -167.3     |                     |
| $\theta_{\text{Pyr}} [^\circ]$    | 171.9      |                     |

## 6. Konformation von Zuckernucleotiden

---

Eine noch genauere Analyse der MD-Rechnung von 3dUDP-Gal in Lösung ergibt eine Konformation, bei der  $\chi$  in *anti*-,  $\phi$  in Nord-,  $\gamma$  in gg-,  $\beta$  in *ap*-,  $\alpha$  in *sc*-,  $\delta'$  in *sc*-,  $\psi$  in *-sc*-,  $\phi_G$  in *sc*- und  $\omega$  in *gt*-Konformation vorliegt (Abbildung 6-17). Sie ist zu 8.0 % der MD-Simulationszeit besetzt und gehört der  $G_{\text{front}}$ -Familie an.



**Abbildung 6-17:** Häufigste Konformation von 3dUDP-Gal in Lösung.

### 6.5.2. Vergleich theoretischer und experimenteller NMR-Daten

Der Vergleich experimenteller und theoretisch ermittelter Kopplungskonstanten ergibt in fast allen Fällen eine gute Übereinstimmung (Tabelle 6-15), die eine exakte Berechnung der Rotamerengleichgewichte durch die MD-Simulation bezüglich der Ribose, der Pyranose, des Torsionswinkels  $\beta$  entlang der O5'-P $_{\alpha}$ -Bindung und des Torsionswinkels O1''-P $_{\beta}$ -Bindung bestätigt. Eine Ausnahme bildet wie bei den bisher untersuchten Molekülen die Kopplung  $^3J_{H4',H5'S}$ , die sehr wahrscheinlich auf Grund der fehlerhaften Parametrisierung der Karplus-Beziehung zu einer hohen berechneten Kopplung führt.

**Tabelle 6-15:** Durch eigene Messungen ergänzte experimentelle<sup>153</sup> und berechnete Kopplungskonstanten von 3dUDP-Gal.

|                                      | 3dUDP-Gal [Hz]     |                    |
|--------------------------------------|--------------------|--------------------|
|                                      | exp. <sup>a)</sup> | ber. <sup>b)</sup> |
| <sup>3</sup> J <sub>H1',H2'</sub>    | 2.0                | 2.2                |
| <sup>3</sup> J <sub>H2',H3'R</sub>   | 5.8                | 6.3                |
| <sup>3</sup> J <sub>H2',H3'S</sub>   | 2.7                | 2.3                |
| <sup>3</sup> J <sub>H3'R,H4'</sub>   | 9.6                | 9.3                |
| <sup>3</sup> J <sub>H3'S,H4'</sub>   | 5.9                | 5.9                |
| <sup>3</sup> J <sub>H4',H5'R</sub>   | 3.6                | 3.2                |
| <sup>3</sup> J <sub>H4',H5'S</sub>   | 2.4                | 3.8                |
| <sup>3</sup> J <sub>H5'R,Pα</sub>    | 6.0                | 5.3                |
| <sup>3</sup> J <sub>H5'S, Pα</sub>   | 5.0                | 4.6                |
| <sup>3</sup> J <sub>C4',Pα</sub>     | 7.9                | 8.5                |
| <sup>3</sup> J <sub>C2'',Pβ</sub>    | 8.2                | 7.4                |
| <sup>3</sup> J <sub>H1'',Pβ</sub>    | 7.2                | 7.5                |
| <sup>3</sup> J <sub>H1'',H2''</sub>  | 3.6                | 3.6                |
| <sup>3</sup> J <sub>H2'',H3''</sub>  | 10.2               | 9.6                |
| <sup>3</sup> J <sub>H3'',H4''</sub>  | 3.3                | 3.0                |
| <sup>3</sup> J <sub>H4'',H5''</sub>  | 0.9                | 1.1                |
| <sup>3</sup> J <sub>H5'',H6''R</sub> | 7.2                | 7.3                |
| <sup>3</sup> J <sub>H5'',H6''S</sub> | 5.2                | 4.9                |

<sup>a)</sup> LAOCOON-Simulation<sup>b)</sup> mit Karplus-Beziehungen<sup>76,90</sup>

Das <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von 3dUDP-Gal zeigt gut separierte Signale. Lediglich die Signale H2''+H6''R+S und H5'R+H5'' wurden auf Grund der schlechteren Auflösung der 2D NOE-SY-Spektren zusammen integriert. In 3dUDP-Gal wurde eine ganz Reihe von NOE-Kontakten zwischen dem Nucleosid und der Pyranose gemessen: H5/H2''+H6''R+S, H5/H3'', H5/H5'', H6/H1'', H1/H4'', H2'/H2''+H6''R+S, H4'/H1'' und H5'S/H1'' (Tabelle 6-16). Sie deuten auf eine stärkere Faltung von 3dUDP-Gal hin verglichen mit UDP-Glc und UDP-Gal, so wie es in der MD-Simulation berechnet wurde. Durch die Berechnung des Fehlers zwischen den experimentellen und theoretisch ermittelten NOEs (Tabelle 6-16) wurde eine weitgehende Übereinstimmung deutlich und belegt die überwiegende Richtigkeit der MD-Simulation. Selbst der geschätzte Fehler von 0.62 Å im Protonenabstand H1'/H4'' liegt mit < 10% in einer akzeptablen Größenordnung.

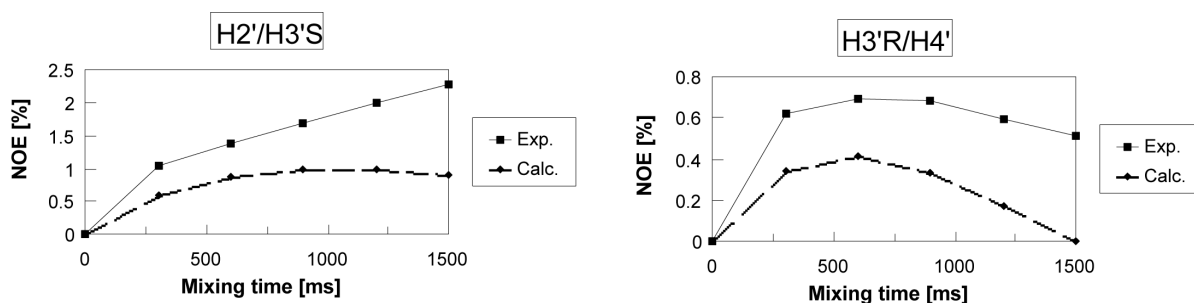
## 6. Konformation von Zuckernucleotiden

**Tabelle 6-16:** Arithmetisch gemittelte Abweichungen der experimentellen von den berechneten NOEs ( $\Delta\text{NOE}$ ), über die MD-Zeit gemittelte Protonenabstände ( $\langle d_{\text{Calc}} \rangle$ ) und in Näherung berechnete Fehler der MD-Simulation von 3dUDP-Gal bei 300 K ( $\Delta\langle d \rangle$ ).

| Name              | $\Delta\text{NOE}$ [%] | $\langle d_{\text{Calc}} \rangle$ [Å] <sup>a)</sup> | $\Delta\langle d \rangle$ [Å] |
|-------------------|------------------------|-----------------------------------------------------|-------------------------------|
| H5/H6             | 7.74                   | 2.38                                                | -0.03                         |
| H5/H2''+H6''R+S   | 34.38                  | 6.22                                                | 0.38                          |
| H5/H3''           | 44.68                  | 7.29                                                | -0.12                         |
| H5/H5''           | 52.68                  | 6.01                                                | -0.21                         |
| H6/H1'            | 32.27                  | 3.49                                                | -0.16                         |
| H6/H2'            | 26.93                  | 3.44                                                | -0.12                         |
| H6/H3'R           | 11.30                  | 3.29                                                | 0.06                          |
| H6/H5'R+H5''      | 61.18                  | 4.24                                                | -0.35                         |
| H6/H5'S           | 49.04                  | 3.87                                                | 0.41                          |
| H6/H1''           | 48.79                  | 6.53                                                | -0.04                         |
| H1'/H2'           | 58.92                  | 2.84                                                | -0.21                         |
| H1'/H4'           | 18.55                  | 3.22                                                | -0.08                         |
| H1'/H4''          | 45.57                  | 6.61                                                | 0.62                          |
| H2'/H3'R          | 24.01                  | 2.36                                                | -0.07                         |
| H2'/H3'S          | 102.48                 | 2.78                                                | -0.33                         |
| H2'/H2''+H6''R+S  | 46.51                  | 2.82                                                | 0.28                          |
| H3'R/H4'          | 4314.56                | 2.98                                                | -2.07                         |
| H3'R/H5'R         | 12.26                  | 2.91                                                | 0.03                          |
| H3'R/H5'S         | 18.47                  | 3.43                                                | 0.10                          |
| H3'S/H4'          | 30.64                  | 2.37                                                | -0.11                         |
| H4'/H5'R+H5''     | 5.45                   | 3.93                                                | -0.01                         |
| H4'/H5'R          | 26.90                  | 2.53                                                | 0.13                          |
| H4'/H5'S          | 8.57                   | 2.52                                                | -0.03                         |
| H4'/H1''          | 24.57                  | 5.53                                                | -0.18                         |
| H5'R/H5'S         | 54.52                  | 1.77                                                | 0.21                          |
| H5'S/H1''         | 26.22                  | 5.25                                                | 0.20                          |
| H1''/H2''         | 23.12                  | 2.38                                                | 0.10                          |
| H1''/H3''         | 55.94                  | 3.78                                                | -0.28                         |
| H1''/H5''         | 33.09                  | 3.65                                                | 0.18                          |
| H2''+H6''R+S/H4'' | 133.20                 | 2.82                                                | -0.42                         |
| H2''/H4''         | 50.83                  | 3.75                                                | -0.16                         |
| H2''/H5''         | 37.30                  | 3.90                                                | -0.18                         |
| H3''/H4''         | 55.88                  | 2.42                                                | -0.18                         |
| H3''/H5''         | 32.97                  | 2.53                                                | -0.12                         |
| H4''/H5''         | 33.26                  | 2.42                                                | -0.12                         |
| H4''/H6''R+S      | 56.77                  | 2.82                                                | -0.20                         |
| H5''/H6''R+S      | 19.95                  | 2.66                                                | -0.08                         |

<sup>a)</sup> bei Signalüberlagerungen wurde der kleinste Protonenabstand verwendet.

Schlechtere Übereinstimmungen ergeben sich lediglich zwischen den experimentellen und theoretisch ermittelten NOE-Aufbaukurven bezüglich der NOEs der Riboseprotonen. Zwei Gründe sind hierfür prinzipiell möglich. Zunächst deutet die Abweichung in den experimentellen und theoretisch ermittelten NOE-Aufbaukurven z.B. von H2'/H3'S oder H3'R/H4' auf eine fehlerhafte MD-Simulation hin. Die betreffenden Kernabstände werden jedoch recht invariant simuliert ( $2.276 \text{ \AA} < d_{\text{H2'}/\text{H3'S}} < 3.229$ ,  $2.364 \text{ \AA} < d_{\text{H3'R}/\text{H4'}} < 3.281 \text{ \AA}$ ), so dass diese Abweichungen lediglich durch NOEs zweiter Ordnung zu erklären sind. Da die übrigen NOE-Aufbaukurven jedoch recht gut korrelieren, scheinen die Protonenabstände für die NOEs zweiter Ordnung durchaus korrekt zu sein. Deshalb ist es wahrscheinlicher, dass sich einzelne Molekülteile von 3dUDP-Gal unterschiedlich schnell bewegen. Wie bei ddU (vgl. Kapitel 5.2.2) zeigen die berechneten NOE-Aufbaukurven der Ribose einen starken Abfall bei längeren Mischzeiten (Abbildung 6-18). Dementsprechend weisen sie eine viel schnellere Relaxation auf, die auf schnellere Molekülbewegungen in diesem Molekülteil hindeuten als im übrigen Molekül. Zur Berechnung der theoretischen NOE-Aufbaukurven wird jedoch eine isotrope, einheitliche Molekülbewegung angenommen – eine Annahme, die in diesem Fall fehlerhaft erscheint.

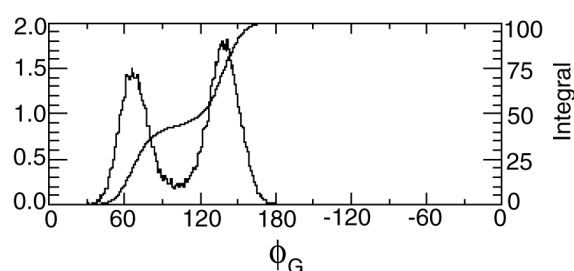


**Abbildung 6-18:** Experimentelle (Exp.) und aus der MD-Simulation erhaltene (Calc.) NOE-Aufbaukurven von 3dUDP-Gal.

### 6.6. Diskussion und stereoelektronische Effekte in Zuckernucleotiden

Auf Grund des *exo*-anomeren Effekts ist der Torsionswinkel  $\phi_G$  bekanntermaßen stark in seiner Rotation eingeschränkt. *Imberty et al.* führten ab initio Studien auf RHF/6-31G\*-Niveau an  $\alpha$ -Tetrahydropyranylphosphat als Modells substanz für 1"-phosphorylierte Pyranosen im Hinblick auf das konformative Verhalten des Torsionswinkels  $\phi_G$  durch.<sup>137</sup> Sie berechneten zwei Energieminima bei  $\phi_G = 60^\circ$  und  $\phi_G = 150^\circ$ , die praktisch die gleiche Energie aufweisen und lediglich durch eine sehr kleine Energiebarriere getrennt sind. Auch in dem hier verwendeten GLYCAM93-Kraftfeld ist der *exo*-anomeren Effekt parametrisiert. Eine hier durchgeführte Energiehyperflächenberechnung dieses Torsionswinkels an derselben Modells substanz mit dem AMBER91/GYLCAM 93-Kraftfeld, die nicht weiter beschrieben wurde, ergab zwei ähnliche Minima bei  $\phi_G = 70^\circ$  und  $\phi_G = 170^\circ$ , mit einem nicht sehr großen Energieunterschied ( $\Delta E = 1.63$  kJ/mol). Da die GLYCAM93-Parameter also zu ähnlichen Resultaten führen, scheint die von *Imberty et al.* durchgeführte Parametrisierung für phosphorylierte Pyranosen nicht zwingend notwendig zu sein. Aus diesem Grund wurde auf die Implementierung dieser Parameter in das AMBER91/GLYCAM93-Kraftfeld verzichtet.

In den hier durchgeführten MD-Simulationen mit Randbedingungen waren die beiden Minima des Torsionswinkels  $\phi_G$  nicht mehr deutlich voneinander zu unterscheiden (Abbildung 6-2 h). Eine ursprünglich durchgeführte MD-Simulation ohne Randbedingungen des Zuckernucleotids UDP-Gal zeigte hingegen eine klare Trennung dieser beiden Minima (Abbildung 6-19). Die aus dieser MD-Simulation berechnete Kopplungskonstante  $^3J_{H1''/P\beta}$ , die ein guter Indikator für das Rotamerengleichgewicht des Torsionswinkels  $\phi_G$  ist, war in guter Übereinstimmung mit den experimentellen Daten und belegte somit ein korrekt berechnetes Rotamerengleichgewicht. Allerdings führten diese MD-Rechnungen im Allgemeinen zu ungenügenden Resultaten, so dass sie hier nicht weiter beschrieben wurden. Durch diese Simulation wird aber ersichtlich, dass die zeitlich nicht gemittelte Randbedingung für diesen Torsionswinkel den unscharfen Übergang verursacht. Dies ist ein allgemeines Problem von NMR-Daten oder von Randbedingungen, die aus ihnen abgeleitet werden. Bei schnellen Prozessen können sie nicht mehr zwischen den einzelnen Zuständen unterscheiden (vgl. Kapitel 3.3.6). In dieser Arbeit wurde das berechnete Populationsgleichgewicht des Torsionswinkels  $\phi_G$  dennoch als zufriedenstellend angesehen.



**Abbildung 6-19:** Population des Torsionswinkels  $\phi_G$  am Beispiel von UDP-Gal, berechnet aus einer MD-Simulation ohne Randbedingungen bei 300 K und über eine Dauer von 20 ns.

*Imberty et al.*<sup>137</sup> ermittelten eine hohe Varianz im konformativen Verhalten von Zuckernucleotiden. Trotz der Unterschiede in einzelnen Freiheitsgraden weisen viele Konformationen eine große Ähnlichkeit auf und wurden deshalb zu sechs Konformationsfamilien zusammengefasst. Diese Konformationsfamilien basieren jedoch auf Geometrieoptimierungen im Vakuum, bei denen nichtbindende Wechselwirkungen insbesondere Wasserstoffbrückenbindungen die Geometrie des Moleküls bestimmen. Die Analyse der hier durchgeführten MD-Simulationen zeigte, dass nichtbindende Wechselwirkungen in Lösung eine sehr viel geringere Rolle spielen, so dass die von *Imberty et al.* vorgeschlagenen Konformationsfamilien nicht mehr klar voneinander zu unterscheiden waren. Insofern wird in dieser Arbeit der Konformationsraum von Zuckernucleotiden anders untergliedert: Die Konformation wird vereinfacht in fünf Familien eingeteilt, wobei die Lage der Pyranose zum Nucleosid ausschlaggebend ist.

Die hier durchgeführten MD-Simulationen von UDP-Glc liefern in vielen Punkten ähnliche Ergebnisse wie die Geometrieoptimierungen<sup>137</sup> und MD-Simulationen<sup>138,145</sup> von *Imberty et al.*. Allerdings zeigt das AMBER-Kraftfeld in einigen Punkten deutliche Schwächen. Beispielsweise werden die Populationsverteilungen einiger Strukturelemente, wie die Orientierung der Base (zu hohe *syn*-Population), die Konformation des Riboserings (zu äquatoriale Position der Base) und der exocyclischen Gruppen des Nucleosids (zu geringer *gg*-Anteil) und der Pyranose (ebenfalls zu geringer *gg*-Anteil), fehlerhaft berechnet<sup>138,145</sup>. Der Vergleich von experimentellen und theoretisch ermittelten NMR-Daten offenbarte ebenfalls Schwächen bei der Berechnung der Gesamtkonformation von UDP-Glc mit dem AMBER-Kraftfeld.<sup>145</sup> Noch gravierender werden die Fehler, wenn einzelne Molekülteile Modifikationen vom ursprünglich parametrisierten Molekül aufweisen.<sup>39</sup> Insofern erscheint die Verwendung von NMR-Randbedingungen unerlässlich, trotz der bereits angesprochenen Problema-

## 6. Konformation von Zuckernucleotiden

---

tik, dass NMR-Daten bei schnellen dynamischen Prozessen nicht mehr zwischen den einzelnen Zuständen unterscheiden. Eine einzelne, auf NMR-spektroskopischen Daten<sup>140</sup> basierende Geometrie von UDP-Glc zu generieren, erscheint somit ebenso wenig sinnvoll wie die ausschließliche Verwendung von molekülmechanischen Methoden<sup>137,138,145</sup>.

Es sei noch erwähnt, dass die Ergebnisse der hier durchgeführten MD-Simulation von UDP-Glc in der Lage sind, die ungewöhnlichen Reaktivitäten bei Acylierung der Hydroxylgruppen der Pyranose, sowie die NOE-Kontakte zwischen Pyranose und Nucleosid<sup>139</sup> zu erklären. Die MD-Simulation von UDP-Glc berechnete einen hohen Anteil an gefalteten Konformationen (65%, Tabelle 6-1). Dadurch könnten einige Hydroxylgruppen der Pyranose zeitweilig von dem Nucleosid abgeschirmt sein, wodurch sich ihre Reaktivitäten vermindern würden.

Der Ribosering der Zuckernucleotide UDP-Gal und UDP-Glc besitzt ein Konformationsgleichgewicht zwischen Nord- und Süd-Konformationen. Allerdings liegen nach den vorliegenden Daten die Populationsmaxima nicht in der vielfach beschriebenen<sup>36</sup> C2'-*endo*- und C3'-*endo*-Konformation. Obwohl in diesen Konformationen insgesamt die beste *gauche*-Anordnung möglich ist, kommt es durch die pseudoaxiale Stellung der exocyclischen Gruppe bzw. der Base offensichtlich zu einem sterischen Konflikt. Deshalb liegt etwa in der Region von C2'-*endo*- und C3'-*endo* ein lokales Populationsminimum ( $\phi = \pm 90^\circ$  Abbildung 6-2 b, Abbildung 6-8 b), welches sowohl die Süd- als auch die Nord-Konformation in zwei weitere Maxima unterteilt.

Wie bei den Nucleosiden wird durch die MD-Simulationen der Zuckernucleotide ein sterischer Einfluss der Base auf die Konformation der Ribose berechnet. In allen Zuckernucleotiden, insbesondere bei UDP-Gal und UDP-Glc, ist eine Korrelation der westlichen Konformationen der Ribose mit der *high-anti*-Orientierung der Base ( $\phi = \pm 120^\circ$ ,  $\chi = -60^\circ$ ) zu finden, sowie auch *Ost/syn* ( $\phi = \pm 50^\circ$ ,  $\chi = 45^\circ$ ) miteinander korreliert sind (Abbildung 6-5 e, Abbildung 6-8 e, Abbildung 6-12e, Abbildung 6-14 e, Abbildung 6-16 e). Das zeugt von einer stärkeren Abstoßung der Ribose mit der Base in der *syn*-Konformation durch einen erhöhten Platzbedarf des Sauerstoffatoms O2, wodurch die Base in pseudoäquatoriale Position strebt. Es wurde eine Korrelation der Base mit der Gesamtkonformation durch die MD-Simulation von UDP-Gal und UDP-Glc festgestellt wurde. In den übrigen Zuckernucleotide wurde diese Korrelation ebenfalls berechnet, dort ist sie allerdings schwächer ausgeprägt:



Die *high-anti*-Orientierung ist stärker besetzt, wenn sich das Molekül in der  $G_{\text{behind}}$ -Familie befindet, und die *anti*-Orientierung ist in dieser Familie nach *high-anti* verschoben (Abbildung 6-5 f, Abbildung 6-8 f, Abbildung 6-12f, Abbildung 6-14 f, Abbildung 6-16 f). Dies deutet auf eine Wechselwirkung der Base mit der Pyranose hin, die sich insbesondere in der  $G_{\text{behind}}$ -Familie ausbildet.

Laut MD-Rechnungen wird die Faltung des Zuckernucleotids sowohl durch die Desoxygenierung an den Kohlenstoffatomen C2' und C3' als auch durch die Stellung der Base beeinflusst. Die Hydroxylgruppen an den Kohlenstoffatomen C2' und C3' scheinen abstoßende Wechselwirkungen auszubilden, da die Substitution durch ein Wasserstoffatom zu einer stärkeren Faltung und zu einer erhöhten Population der E-Familie bei 2dUDP-Gal und 3dUDP-Gal relativ zu UDP-Gal führt. Aber auch eine pseudoäquatoriale Position der Base begünstigt eine stärkere Faltung des Moleküls. Verglichen mit UDP-Gal erhöht sich deshalb der Anteil an gefalteten Konformationen von 56dihydroUDP-Gal und 2dUDP-Gal, die durch eine stärkere Population an Süd-Konformationen und damit einhergehend durch eine pseudoäquatorialere Stellung der Base charakterisiert sind. Bei 2dUDP-Gal verstärken sich beide Effekte, so dass dieses Zuckernucleotid die stärkste Faltung aufweist.

Die *gg*-Konformation des Torsionswinkels  $\gamma$  der exocyclischen Gruppe der Ribose und die *ap*-Konformation des Torsionswinkels  $\beta$  entlang der C5'-O5'-Bindung sind entsprechend der MD-Simulationen bei allen Zuckernucleotiden am häufigsten besetzt. Das führt zu einer starken Besetzung der Konformationsfamilien, bei denen sich das Pyrophosphat und letztlich auch die Pyranose oberhalb des Riboserings befindet. Demzufolge ist die  $G_{\text{down}}$ -Familie ( $\lambda = 180^\circ$ ) wenig besetzt. Durch die MD-Simulation ergab sich eine energetisch ungünstige Anordnung, bei der sich die Pyranose direkt oberhalb des Nucleosids befindet ( $\lambda = -15^\circ$ ,  $G_{\text{up}}$ -Familie). In dieser Anordnung überwiegen offensichtlich die abstoßenden Wechselwirkungen zwischen Base und Pyranose, so dass die  $G_{\text{up}}$ -Familie ein Populationsminimum darstellt. Dadurch sind die  $G_{\text{front}}$ - und die  $G_{\text{behind}}$ -Familie bei allen Zuckernucleotiden deutlich voneinander getrennt (Abbildung 6-2 j, Abbildung 6-8 c, Abbildung 6-11 c, Abbildung 6-14 c, Abbildung 6-16 c), und alle Konformationen können trotz fließender eindeutig einer Familie zugeordnet werden.

Es ist nicht völlig auszuschließen, dass es sich bei den gefundenen Korrelationen um Artefakte handelt, da den MD-Simulationen stets Abstandsrandbedingungen zwischen Base und

## 6. Konformation von Zuckernucleotiden

---

Pyranose auferlegt wurden. Allerdings wurden in den NMR-Spektren stets entsprechende NOE-Kontakte gefunden, die eine räumliche Nähe belegen. Zudem scheint eine Korrelation wahrscheinlich, da bei UDP-Glc lediglich eine einzige, sehr schwache entsprechende Randbedingung für die Simulation verwendet und die Korrelation durchweg bei allen Zuckernucleotiden gefunden wurde.

## 7. Aktivitäten von Zuckernucleotiden in der GalT-Reaktion

In den bisherigen Kapiteln wurde die Konformation von einigen Zuckernucleotiden und ihren Bausteinen aufgeklärt. Andere Enzym-Substrat-Systeme zeigen, dass die Lösungskonformation von Substraten mit ihrer Aktivität korreliert.<sup>30,37</sup> Mit Hilfe von QSAR-Methoden<sup>146</sup> wird daher der Frage auf einen Zusammenhang zwischen der räumlichen Lösungsstruktur der Zuckernucleotide und ihrer Aktivität nachgegangen. Des Weiteren wird der Enzym-Substrat-Komplex modelliert und ein Zusammenhang zwischen Enthalpie und Aktivität mit QSAR-Methoden untersucht.

Für die Berechnung des Enzym-Substrat-Komplexes ist ein hinreichend gutes Modell notwendig, welches durch die Aufklärung von Kristallstrukturen der GalT in An- und Abwesenheit des Donorsubstrats zur Verfügung steht.<sup>16,163,164</sup> Da diese Kristallstrukturen die Grundlage für die Modellierung bilden, werden die wesentlichen Aspekte im Folgenden zusammengefasst, nachdem in aller Kürze auf die Substratspezifität von GalT eingegangen wird.

### Substratspezifität von $\beta$ 4GalT

Einiges spricht dafür, dass  $\beta$ 4GalT für die Synthese aller natürlichen  $\beta$ -1,4-Galactosylverbindungen in Oligosacchariden verantwortlich ist.<sup>147b)</sup> Das Akzeptorspektrum ist insofern sehr breit.<sup>2,147,148,151</sup>

Auch hinsichtlich seiner Donorsubstrate lässt  $\beta$ 4GalT eine gewisse Varianz zu, wobei die Aktivität jedoch stark variiert. Die Galactose des Zuckernucleotids kann durch Glucose (0.3% Aktivität relativ zu UDP-Gal)<sup>149</sup>, die in Anwesenheit des Coenzyms  $\alpha$ -Lactalbumin bis auf das dreißigfache steigen kann (ca. 10%),<sup>16</sup> 4-Desoxyglucose (5.5%), L-Arabinose (4.0%),<sup>149</sup> N-Acetylgalactosamin (0.2%), Glucosamin (0.1%),<sup>150</sup> Mannose (0.05%), 2-Desoxygalactose,<sup>148</sup> 6-Desoxygalactose (1.3%), 6-Desoxy-6-fluorogalactose (0.2%)<sup>147i)</sup> und 3-Desoxygalactose<sup>151</sup> ersetzt werden. Es wurde auch versucht, andere Nucleotide im Donorsubstrat zu verwenden. Jedoch zeigten weder ADP-Gal, TDP-Gal, CDP-Gal noch GDP-Gal Enzymaktivität.<sup>152</sup> Leichte Modifikationen im Nucleotidteil werden hingegen durchaus vom Enzym akzeptiert. So besitzt 5dihydroUDP-Gal noch 82% der Aktivität von UDP-Gal, 3dUDP-Gal 56% und 2dUDP-Gal 2% Aktivität.<sup>153</sup>

## 7. Aktivitäten von Zuckernucleotiden in der GalT-Reaktion

Rinder- $\beta$ 4GalT hat zwei Bindungsstellen für zweiwertige Metallkationen, die etwa  $18 \pm 3$  Å voneinander entfernt liegen<sup>154</sup>. Ein Kation ist bei der Bindung des Donors am katalytischen Zentrum beteiligt, während das andere keinen direkten Kontakt zu den Substraten hat. Vermutlich unterstützt es aber die Änderung des Enzyms in die katalytisch aktive Konformation<sup>16</sup>. Das Enzym zeigt die höchste Aktivität bei einer optimalen Konzentration von 3-5 mM  $Mn^{2+}$ -Ionen<sup>155</sup>. Bei sehr viel geringeren Konzentrationen  $[Mn^{2+}] = 1.5 \mu M$  ist immerhin noch 68% Aktivität zu beobachten<sup>156</sup>. Wird in geringen Konzentrationen  $Mn^{2+}$  durch  $Zn^{2+}$  ersetzt, sinkt die Aktivität auf 43% ab.  $Co^{2+}$  zeigt 39% Aktivität,  $Fe^{2+}$  23% und  $Cd^{2+}$  32%. Noch einige weitere Kationen aktivieren das Enzym<sup>156</sup>. Die Michaelis-Konstante für  $Mn^{2+}$  liegt bei  $K_M = 20 \mu M$  am allosterischen Zentrum und  $K_M = 440 \mu M$  am katalytischen Zentrum, an dem auch UDP-Gal bindet<sup>156</sup>.

Die maximale spezifische Aktivität von  $\beta$ 4GalT hängt neben der Konzentration der Substrate und Cofaktoren davon ab, aus welchem Organismus sie stammt. Menschliche  $\beta$ 4GalT hat eine maximale spezifische Aktivität von 10.9 U/mg. Die Michaelis-Konstanten betragen  $K_M = 0.056$  mM für UDP-Gal und  $K_M = 3.2$  mM für GlcNAc<sup>157</sup>.  $\beta$ 4GalT aus Rindermilch besitzt bei optimalen Bedingungen eine spezifische Aktivität von 13-19 U/mg<sup>158</sup>. Hier sind die Michaelis-Konstanten etwas niedriger:  $K_M = 0.043$  mM für UDP-Gal und  $K_M = 1.49$  mM für GlcNAc.<sup>155</sup>

$\beta$ 4GalT arbeitet noch mit mehr als 50% Aktivität in einem pH-Bereich von 5.5 - 8.0<sup>159</sup> und einer Temperatur zwischen 25 - 45 °C,<sup>160</sup> das Optimum liegt zwischen pH 6.4 - 7.6 und einer Temperatur von 37 °C.<sup>161</sup> GalT ist mit einer Wechselzahl (turnover number) von  $20.1 s^{-1}$  ein Enzym mit vergleichsweise niedriger Aktivität<sup>162</sup> (Wechselzahlen:  $\beta$ -Amylase =  $18333.3 s^{-1}$  oder  $\beta$ -Galactosidase =  $208.3 s^{-1}$ ).

### Räumliche Struktur von $\beta$ 4GalT

Für ein Verständnis der katalytischen Wirkungsweise von  $\beta$ 4GalT ist die Kenntnis der Primärstruktur, wie sie aus der Gensequenzanalyse hervorgeht, nicht ausreichend. Während der Arbeiten zu dieser Dissertation wurden jedoch einige Kristallstrukturen von  $\beta$ 4GalT in Anwesenheit von verschiedenen Substraten und dem Coenzym  $\alpha$ -Lactalbumin veröffentlicht,<sup>16,163,164</sup> die detaillierte Einblicke in die Enzym-Substrat-Wechselwirkungen geben.

GalT besitzt eine flexible Region im Bereich der Aminosäuren 345 - 365. Diese Aminosäuren können zwei verschiedene Orientierungen einnehmen, die die Gesamtkonformation von GalT verändern. Die Struktur von *Gastinel et al.*<sup>163</sup> weist die Konformation K I auf. Sie hat eine tiefliegende Tasche mit einem Durchmesser von 13 Å, die das katalytische Zentrum darstellt. In K II ist das Zentrum hingegen nur noch ein breiter Spalt. Neben den Resten 345 - 365 ändern sich Gly313 und Trp314, die restlichen Aminosäuren des Enzyms bleiben im Wesentlichen auf ihren Positionen. Das freie Enzym liegt in K I vor, wohingegen K II als die katalytische Konformation identifiziert wurde. Sie wird durch Anlagerung der Substrate, jedoch nicht durch das Coenzym  $\alpha$ -Lactalbumin induziert, falls dieses an der Reaktion teilnimmt. Frühere kinetischen Untersuchungen über die Katalyse von GalT besagten, dass erst  $Mn^{2+}$  und anschließend Donor und Akzeptor sequenziell binden.<sup>165</sup> In Anwesenheit von Lactalbumin werden Glc und Lactalbumin gleichzeitig gebunden. Strukturell wird dieses so erklärt:

UDP-Gal und  $Mn^{2+}$  können nur in K I binden. In K II ist die UDP-Gal-Bindungsstelle teilweise durch die flexible Region 345 - 365 blockiert. Deshalb ist für die Katalyse zunächst eine UDP-Gal-Bindung notwendig. Dabei wechselt die Seitenkette von Trp314 vom Äußeren in das Innere des katalytischen Zentrums und nimmt an der Komplexierung des  $Mn^{2+}$  teil. Der Wechsel ist gleichzeitig mit der Konformationsänderung K I nach K II verbunden. Anschließend bindet der Akzeptor. Bei der Lactosesynthesereaktion wird  $\alpha$ -Lactalbumin erst zum Schluss gebunden.<sup>164</sup>

Während der eigentlichen Reaktion übernimmt vermutlich Glu317 das Proton H1" der Galactose, und es kommt zu einer nucleophilen Substitution durch die 4-Hydroxygruppe des Akzeptors an C1. Nach dem Bindungsbruch verändert UDP seine Konformation (s. u.). Wie bei UDP-Gal wird der Uracilring zwar ebenfalls durch Stapelwechselwirkung mit Phe226 und Arg191 und Wasserstoffbrückenbindungen mit Arg189 in Position gehalten. Jedoch ist

## 7. Aktivitäten von Zuckernucleotiden in der GalT-Reaktion

die Position der Ribose um  $180^\circ$  gedreht, so dass sie zusammen mit der Phosphatgruppe aus der Bindungstasche heraus zeigt. Das Sauerstoffatom O4' der Ribose hat nun einen sehr kurzen Abstand zur Seitenkette des Arg189. Das  $\alpha$ -Phosphat ist etwa 15 Å von der ursprünglichen Lage entfernt und ist über Wasserstoffbrücken an den Stickstoffatomen der Seitenkette von Arg191 und Asp190 gebunden. Elektrostatische Repulsionen des negativ geladenen Phosphats mit dem negativ geladenen Dx-D-Motiv könnten die Gründe für die Konformationsänderung sein.<sup>163</sup>

Nach der Katalyse verlassen zunächst das Produkt mit der Galactose (bei der Lactosesynthesereaktion auch das  $\alpha$ -Lactalbumin) das Enzym und die ursprüngliche Konformation K I wird wieder hergestellt. Anschließend dissoziiert UDP vom Enzym.<sup>164</sup>

GlcNAc ist in hohen Konzentrationen ein Inhibitor, da es ebenfalls einen Konformationswechsel des Enzyms zu K II induzieren kann. In K II wird UDP-Gal jedoch nicht gebunden, so dass die Reaktion nicht stattfinden kann. Auch  $\alpha$ -Lactalbumin inhibiert die Lactose-synthaseaktivität des Enzyms. Der Akzeptor kann sich nicht anlagern, wenn das Coenzym bereits an GalT gebunden ist.<sup>164</sup>

Die Wechselwirkungen zwischen Enzym und Substraten aus Kristallstrukturen hergeleitet, die sich auf eine Aminosäurekette beschränken, bei der das Enzym gerade noch aktiv ist (etwa ab Leu131 bis Ser402).<sup>163</sup> Diese katalytische Domäne Leu131 - Ser402 enthält 11  $\beta$ -Faltblätter, sechs  $\alpha$ -Helices und zwei weitere kurze Helices.<sup>163</sup> Zwei Disulfidbrücken stabilisieren die Tertiärstruktur: Cys134 - Cys176 und Cys247 - Cys266.<sup>163</sup>

Der Uracilring von UDP-Gal wird durch Stapelwechselwirkungen der Seitenkette des Phe225 und Arg191 in Position gehalten (Abbildung 7-1). Die Atome O2 und N3 der Uracils bilden mit den Stickstoff- und Sauerstoffatomen Rückgrats des Arg189 Wasserstoffbrückenbindungen aus. Das Sauerstoffatom O3' der Ribose ist über Wasserstoffbrücken zum Rückgrat des Val253 gebunden und hat einen kurzen Abstand zu Pro187. Das Sauerstoffatom O2' der Ribose bildet eine Wasserstoffbrücke zum Sauerstoffatom des Rückgrats von Pro187. Das  $\alpha$ -Phosphat hat in Konformation I keine Wechselwirkungen mit dem Enzym und schaut aus der Bindungstasche heraus. Das  $\beta$ -Phosphat hingegen ist vermutlich über  $Mn^{2+}$  mit dem Carboxylat der Seitenkette von Asp254 komplexiert. Asp252 und Asp254 bilden das Dx-D-

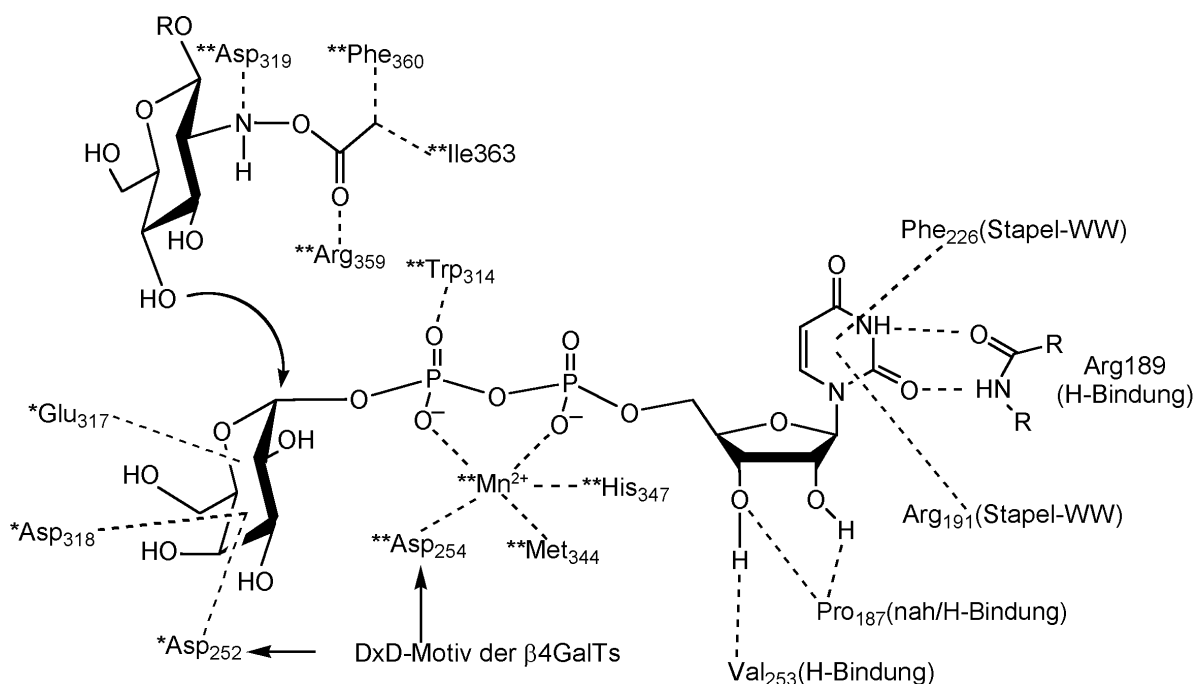
## 7. Aktivitäten von Zuckernucleotiden in der GalT-Reaktion

Motiv, das in praktisch allen Galactosyltransferasen vorkommt. Sie liegen etwa 5 Å voneinander entfernt. Das  $\text{Mn}^{2+}$  war nicht sichtbar.<sup>163</sup>

Andere Kristallstrukturen konnten jedoch die Wechselwirkung des  $\text{Mn}^{2+}$  mit dem Pyrophosphat und dem Enzym aufklären.<sup>16,164</sup> Das  $\text{Mn}^{2+}$  ist in der katalytisch aktiven Konformation K II fünffach koordiniert. Dabei wird es von Sauerstoffatomen der beiden Phosphatgruppen, dem Carboxylat des Asp254, dem  $\epsilon$ -Stickstoffatom des His347 und dem Schwefel von Met344 komplexiert. Die Galactose war in den Kristallstrukturen zwar nicht zu erkennen. Da aber ein Sauerstoff des  $\beta$ -Phosphats mit  $\text{Mn}^{2+}$  koordiniert ist und das zweite mit Trp314 wechselwirkt, ist die Pyranose vermutlich am dritten Sauerstoff gebunden und bildet starke Wechselwirkungen mit Asp252, Glu317 und Asp318 aus.<sup>16,164</sup>

Die Bindungsstelle des anderen zweiwertigen Metallkations wird in der Region der Reste 311 - 317 vermutet, wobei die Anlagerung des Kations vermutlich den Konformationswechsel von K I zu K II unterstützt.<sup>164</sup>

Auch die Lage des Akzeptors konnte durch die Kristallstrukturen identifiziert werden. GalT bildet eine Tasche aus den Aminosäuren Lys279 - Tyr289, Trp314 - Asp319 und Arg359 - Ile363, in der sich der Akzeptor einlagern kann. Bei der Lactosesynthesereaktion bildet der Sauerstoff O1 des Akzeptors GlcNAc eine Wasserstoffbrücke mit Lactalbumin. Ansonsten treten nur Wechselwirkungen des Akzeptors mit GalT auf. Das Stickstoffatom N2 hat eine Wasserstoffbrücke mit Asp319, der Carbonylsauerstoff wechselwirkt mit Arg359 und die Methylgruppe hat hydrophobe Wechselwirkungen mit Phe360 und Ile363. Zudem besitzt Arg359 noch eine Wasserstoffbrückenbindung zum O1 des Akzeptors.<sup>164</sup>



**Abbildung 7-1:** Enzym-Substrat-Wechselwirkungen von  $\beta$ -1,4-Galactosyltransferase in der katalytisch aktiven Konformation II. Die unmarkierten Aminosäurereste von GalT wurden von *Gastinel et al.*<sup>163</sup>, die mit \*\* gekennzeichneten Reste von *Ramakrishnan et al.*<sup>16,164</sup> identifiziert. Die mit \* markierten Aminosäuren sind ihre Vermutungen.<sup>16,164</sup>

### 7.1. Korrelation zwischen Konformation und Aktivitäten der Substrate

Im Kristall nimmt das Zuckernucleotid im gebundenen Zustand eine eher gestreckte Konformation ein,<sup>163</sup> die der E-Familie zuzuordnen ist ( $\chi = -158.6^\circ$ ,  $\phi = 109.88^\circ$ ,  $q = 0.299$ ,  $\gamma = 48.3^\circ$ ,  $\beta = 179^\circ$ ,  $\alpha = 99.5^\circ$ ,  $\delta' = -104.0^\circ$ ,  $\psi = 124.5^\circ$ ,  $\phi_G = 100.5^\circ$ ,  $\omega = 171.0^\circ$ ), wobei die letzten vier Freiheitsgrade modelliert wurden (siehe Kapitel 7.2.1). Diese Konformation, die vermutlich die katalytisch aktive ist, unterscheidet sich von der energetisch günstigsten Lösungskonformation von UDP-Gal (vgl. Kapitel 6.2.1) vor allem in den Diederwinkeln des Pyrophosphats  $\alpha$ ,  $\delta'$  und  $\psi$ . Diese durch die Bindung an das Enzym induzierte Spannung könnte möglicherweise dazu dienen, den Bindungsbruch O1"-C1" für die Galactosyltransferasereaktion zu erleichtern. Das gebundene Substrat verändert also vermutlich seine Konformation gegenüber dem ungebundenen Zustand in Lösung.

Die Abhängigkeit der Aktivität eines bestimmten Zuckernucleotids beruht neben vielen anderen Aspekten, wie z.B. Energien der Übergangszustände, Energien der Produkte und



## 7. Aktivitäten von Zuckernucleotiden in der GalT-Reaktion

Edukte etc., darauf, wie gut das Substrat in die Bindungstasche passt. Sie wird also auch davon abhängen, wie leicht der Wechsel von der freien Konformation in Lösung zum gebundenen Zustand erfolgt. Diese Hypothese soll im Folgenden durch eine statistische Herangehensweise (QSAR) näher untersucht werden, da nicht alle Faktoren berücksichtigt werden, die die Aktivität der Galactosyltransferasereaktion beeinflussen.

Aus den Ergebnissen der MD-Simulationen der Zuckernucleotide wurde die Differenz in der freien Enthalpie zwischen Grundzustand, d.h. die in Lösung am häufigsten auftretende Konformation, und der gebundenen Konformation berechnet. Die Konformation des gebundenen Zuckernucleotids ist sehr energiereich, so dass das freie Zuckernucleotid laut MD-Simulation in wässriger Lösung bei 300 K diese Konformation praktisch nicht einnimmt. Eine Erhöhung der kinetischen Energie des Systems in den MD-Simulationen war nicht möglich, da die NMR-Daten bei einer Messtemperatur von 300 K erhalten wurden. Somit besaßen die Randbedingungen nur Gültigkeit für eine Simulationstemperatur von 300 K. Als Berechnungsgrundlage für eine dem gebundenen Zustand ähnliche Konformation diente hierbei eine 3D Struktur, bei der eine Auslenkung von 30° bei alle konformativ wichtigen Freiheitsgrade  $\chi$ ,  $\phi$ ,  $\gamma$ ,  $\beta$ ,  $\alpha$ ,  $\delta'$ ,  $\psi$ ,  $\phi_G$  und  $\omega$  zugelassen wurden (Tabelle 7-1). Allerdings ist selbst diese Konformationen, die sich bereits stark von der gebundenen Konformation unterscheidet, kaum besetzt, so dass die freien Enthalpie mit starken statistischen Fehlern behaftet ist.

**Tabelle 7-1:** Aktivitäten verschiedener Zuckernucleotide und ihre Differenzen in den freien Enthalpien zwischen Grundzustand und gebundener Konformation mit einer Auslenkung in den Freiheitsgraden von 30°, 33° und 35°, Bestimmtheitsmaß der Pearson-Statistik und F-Wert des F-Tests.

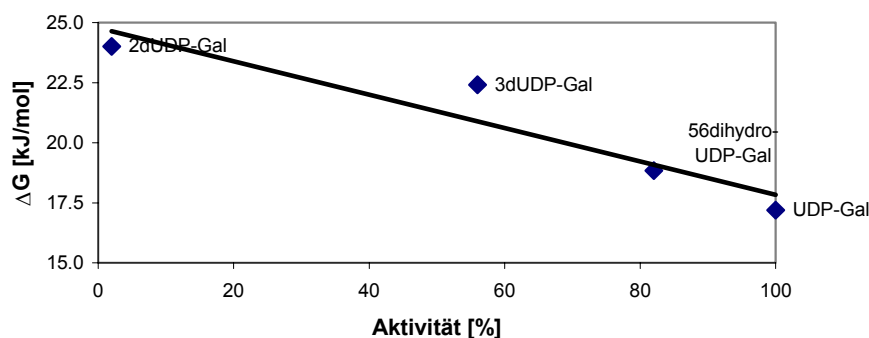
| Substrat         | rel. Aktivität <sup>153</sup> | $\Delta G$ [kJ/mol]<br>bei 30° | $\Delta G$ [kJ/mol]<br>bei 33° | $\Delta G$ [kJ/mol]<br>bei 35° |
|------------------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| UDP-Gal          | 100                           | 17.20                          | 13.74                          | 12.47                          |
| 56dihydroUDP-Gal | 82                            | 18.84                          | 17.83                          | 16.55                          |
| 3dUDP-Gal        | 56                            | 22.41                          | 20.68                          | 20.68                          |
| 2dUDP-Gal        | 2                             | 24.00 <sup>a)</sup>            | 21.50                          | 16.64                          |
| Bestimmtheitsmaß |                               | 0.89                           | 0.75                           | 0.19                           |
| F-Wert           |                               | 16.56                          | 5.91                           | 0.46                           |

<sup>a)</sup> extrapoliert

## 7. Aktivitäten von Zuckernucleotiden in der GalT-Reaktion

Die Existenz eines linearen Zusammenhangs zwischen Konformation und Aktivität wurde wie folgt überprüft. Die Merkmalsträger (Aktivität und Differenz der freien Enthalpien) bilden die Grundgesamtheit und wurden mit der Aktivität in der Ordinate in einem xy-Diagramm aufgetragen (Abbildung 7-2). Die Regressionsgerade repräsentiert den linearen Zusammenhang zwischen beiden Merkmalen. Da beide Merkmale mit Fehlern behaftet sein können, sind die Residuen und damit die Standardabweichung wenig aussagekräftig. Mit Hilfe der Pearson-Statistik, die bei intervallskalierten Daten durchgeführt werden kann, wurde ein eventueller Zusammenhang ermittelt. Das Bestimmtheitsmaß, das aus dem Quadrat des Pearsonschen Korrelationskoeffizienten berechnet wird, nimmt Werte zwischen -1 und 1 an (Tabelle 7-1) und gibt Aufschluss, in welchem Maße die Regressionsgerade einen linearen Zusammenhang repräsentiert. Es drückt den Anteil der erklärten Variation an der Gesamtvarianz aus. Bei einem Bestimmtheitsmaß von -1 existiert ein maximaler reziproker Zusammenhang, bei 0 besteht kein Zusammenhang zwischen den Merkmalsträgern und bei 1 ist ein maximaler gleichgerichteter Zusammenhang vorhanden. Demnach sind 89% der Variationen in der Höhe der Aktivität der unterschiedlichen Substrate bei einer zugelassenen Auslenkung von  $30^\circ$  von der gebundenen Konformation erklärte Variationen. Sie sind auf die Differenz in der freien Enthalpie zwischen der Konformation im Grundzustand in Lösung und der am Enzym gebundenen Konformation zurückzuführen. 11% sind nicht erklärte Variationen.

### Konformation-Aktivität-Beziehung



**Abbildung 7-2:** Aktivitäten modifizierter Zuckernucleotide in der GalT-Reaktion und Differenzen in den freien Enthalpien zwischen der Konformation im Grundzustand und der an GalT gebundener Konformation mit einer maximalen Auslenkung von  $30^\circ$  ( $\vee$ ). Linearer Zusammenhang zwischen Aktivität und freier Enthalpie ( $\oplus\oplus\oplus$ ).

## 7. Aktivitäten von Zuckernucleotiden in der GalT-Reaktion

Der F-Test ist eine Funktion der Standardabweichung bzw. des Bestimmtheitsmaßes in Abhängigkeit von der Anzahl der Datenpunkte. Er gibt Aufschluss über die Signifikanz der Regressionsgrade. Im Fall von einer zugelassenen Auslenkung von  $30^\circ$  in den Freiheitsgraden ist die Wahrscheinlichkeit, dass keine Zusammenhang zwischen freier Enthalpie der Konformationswechsel und der Aktivität besteht, kleiner als 1% ( $F = 16.56$ ). Es wird also eine gute Korrelation zwischen Enthalpie und Aktivität festgestellt. Bei einer Auslenkung von  $33^\circ$  beträgt die Wahrscheinlichkeit, dass keine Korrelation existiert, immerhin schon zwischen 5 - 10%. Die These einer Korrelation bei einer Auslenkung von  $33^\circ$  muss daher verworfen werden, bei einer Auslenkung von  $30^\circ$  wird sie hingegen angenommen.

Diese Ergebnisse sollten dennoch lediglich als Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen Konformation und Aktivität verstanden werden. Eine gesicherte statistische Auswertung bedarf einerseits einer größeren Grundgesamtheit, d.h. mehr zu untersuchende Substrate. Andererseits wurde gezeigt, dass ein Konformationswechsel in den gebundenen Zustand eine hohe freie Enthalpie benötigt. Die kinetische Energie bei einer Simulationstemperatur von 300 K ist aber nicht ausreichend, um einen entsprechenden Konformationswechsel zu induzieren, so dass lediglich Konformationen, die dem gebundenen Zustand ähnlich sind, in die Enthalpieberechnung einfließen. Trotzdem geben diese statistischen Untersuchungen ermutigende Anhaltspunkte für eine Korrelation von Aktivität und Konformation der Zuckernucleotiden, die eine eingehendere Untersuchung sinnvoll erscheinen lassen.

### 7.2. Enthalpische Aspekte der Galactosyltransferasereaktion

Enzym-Substrat-Wechselwirkungen spielen eine zentrale Rolle in pharmakologischen Fragestellungen und sind Voraussetzung für das Verständnis der Katalyse. Früher waren *in vivo* oder später *in vitro* Testungen notwendig, um Aussagen über die Wirksamkeit eines potenziellen Wirkstoffs oder über die Aktivität eines Substrats in der enzymatischen Reaktion zu treffen. Nachteilig ist jedoch der präparative Aufwand dieser Vorgehensweise. In den letzten Jahren erlangten computergestützte Methoden zur Aufklärung von Enzym-Substrat-Wechselwirkungen immer stärkere Bedeutung. Durch Modellierung wird versucht, die Aktivität oder Affinität eines Substrats oder Wirkstoffs bereits vor der Synthese und dem enzymatischen Test vorherzusagen.

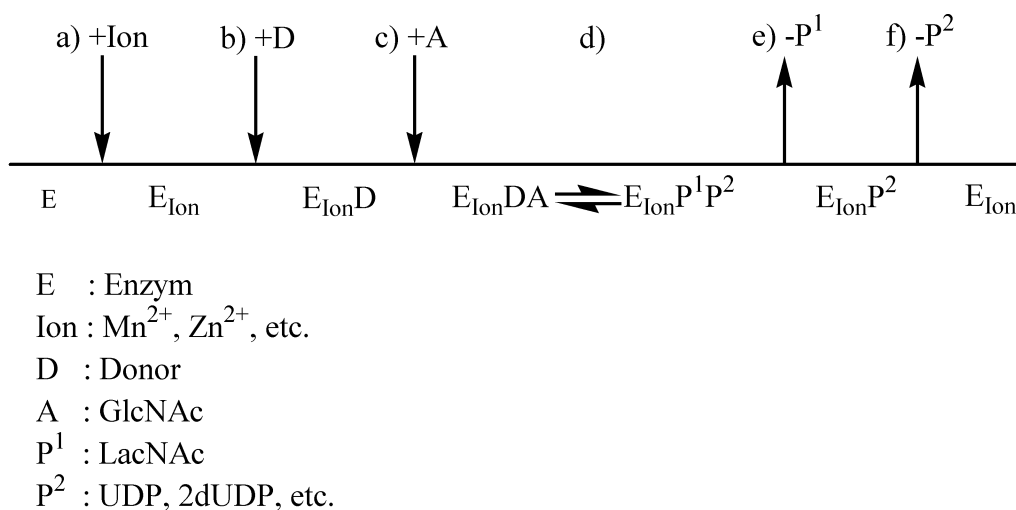
Prinzipiell läßt sich aus der freien Enthalpie der gesamten Reaktion, also der Anlagerung aller Substrate inklusive induzierter Konformationsänderungen, der Reaktion zu den Produkten, sämtlicher dabei ablaufenden Bindungsbrüche und schließlich der Dissoziation die Aktivität oder Affinität berechnen. Über die freie Enthalpie ist die Gleichgewichtskonstante definiert, aus der wiederum für jeden Punkt der Reaktionskoordinate das Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten  $k_{\text{hin}}/k_{\text{rück}}$  berechnet werden kann.

Mittlerweile existieren bereits viele Tools, die eine derart komplexe Fragestellung mit unterschiedlicher Genauigkeit bearbeiten können. Das erste Problem stellt hierbei oft die 3D Struktur des Enzyms dar, da häufig nur die Primärstrukturen aus den Gensequenzen vorliegen. Im z.Z. vielversprechendsten Ansatz werden die 3D Strukturen eines Proteins durch das Auffinden von Ähnlichkeiten mit Proteinen generiert, deren Kristallstruktur bereits ermittelt wurde.<sup>166</sup> Im Anschluss werden mögliche Bindungstaschen des Enzyms lokalisiert, dann das Substrat oder der Ligand unter Berücksichtigung möglicher Konformationsänderungen in das katalytische Zentrum angedockt<sup>167</sup> und anschließend seine Affinität zum Protein berechnet. Hierfür werden z.Z. mehrere sogenannte Scoring-Funktionen<sup>168</sup> verwendet, die die Affinität des Enzyms zu einem bestimmten Liganden auf der Grundlage verschiedener nichtbindender Kräfte bewerten, wie z.B. van-der-Waals, elektrostatische, hydrophobe Wechselwirkungen oder Wasserstoffbrückenbindungen, etc.. Alle Scoring-Funktionen weisen unterschiedliche Stärken und Schwächen auf, arbeiten allerdings nicht für alle Probleme zuverlässig. Da das AMBER-Kraftfeld ebenfalls Terme für nichtbindende Wechselwirkungen besitzt, wurde in dieser Arbeit die Affinität der Zuckernucleotide zur GalT mit Hilfe dieses

## 7. Aktivitäten von Zuckernucleotiden in der GalT-Reaktion

Kraftfelds berechnet. In den meisten Fällen lässt sich hieraus zwar nicht direkt die Reaktionsgeschwindigkeit ablesen. Jedoch können bereits getestete Substrate mit in die Betrachtung einbezogen und statistisch ausgewertet werden. Hieraus lässt sich eine quantitative Struktur-Aktivität-Beziehung (QSAR) ermitteln.

Prinzipiell muss also für die Berechnung der Aktivität die freie Enthalpie der vollständigen Reaktion berechnet werden, inklusive der Anlagerungen der Substrate (Schritt a-c, Abbildung 7-3), der Dissoziation der Produkte (Schritt e-f, Abbildung 7-3) und der eigentlichen Reaktion (Schritt d, Abbildung 7-3). Hierfür stand mit der Kristallstruktur der GalT<sup>163</sup> ein guter Ausgangspunkt zur Modellierung zur Verfügung. In dieser Arbeit gilt das besondere Interesse der Vorhersage von Aktivitäten von Donorsubstraten mit Fluorsubstituenten in der Ribose, da sie zurzeit im Arbeitskreis synthetisiert werden.<sup>169</sup> Da viele Aspekte des Katalysemechanismus bereits bekannt sind, muss die Galactosyltransferasereaktion für diese Fragestellung nicht vollständig berechnet werden.



**Abbildung 7-3:** Geordneter sequenzieller Einzelverdrängungsmechanismus der GalT-Reaktion.<sup>170</sup>

## 7. Aktivitäten von Zuckernucleotiden in der GalT-Reaktion

Allein die Kenntnis, dass und wo die Reaktion des natürlichen Donorsubstrats am Enzym stattfindet, ermöglicht den Verzicht auf Dockingalgorithmen und auf eine Reaktionskoordinate, da mit Sicherheit die Aktivierungsenergien der Anlagerung, der Reaktion und der Dissoziation überschritten werden.

Berechnungen in der freien Enthalpie sind sehr kostenintensiv. Während sie für viele Fragestellungen unerlässlich sind,<sup>171</sup> genügt es, sich hier auf die Enthalpien zu konzentrieren, da diese für die unterschiedliche Aktivität der Substrate vermutlich verantwortlich sind. Denn einerseits bleibt die Teilchenzahl bei den Reaktionen der unterschiedlichen Donorsubstrate konstant und andererseits weisen alle Substrate eine ähnliche Flexibilität in Lösung auf (Kapitel 6), so dass der Beitrag der Entropie zur freien Enthalpie bei allen Reaktionen ähnlich sein dürfte.

Schließlich kann die Berechnung der Reaktion für die Fragestellung der Aktivitätsvorhersage noch weiter vereinfacht werden. Trotz der Unterschiedlichkeit der Substrate dürften einige Reaktionsschritte einen ähnlichen Beitrag zur Enthalpie leisten. Die Anlagerung des Ions an das Enzym (Schritt a, Abbildung 7-3) ist für alle Substrate sicherlich gleich, da das Enzym zu diesem Zeitpunkt noch substratfrei ist. Vermutlich werden die Modifikationen der Donorsubstrate für die Assoziation des Akzeptors (Schritt c, Abbildung 7-3) und für die Dissoziation von LacNAc (Schritt e, Abbildung 7-3) ebenfalls keine wesentliche Rolle spielen. Da die Modifikationen der Substrate nicht an der eigentlichen Reaktion teilnehmen und weit vom reaktiven Zentrum entfernt sind, dürfte auch Schritt d keinen wesentlichen Unterschied in den Bildungsenthalpien hervorrufen. Vermutlich sind die Assoziation (Schritt b, Abbildung 7-3) der Substrate an das Enzym und die Dissoziation der Produkte (Schritt f, Abbildung 7-3) die entscheidenden Schritte, die die Aktivität von modifizierten Zuckernucleotiden bestimmen. Eine Vorhersage der Aktivität modifizierter Substrate konzentriert sich also auf die Berechnung der Enthalpie dieser beiden Schritte. Ob trotz dieser Annahmen noch eine zuverlässige Vorhersage möglich ist, kann durch die Berechnung einiger modifizierter Donorsubstrate mit bekannter Aktivität mit Hilfe von QSAR-Methoden verifiziert und im Erfolgsfall die Aktivität unbekannter Substrate vorhergesagt werden.

### 7.2.1. Enthalpieberechnung

Die Kristallstruktur von GalT<sup>163</sup> diente als Grundlage zur Berechnung des Enzym-Substrat-Komplexes, obwohl sich später herausstellte, dass es sich nicht um die katalytisch aktive Konformation handelt. Zur Modellierung wurde ein Dimer der Struktur 1FR8.pdb<sup>172</sup> entfernt, zwei O-O Bindungen gespalten, die sich zwischen den Sauerstoffatomen des Pyrophosphats befanden, und freie Valenzen mit insgesamt 2193 Wasserstoffen abgesättigt. Zink diente als Kation, das an der Komplexierung des Substrats am katalytischen Zentrum beteiligt ist. Da seine Lage in der Kristallstruktur nicht genau bestimmt war, wurden die Vermutungen über seinen Ort<sup>163</sup> verwendet, um es zwischen zwei Sauerstoffen des  $\beta$ -Phosphats der UDP-Gal und der Carboxylatgruppe von Asp254 zu positionieren. An das dritte Sauerstoffatom des  $\beta$ -Phosphats, das nicht an der Komplexierung beteiligt war, wurde die Galactose gebunden. Der Torsionswinkel  $\phi_G$  am anomeren Zentrum wurde entsprechend der Kristallstruktur von UDP-Glc<sup>28</sup> auf  $\phi_G = 70^\circ$  gesetzt.

### 7.2.2. Konformation des Enzym-Substrat-Komplexes

Die Geometrieoptimierung veränderte die Konformation des  $E \cdot Zn^{2+} \cdot UDP-Gal$ -Komplexes nur unwesentlich. Die Freiheitsgrade von ursprünglich  $\chi = -158.6^\circ$ ,  $\phi = 110.3^\circ$ ,  $\gamma = 48.3^\circ$ ,  $\beta = 179.0^\circ$ ,  $\alpha = 99.4^\circ$ ,  $\delta' = -103.9^\circ$ ,  $\psi = 100.4^\circ$  und  $\omega = 171.0^\circ$  wichen lediglich in den Nachkommastellen ab. Nur der Torsionswinkel am anomeren Zentrum der Pyranose veränderte sich etwas stärker auf  $\phi_G = 73.2^\circ$ . Das Enzym an sich verharrte während der Geometrieoptimierung im Großen und Ganzen ebenfalls in seiner ursprünglichen Konformation. Es fand also keineswegs ein Wechsel in die katalytisch aktive Konformation K II statt. Das zweiwertige Kation ist ebenfalls auf Position geblieben und nach wie vor mit Asp254 und zwei Sauerstoffatomen des  $\beta$ -Phosphats komplexiert. Bei der verwendeten Startkonformation des Enzym-Substrat-Komplexes handelt es sich also ganz offensichtlich um eine recht stabile Geometrie. Der Minimierungsalgorithmus ist nicht in der Lage das globale Minimum (K II), das als katalytisch aktive Konformation identifiziert wurde,<sup>16,164</sup> zu finden.

### 7.2.3. Dissoziationsenthalpien und Aktivitäten

Die geometrieoptimierte Struktur von  $E \cdot Zn^{2+} \cdot UDP-Gal$  diene als Ausgangspunkt für die Berechnung weiterer Enzymkomplexe mit den modifizierten Donorsubstraten 56dihydroUDP-Gal, 2dUDP-Gal, 3dUDP-Gal, ddUDP-Gal und ihren entsprechenden Produkten. Die geometrieoptimierte Struktur des GalT-UDP-Gal-Komplexes wurde entsprechend modifiziert und mit dem AMBER99-Kraftfeld energieminiert. Auch das substratfreie Enzym, welches das zweiwertige Metallkation enthielt, wurde energieminiert. Die ungebundenen Substrate und Produkte weisen eine hohe Flexibilität auf (vgl. Kapitel 6). Eine Berechnung der potenziellen Energie aus einer einzigen minimierten Struktur ist daher nicht korrekt. Vielmehr befinden sie sich in angeregten Schwingungs- und Rotationszuständen und nehmen eine Vielzahl von Konformationen ein. Daher wurden die freien Substrate und Produkte ohne Lösungsmittelmoleküle über einen kurzen Zeitraum von 1 ns bei 300 K mit dem AMBER99-Kraftfeld moleküldynamisch simuliert und daraus die gemittelten potenziellen Energien berechnet. Aus diesen Energien der freien Donorsubstrate (S), der Produkte ( $P^2$ ), der Enzym-Substrat-Komplexe (ES), der Enzym-Produkt-Komplexe ( $EP^2$ ) und des substratfreien Enzyms wurden die Bildungs- (Tabelle 7-2) und Dissoziationsenthalpien (Tabelle 7-3) des ES-Komplexes berechnet.

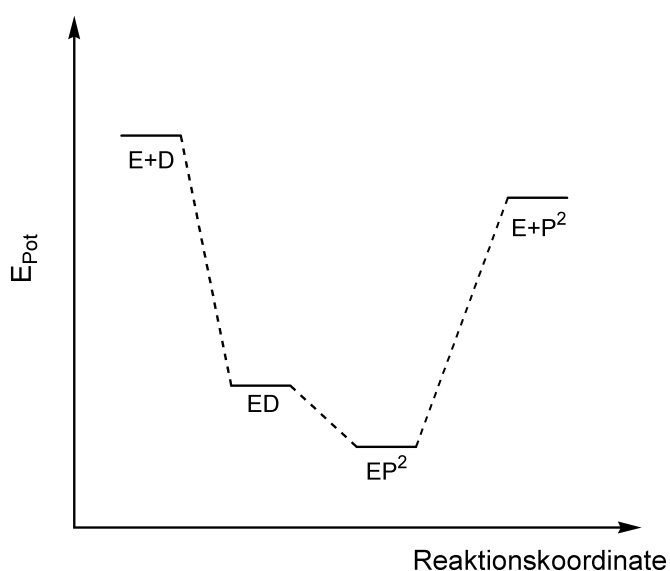
**Tabelle 7-2:** Potenzielle Energien verschiedener Donorsubstrate (S) und Enzym-Substrat-Komplexe (ES) und daraus resultierender Bildungsenthalpien.

| System                                   | rel. Aktivität <sup>153</sup> | $E_{Pot}(S)$<br>[kJ/mol] | $E_{Pot}(ES)$<br>[kJ/mol] | $\Delta H(ES-(E+S))$<br>[kJ/mol] |
|------------------------------------------|-------------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------------|
| $E \cdot Zn^{2+} \cdot UDP-Gal$          | 100                           | 266.56                   | -576493.98                | -477.27                          |
| $E \cdot Zn^{2+} \cdot 56dihydroUDP-Gal$ | 82                            | 271.00                   | -576608.26                | -496.68                          |
| $E \cdot Zn^{2+} \cdot 3dUDP-Gal$        | 56                            | 242.79                   | -576663.02                | -535.13                          |
| $E \cdot Zn^{2+} \cdot 2dUDP-Gal$        | 2                             | 240.56                   | -576756.75                | -633.08                          |
| $E \cdot Zn^{2+} \cdot ddUDP-Gal$        | 0                             | 225.19                   | -576736.69                | -613.72                          |
| $E \cdot Zn^{2+}$                        |                               |                          | -575610.01                |                                  |



**Tabelle 7-3:** Potenzielle Energien der Produkte ( $P_2$ ), der Enzym-Produkt-Komplexe ( $EP_2$ ) und daraus resultierende Dissoziationsenthalpien. Koeffizienten der Regressionsanalyse, Bestimmtheitsmaß der Pearson-Statistik und F-Wert des F-Tests.

| System                   | rel. Aktivität <sup>153</sup> | $E_{\text{Pot}}(P_2)$<br>[kJ/mol] | $E_{\text{Pot}}(EP)$<br>[kJ/mol] | $\Delta H((E+P_2)-EP_2)$<br>[kJ/mol] |
|--------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|
| UDP                      | 100                           | 150.71                            | -576540.24                       | 1080.93                              |
| 56dihydroUDP             | 82                            | 150.29                            | -576647.70                       | 1187.98                              |
| 3dUDP                    | 56                            | 128.28                            | -576700.69                       | 1218.96                              |
| 2dUDP                    | 2                             | 129.87                            | -576793.40                       | 1313.26                              |
| ddUDP                    | 0                             | 118.66                            | -576771.65                       | 1280.30                              |
| $E \cdot \text{Zn}^{2+}$ |                               |                                   | -575610.01                       |                                      |
| Steigung                 |                               |                                   |                                  | -1.86                                |
| y-Abschnitt              |                               |                                   |                                  | 1305.53                              |
| Bestimmtheitsmaß         |                               |                                   |                                  | 0.88                                 |
| F-Wert                   |                               |                                   |                                  | 10.97                                |



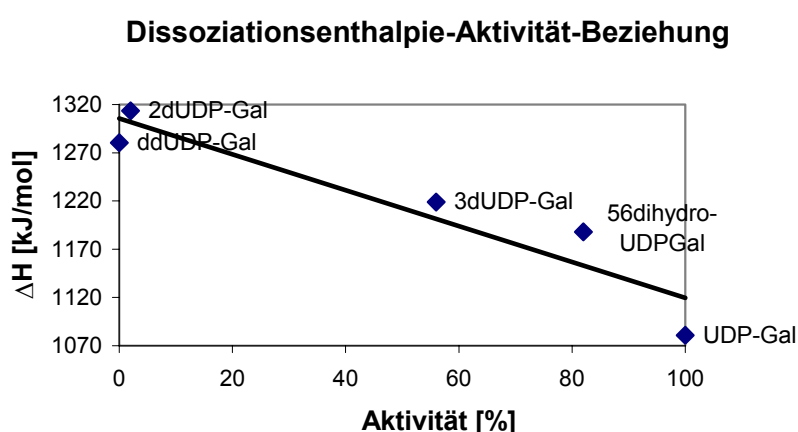
**Abbildung 7-4:** Energiediagramm der Galactosyltransferasereaktion.

Da die Berechnungen stark vereinfacht wurden, lassen die Absolutwerte der Enthalpien keine quantitative Betrachtung weder der Gleichgewichts- noch der Geschwindigkeitskonstanten zu. Dennoch reichen sie für eine qualitative Bewertung der Bildungs- bzw. Dissoziationsenthalpie aus. Die Bildungsenthalpie des Enzym-Substrat-Komplexes ist deutlich negativ, die Dissoziation hingegen positiv (Abbildung 7-4). Da sowohl die Teilchenzahl als auch die Flexibilität des Substrats bei der Assoziation abnimmt, dürfte der Enzym-Substrat-Komplex entropisch ungünstiger sein. Die Größe der Entropie wurde nicht quantifiziert, und somit ließ sich aus diesen Rechnungen nicht definitiv beurteilen, ob die Dissoziation oder die

## 7. Aktivitäten von Zuckernucleotiden in der GalT-Reaktion

Assoziation den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt. Allerdings ist die Enthalpie sehr groß und wird vermutlich die freie Enthalpie dominieren. Demzufolge fände die Dissoziation der Produkte (Schritt f, Abbildung 7-3) seltener statt als die Anlagerung der Substrate (Schritt b, Abbildung 7-3) und wäre geschwindigkeitsbestimmend. Dies steht im Einklang mit der sehr kleinen Michaelis-Konstante für Schritt b, die eine sehr hohe Affinität von dem bereits mit dem Ion beladenen Enzym GalT•Ion zu seinem Substrat UDP-Gal beschreibt. Die Dissoziationskonstante ist praktisch null.<sup>170</sup>

Obwohl die absoluten Enthalpien nicht zur Berechnung von Geschwindigkeitskonstanten geeignet sind, lassen sich die relativen Bildungsenthalpien der unterschiedlichen Enzym-Substrat-Systeme durchaus zur quantitativen Analyse heranziehen. Unter der Annahme, dass unbekannte Faktoren, wie beispielsweise die Entropien, Aktivierungsenergien etc., bei den unterschiedlichen Substraten einen konstanten gleichen Beitrag zur Aktivität leisten, der Fehler bei allen Rechnungen also gleich groß ist, wurde die Reaktion mit Hilfe von Substraten bekannter Aktivität normiert. Entsprechend der QSAR-Methodik wurde nach einer Regressionsanalyse ein linearer Zusammenhang zwischen Aktivität und Enthalpie formuliert und mit der Pearson-Statistik beurteilt (vgl. Kapitel 7.1). Das Bestimmtheitsmaß beträgt 0.88. Demnach sind 88% der Variationen in der Höhe der Aktivität der unterschiedlichen Substrate mit der Dissoziationsenthalpie des EP<sub>2</sub>-Komplexes erklärbar. 12% sind nicht erklärte Variationen.



**Abbildung 7-5:** Aktivitäten modifizierter Zuckernucleotide in der GalT-Reaktion und Dissoziationsenthalpien der Produkte (P<sup>2</sup>) vom Enzym (✓). Linearer Zusammenhang zwischen Aktivität und Dissoziationsenthalpie (⊕⊕⊕).

## 7. Aktivitäten von Zuckernucleotiden in der GalT-Reaktion

Wie bei der Untersuchung der Konformation-Aktivität-Beziehung belegt der F-Wert eine hohe Signifikanz der Regressionskoeffizienten (vgl. Kapitel 7.1). Demnach ist die Wahrscheinlichkeit, dass keinen Zusammenhang zwischen Dissoziationsenthalpie und Aktivität der modifizierten Zuckernucleotide existiert, kleiner als 1%. Dennoch sollte auch hier für eine gesicherte statistische Aussage die Grundgesamtheit erhöht werden.

Die hier gefundene Dissoziationsenthalpie-Aktivität-Beziehung der Donorsubstrate in der GalT-Reaktion steht im Einklang mit früher durchgeführten Untersuchungen.<sup>153</sup> Sie ermittelten trotz geringer Aktivität starke Inhibitoreigenschaften von z.B. 2dUDP-Gal. Da davon ausgegangen werden kann, dass es sich um eine kompetitive Hemmung handelt, in der sich das Zuckernucleotid in die Bindungstasche begibt, wird der ES-Komplex durchaus gebildet. Vermutlich wird die eigentliche Reaktion ebenfalls stattfinden, da die Modifikationen der Substratderivate weit von der reaktiven Stelle entfernt sind. Allerdings dürfte die Dissoziation z.B. von 2dUDP im Vergleich zu UDP gehemmt sein, so dass die Bindungstasche besetzt bleibt.

### 7.2.4. Vorhersagen über fluoriierte Zuckernucleotide

Die statistische Analyse ergab also einen Zusammenhang zwischen der Aktivität verschiedener Zuckernucleotide in der GalT-Reaktion und der Dissoziationsenthalpie des Uridindiphosphatderivats vom Enzym. Aus dem linearen Zusammenhang sollte sich mit Hilfe der Regressionskoeffizienten die Aktivität von fluoriierten Zuckernucleotiden, deren Aktivität unbekannt ist, vorhersagen lassen: Mit einer Bestimmtheit von 88% besitzt 3fUDP-Gal eine Aktivität von 71% relativ zu UDP-Gal, dfUDP-Gal eine Aktivität von 22% und 2fUDPGal eine Aktivität von 13% (Tabelle 7-4).

**Tabelle 7-4:** Dissoziationsenthalpien und Aktivitätsvorhersagen für fluoriierte Zuckernucleotide in der Galactosyltransferasereaktion.

| System | berechnete Aktivität<br>relativ zu UDP-Gal [%] | V(P <sub>2</sub> ) | V(EP)      | $\Delta H((E+P_2)-EP_2)$ |
|--------|------------------------------------------------|--------------------|------------|--------------------------|
| 2fUDP  | 71                                             | 129.98             | -576654.29 | 1174.26                  |
| 3fUDP  | 13                                             | 139.08             | -576753.19 | 1282.26                  |
| dfUDP  | 22                                             | 114.06             | -576761.05 | 1265.10                  |

## 7. Aktivitäten von Zuckernucleotiden in der GalT-Reaktion

Für die Vorhersage der Aktivität unbekannter Donorsubstrate ist ein hohes Maß an Kenntnis über das Enzym-Substrat-System notwendig: Der Katalysemechanismus muss genauso bekannt sein, ebenso wie die 3D Struktur des Enzym-Substrat-Komplexes inklusive seines reaktiven Zentrums. Des Weiteren wurde eine direkte Beteiligung der modifizierten Strukturelemente an der eigentlichen Reaktion ausgeschlossen. Trotzdem ließen sich die Aktivitäten nicht direkt berechnen, da unbekannte Faktoren, wie die Konformationsänderung des Enzyms bei der Assoziation des Substrats oder Aktivierungsenergien bei der Anlagerung nicht berücksichtigt werden konnten. Durch QSAR-Methoden konnte dennoch ein Zusammenhang zwischen der Aktivität und der Enthalpieänderung des Systems hergestellt werden. Grundvoraussetzung hierfür war die Kenntnis der Aktivität einiger Substrate. Da die Grundgesamtheit der Substrate sehr gering für eine zuverlässige Statistik war, darf ihre Aussage nicht überbewertet werden.

## 8. Zusammenfassung

Die Konformation von Zuckernucleotiden und ihre Wechselwirkungen zur  $\beta$ -1,4-Galactosyltransferase ist Gegenstand dieser Arbeit. Da die Konformationsanalyse von Zuckernucleotiden eine vergleichsweise komplexe Fragestellung ist, wurde sie in mehrere Teilprobleme zerlegt.

Das Pyrophosphat wurde eingehend am Beispiel des Dimethyldiphosphats mit quantenmechanischen Methoden untersucht. Hierbei wurde eine Korrelation der inneren Torsionswinkel festgestellt, so dass die Konformation der Diphosphatbrücke im Wesentlichen durch die Orientierung der beiden Phosphatgruppen zueinander bestimmt wird. Beide Phosphatgruppen bevorzugen eine leicht verzerrte *gauche*-Orientierung, während die *ap*- und *sp*-Konformation Übergangszustände sind. Um eine Berechnung der komplexeren Zuckernucleotide zu ermöglichen, wurden die energetischen Zustände des Pyrophosphats für das AMBER-Kraftfeld parametrisiert.

Des Weiteren wurde der Nucleosidteil der Zuckernucleotide durch MD-Simulationen mit NMR-Randbedingungen näher untersucht und die Ergebnisse durch Vergleich mit NMR-Daten überprüft. Hierbei konnten Übereinstimmungen mit vorausgegangenen Arbeiten<sup>36,111-113</sup>, die ebenfalls die Konformation von 3dU<sup>123</sup>, ddU<sup>123,126,127</sup> und 2fU<sup>124,126</sup> untersuchten, festgestellt und um die Korrelation einiger Freiheitsgrade erweitert werden. Der *gauche*- und der anomere Effekt wurden als die konformationsbestimmenden Effekte bestätigt. Der Einfluss der Base auf die Konformation der Ribose wurde in dieser Arbeit erstmals nachgewiesen. Dabei wurde deutlich, dass keine direkte C2'-*endo/syn*- und C3'-*endo/anti*-Korrelation innerhalb eines Nucleosids existiert. Demgegenüber wurde das Verhalten der Nucleoside im Festkörper bestätigt,<sup>36</sup> wonach die Quantität der C2'-*endo*-Konformationen in Lösung im gleichgerichteten Zusammenhang mit der Menge an *syn*-Orientierungen steht. Erstmals wurde eine direkte Korrelation zwischen der östlichen Konformation der Ribose mit den *syn*-Orientierung der Base und der westlichen Konformation mit den *anti*- und *high-anti*-Orientierungen erkannt: In Abhängigkeit von der Orientierung der Base verändert sich die Abstoßung mit der Ribose. Diese Abstoßung wird durch einen Wechsel von westlichen zu östlichen Konformationen, die durch eine pseudoäquatoriale Position der Base charakterisiert sind, verringert. Einen Wechsel zwischen Nord- und Süd-Konformationen ist nicht erforderlich. Das sehr "weiche" Nucleosid ddU eignete sich gut zur Identifizierung sehr kleiner Effekte. So wurde hier erstmals eine schwache Abstoßung zwischen Ribose und exocyclischer Gruppe deutlich, wenn diese eine

## 8. Zusammenfassung

---

gg-Orientierung einnimmt. Es zeigte sich ebenfalls, dass starke Effekte, wie die additive Verstärkung des *gauche*- und des anomeren Effekts in 3dU oder der sehr starke *gauche*-Effekt in 2fU, die Flexibilität der Ribose vermindern, wodurch das gesamte Molekül deutlich rigider wird.

Mit Hilfe von MD-Simulationen mit NMR-Randbedingungen wurde das dynamische Verhalten von UDP-Gal, UDP-Glc, 5,6dihydroUDP-Gal, 3dUDP-Gal und 2dUDP-Gal ermittelt, wobei 2dUDP-Gal mit experimentellen Unsicherheiten belastet war, die sich auf die Ergebnisse der theoretischen Berechnungen auswirkten. Das Gleichgewicht eines jeden Freiheitsgrades wurde mit Hilfe der eindimensionalen Populationsanalyse genau beschrieben und anschließend in neu entwickelte Summenparameter zusammengefasst, wodurch eine Vorstellung von der Gesamtkonformation des Moleküls erhalten wurde. Hierbei wurde festgestellt, dass veränderte Substitutionsmuster an den Kohlenstoffatomen C2' und C3' die Faltung des Zuckernucleotids genauso verändern wie die Orientierung und die Position der Base.

MD-Simulationen einiger Zuckernucleotide wurden herangezogen, um die Auswirkungen ihrer Lösungskonformation auf die Aktivität mit GalT zu untersuchen. Trotz einer sehr geringen Anzahl an untersuchten Zuckernucleotide und einer tiefen Simulationstemperatur ergab sich in einer QSAR-Untersuchung ein Zusammenhang zwischen der Aktivität des Substrats in der GalT-Reaktion und der Differenz in der freien Enthalpie zwischen Grundzustand und gebundener Konformation. Die Substrate sind umso aktiver, je einfacher sie die gebundene Konformation einnehmen können.

Schließlich wurden durch Enthalpieberechnungen des freien und des mit unterschiedlichen Substraten und Produkten komplexierten Enzyms Hinweise erhalten, dass die Dissoziation den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt. Auf Grund vieler Vereinfachungen war eine direkte Berechnung der Aktivität aus den Enthalpien nicht möglich. Durch QSAR-Methoden konnte dennoch die Abhängigkeit zwischen Dissoziationsenthalpie und Aktivität bewertet und ein linearer Zusammenhang hergestellt werden. Mit diesem linearen Zusammenhang wurden Vorhersagen über die Aktivitäten von unbekannten Zuckernucleotiden mit Modifikationen im Nucleosid in der GalT-Reaktion getroffen, die in einer anderen Arbeit<sup>169</sup> überprüft werden sollen.

## 9. Experimenteller Teil

### NMR-Messungen

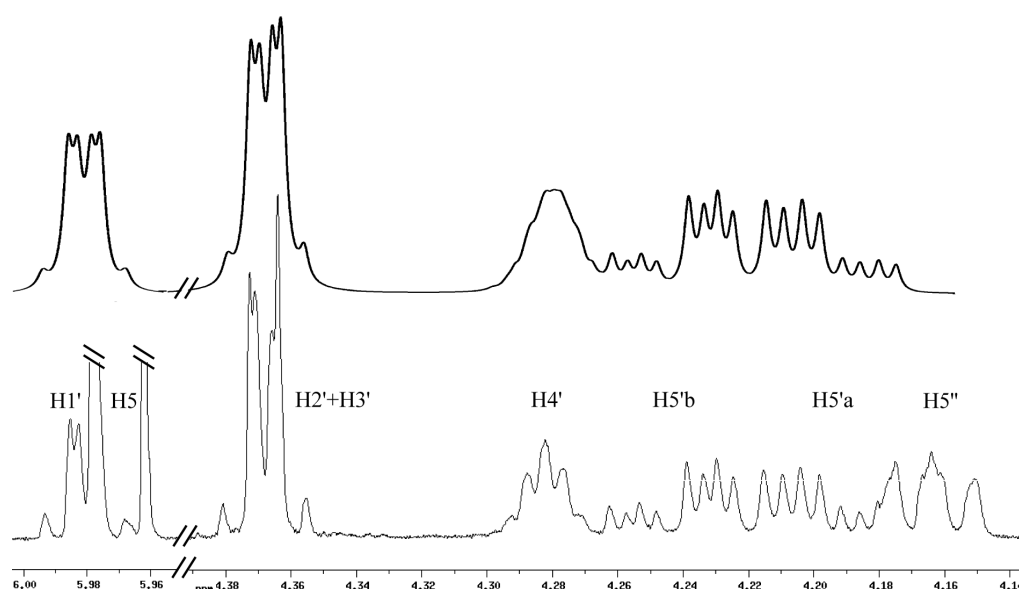
NMR-Spektren wurden mit einem Bruker DMX 500 (500.13 MHz für Protonen) aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen sind auf internes Aceton kalibriert (2.225 ppm für  $^1\text{H}$  und 31.08 für  $^{13}\text{C}$ ). Die Phosphormessungen sind auf externe 80%ige  $\text{H}_3\text{PO}_4$  bezogen.

Beim gradientenselektierten doppelquantengefilterten  $\text{H,H-COSY}$  Experiment wurden die Wartezeiten auf  $d1 = 2 \text{ s}$ ,  $d13 = 3 \mu\text{s}$ ,  $d16 = 200 \mu\text{s}$  und  $d20 = 1.203 \text{ ms}$  gesetzt. Die Gradientenpulse (Gaussform) besaßen eine Dauer von 1 ms. Somit wurde der Gleichung  $d13+g1+d16 = d13+g2+d16 = d20$  entsprochen. Die Stärken der Gradienten standen in einem Verhältnis von  $g1 : g2 = 1 : 2$ . Die Daten wurden in einer  $4 \text{ k} \times 0.25 \text{ k}$  Datenmatrix aufgenommen. Beim Prozessieren wurden die Daten mit einer quadratischen Sinusfunktion in  $t_1$  und  $t_2$  multipliziert und nach Zero-Filling in  $t_1$  zu einer  $4 \text{ k} \times 0.5 \text{ k}$  Datenmatrix phasensensitiv fourier-transformiert<sup>173</sup>. Nach Phasenkorrektur wurde eine automatische Basislinienkorrektur in  $t_2$ - und  $t_1$ -Richtung durchgeführt.

Zur Bestimmung NOE-Aufbaukurven wurden 10 mg (2fU, UDP-Glc, UDP-Gal, 56dihydro-UDP-Gal) bzw. 6 mg (2dUDP-Gal, 3dUDP-Gal) Substanz zweimal in 0.6 ml 99.9%  $\text{D}_2\text{O}$  gelöst und bei 20 mbar und 40 °C bis zur Trockne eingeengt. Anschließend wurde die Substanz in 0.6 ml 99.995%  $\text{D}_2\text{O}$  gelöst und der paramagnetische Sauerstoff entfernt, indem 20 min Stickstoff durchgeleitet wurden. Es wurden jeweils fünf NOESY-Experimente bei Mischzeiten von 0.3 s, 0.6 s, 0.9 s, 1.2 s und 1.5 s durchgeführt. Die Wartezeit vor jedem Scan betrug  $d1 = 2 \text{ s}$ , die Auflösung in  $t_1$  512 und in  $t_2$  2 k. Jedes FID wurde mit 24 Scans aufgenommen. Beim Prozessieren wurden die Daten mit einer quadratischen Sinusfunktion in  $t_1$  und  $t_2$  multipliziert und nach Zero-Filling in  $t_1$  zu einer  $2 \text{ k} \times 1 \text{ k}$  Datenmatrix phasensensitiv fourier-transformiert<sup>173</sup>. Nach Phasenkorrektur wurden die Kreuzsignale in Absorption und die Diagonalen in negativer Absorption erhalten. Anschließend wurde in  $t_2$ - und  $t_1$ -Richtung automatisch basislinienkorrigiert, die Signale integriert und auf ein Diagonalsignal (H1" oder H6) referenziert. Die Integrale der Signale wurden für jeden Kern in Abhängigkeit der Zeit dargestellt.

### NMR-Daten

$^1\text{H}$ -NMR-Spektren der Zuckernucleotiden UDP-Gal und UDP-Glc in  $\text{D}_2\text{O}$  bei 300K sind auf Grund von Signalüberlagerungen der Resonanzen  $\text{H}2'$  und  $\text{H}3'$  Spektren höherer Ordnung, so dass die Spektrenanalyse rechnerisch mit Hilfe des Computerprogramms LAOCOON 5 erfolgte. Zur Interpretation der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren von UDP-Gal und UDP-Glc wurden 133 berechneten Übergängen 27 Signale des experimentellen Spektrums zugeordnet und iterativ genähert. Für die hieraus resultierenden chemischen Verschiebungen und Kopplungskonstanten der Riboseringprotonen ergab sich eine Quadratwurzelabweichungen von  $\text{rms} < 0.19$  Hz. Gleichheit der beiden Spektren in Näherung gilt als Beweis der richtigen Interpretation.



**Abbildung 9-1:** Ausschnitt des  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums von Uridin-5'-O-diphosphor- $\alpha$ -galactose (UDP-Gal) in  $\text{D}_2\text{O}$  bei 300K (unten) und die Computersimulation des entsprechenden Riboseteils (oben). Die Resonanzen  $\text{H}1'$  und  $\text{H}5'a$  sind teilweise überlagert.



**Tabelle 9-1:**  $^1\text{H}$ -NMR-Daten von UDP-Gal, UDP-Glc, 56dihydroUDP-Gal, 2dUDP-Gal und 3dUDP-Gal in  $\text{D}_2\text{O}$  bei 300 K (Aceton = 2.225 ppm, 31.08 ppm) in Ergänzung zu bestehenden NMR-Daten<sup>29,153,174</sup>. In Galactopyranosen ist das prochirale Proton H6''R tieffeld von H6''S verschoben<sup>175</sup> und somit wurde die Resonanz H6''b dem Proton H6''R zugeordnet. In Glucopyranosen ist die Resonanz von H6''S tieffeldverschoben zu H6''R<sup>176</sup>, so dass H6''b als das prochirale Proton H6''S festgelegt wurde. In Entsprechung von Uridinmonophosphat<sup>130</sup> wurde die Resonanz H5'b dem prochirale Proton H5'S zugeordnet. In 2dUDP-Gal wurde anhand eines starken NOE zwischen H6/H2'a H2'a als H2'S festgelegt, in 3dUDP-Gal wurde mittels NOE H2'/H3'R der Resonanz H3'b das Proton H3'R zugeordnet. Das Proton H6R von 56dihydroUDP-Gal konnte nicht durch NOEs zugeordnet werden und wurden auf Grund der besten Übereinstimmung mit den Ergebnissen der MD-Simulation als Resonanz H6a festgelegt.

|                                    | UDP-Gal | UDP-Glc | 56dihydro-<br>UDP-Gal | 2dUDP-Gal | 3dUDP-Gal |
|------------------------------------|---------|---------|-----------------------|-----------|-----------|
| H5 od. H5a                         | 5.975   | 5.980   | 2.776                 | 5.929     | 5.926     |
| $^3J_{\text{H5a,H6a}}$             | 8.1     | 8.1     | 7.0                   | 8.2       | 8.2       |
| $^3J_{\text{H5a,H6b}}$             | -       | -       | 6.5                   | -         | -         |
| $^3J_{\text{H5a,H5b}}$             | -       | -       | 12.8                  | -         | -         |
| H5b                                | -       | -       | 2.776                 | -         | -         |
| $^3J_{\text{H5b,H6a}}$             | -       | -       | 7.0                   | -         | -         |
| $^3J_{\text{H5b,H6b}}$             | -       | -       | 6.5                   | -         | -         |
| H6 bzw. H6a                        | 7.952   | 7.955   | 3.577                 | 7.910     | 7.998     |
| $^3J_{\text{H6a,H6b}}$             | -       | -       | 13.0                  | -         | -         |
| H6b                                | -       | -       | 3.671                 | -         | -         |
| H1'                                | 5.986   | 5.990   | 5.908                 | 6.307     | 5.828     |
| $^3J_{\text{H1}',\text{H2'a}}$     | 4.6     | 4.6     | 7.0                   | 6.8       | 2.0       |
| $^3J_{\text{H1}',\text{H2'b}}$     | -       | -       | -                     | 6.8       | -         |
| H2' bzw. H2'a                      | 4.373   | 4.380   | 4.361                 | 2.355     | 4.520     |
| $^3J_{\text{H2'a,H3'a}}$           | 4.9     | 4.8     | 5.5                   | 6.2       | 2.7       |
| $^3J_{\text{H2'a,H3'b}}$           | -       | -       | -                     | -         | 5.8       |
| $^3J_{\text{H2'a,H2'b}}$           | -       | -       | -                     | 14.0      | -         |
| H2'b                               | -       | -       | -                     | 2.378     | -         |
| $^3J_{\text{H2'b,H3'a}}$           | -       | -       | -                     | 3.6       | -         |
| H3'a bzw. H3'                      | 4.373   | 4.381   | 4.316                 | 4.587     | 2.083     |
| $^3J_{\text{H3'a,H4'}}$            | 4.8     | 4.9     | 2.7                   | 3.2       | 5.9       |
| $^3J_{\text{H3'a,H3'b}}$           | -       | -       | -                     | -         | 13.9      |
| H3'b                               | -       | -       | -                     | -         | 2.209     |
| $^3J_{\text{H3'b,H4'}}$            | -       | -       | -                     | -         | 9.6       |
| H4'                                | 4.285   | 4.296   | 4.183                 | 4.182     | 4.655     |
| $^4J_{\text{H4'},\text{P}\alpha}$  | 1.9     | 1.9     | 2.8                   | 1.9       | n.a.      |
| $^3J_{\text{H4'},\text{H5'a}}$     | 3.2     | 3.0     | 3.2                   | 3.0       | 3.6       |
| $^3J_{\text{H4'},\text{H5'b}}$     | 2.7     | 2.6     | 3.1                   | 3.2       | 2.4       |
| H5'a                               | 4.203   | 4.211   | 4.122                 | 4.121     | 4.126     |
| $^2J_{\text{H5'a,H5'b}}$           | 3.2     | 11.8    | 11.8                  | 12.0      | 12.0      |
| $^3J_{\text{H5'a},\text{P}\alpha}$ | 5.7     | 5.6     | 5.2                   | 5.6       | 6.0       |
| H5'b                               | 4.246   | 4.256   | 4.122                 | 4.129     | 4.329     |
| $^3J_{\text{H5'b},\text{P}\alpha}$ | 4.5     | 4.6     | 5.6                   | 4.6       | 5.0       |

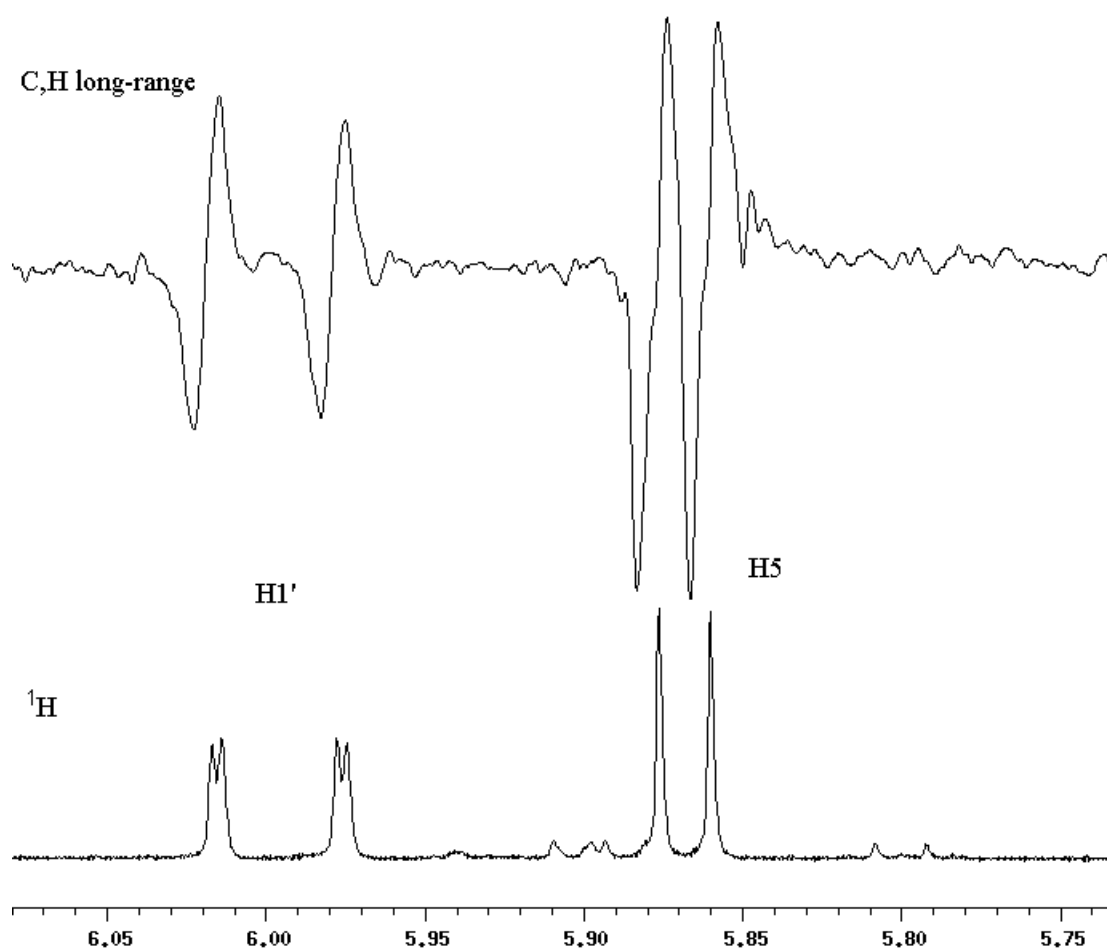
noch Tabelle 9-1:

|                     | UDP-Gal | UDP-Glc | 56dihydro-<br>UDP-Gal | 2dUDP-Gal | 3dUDP-Gal |
|---------------------|---------|---------|-----------------------|-----------|-----------|
| H1"                 | 5.637   | 5.607   | 5.629                 | 5.613     | 5.631     |
| $^3J_{H1'',H2''}$   | 3.6     | 3.5     | 3.7                   | 3.7       | 3.6       |
| $^3J_{H1'',P\beta}$ | 7.2     | 7.3     | 7.2                   | 7.2       | 7.2       |
| H2"                 | 3.802   | 3.539   | 3.802                 | 3.778     | 3.790     |
| $^3J_{H2'',H3''}$   | 10.3    | 9.8     | 10.3                  | 10.2      | 10.2      |
| $^4J_{H2'',P\beta}$ | 3.0     | 3.0     | 3.2                   | 3.1       | 2.5       |
| H3"                 | 3.911   | 3.780   | 3.914                 | 3.889     | 3.909     |
| $^3J_{H3'',H4''}$   | 3.3     | 9.3     | 3.4                   | 3.3       | 3.3       |
| H4"                 | 4.025   | 3.468   | 4.035                 | 4.003     | 4.016     |
| $^3J_{H4'',H5''}$   | 0.7     | 10.0    | 1.0                   | 0.9       | 0.9       |
| H5"                 | 4.169   | 3.902   | 4.174                 | 4.145     | 4.167     |
| $^3J_{H5'',H6''a}$  | 5.2     | 4.5     | 5.2                   | 5.2       | 5.2       |
| $^3J_{H5'',H6''b}$  | 7.2     | 2.4     | 7.2                   | 7.2       | 7.2       |
| H6"a                | 3.712   | 3.777   | 3.736                 | 3.704     | 3.716     |
| $^2J_{H6''a,H6''b}$ | 11.7    | 12.4    | 11.7                  | 11.9      | 11.8      |
| H6"b                | 3.755   | 3.862   | 3.757                 | 3.733     | 3.749     |

**Tabelle 9-2:**  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten von UDP-Gal, UDP-Glc und 56dihydroUDP-Gal in  $\text{D}_2\text{O}$  bei 300K (Aceton = 2.225 ppm, 31.08 ppm). Die  $^{13}\text{C}$  bzw.  $^{31}\text{P}$  Daten von UDP-Glc<sup>177</sup>, 56dihydroUDP-Gal<sup>178</sup>, 2dUDP-Gal und 3dUDP-Gal sind bekannt<sup>153</sup>.

|                     | UDP-Gal | UDP-Glc | 56dihydroUDP-Gal |
|---------------------|---------|---------|------------------|
| C2                  | 152.70  | 152.68  | 155.10           |
| C4                  | 167.09  | 167.08  | 174.37           |
| C5                  | 103.52  | 103.51  | 30.56            |
| C6                  | 142.46  | 142.05  | 36.46            |
| C1'                 | 89.23   | 89.22   | 87.40            |
| C2'                 | 74.61   | 74.60   | 70.51            |
| C3'                 | 70.51   | 70.49   | 70.88            |
| C4'                 | 84.10   | 84.07   | 82.88            |
| $^3J_{C4',P\alpha}$ | 9.1     | 9.1     | 9.1              |
| C5'                 | 65.79   | 65.76   | 66.00            |
| $^2J_{C5',P\alpha}$ | 5.3     | 5.4     | 5.6              |
| C1"                 | 96.66   | 96.00   | 96.17            |
| $^2J_{C1'',P\beta}$ | 6.8     | 6.7     | 6.5              |
| C2"                 | 69.26   | 72.45   | 68.77            |
| $^3J_{C2'',P\beta}$ | 8.3     | 8.7     | 8.3              |
| C3"                 | 70.17   | 73.71   | 69.71            |
| C4"                 | 69.96   | 70.04   | 69.50            |
| C5"                 | 72.75   | 73.64   | 72.29            |
| C6"                 | 61.85   | 61.18   | 61.40            |

Die  $^1\text{H}$ -NMR-Daten für 2fU wurden der Literatur entnommen<sup>124</sup>. Zusätzlich wurden selektive gradientenselektierten Hadamard-Experimente zur Bestimmung von heteronuclearen C,H-Fernkopplungen durchgeführt (vgl. Kapitel 3.2.3). Die aktiven heteronucleare C,H-Kopplungen erscheinen in Antiphase, die restlichen sind in-Phase (). Beim Prozessieren wurde das FID mit einer e-Funktion multipliziert ( $lb = 1$ ). Die dadurch erzielte Signalverstärkung führte zu einer Erniedrigung der Auflösung, wodurch die kleine Kopplung  $^3J_{\text{H1}',\text{H2}'}$  nicht mehr zu erkennen war. Für die heteronuclearen Kopplungen wurde  $^3J_{\text{C2,H1}'} = 3.8 \text{ Hz}$  und  $^3J_{\text{C6,H1}'} = 3.9 \text{ Hz}$  erhalten.



**Abbildung 9-2:** Ausschnitt eines  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums (unten) und eines Experiments zur Bestimmung von C,H-Fernkopplungen (oben) von 2fU.

### Quantenmechanische Rechnungen

Ab initio Rechnungen wurden mit dem Computerprogramm GAUSSIAN94<sup>179</sup> und GAUSSIAN98<sup>180</sup> auf einem Pentium II Computer (300 MHz), einer HP-Workstation (J 5000) und einem Vektorrechner des RRZNs Hannover (VPP 300 mit vier Prozessorelementen je 2.2 GFLOPS und insgesamt 8 GB Arbeitsspeicher) durchgeführt. Es wurde der 6-31G\*- und der 6-31+G\*-Basissatz zur Berechnung der hier untersuchten Moleküle verwendet. Geometrieoptimierungen wurden sowohl mit der HF- als auch mit der MP2-Methode durchgeführt und dabei stets der Berny Algorithmus<sup>181</sup> verwendet.

Semiempirische Rechnungen wurden mit MOPAC 6<sup>182</sup> auf einer SGI Workstation (R4400) durchgeführt. Für die Geometrieoptimierung wurde der EF-Algorithmus zur Suche des Minimums in Kombination mit der PM3-Methode verwendet.

### Ladungen

Die ESP Ladungen wurden mit GAUSSIAN 94<sup>179</sup>, GAUSSIAN 98<sup>180</sup> auf einem Pentium II Computer (300 MHz) und einer HP-Workstation (J 5000) von geometrieoptimierten Strukturen auf HF/6-31G\*-Niveau der jeweiligen Moleküle oder Molekülteile erhalten und mit dem AMBER 5.0 Programmpaket<sup>183</sup> auf einer SGI Workstation (R4400) entsprechend der RESP-Methode transformiert.

Für DMDP und DPP wurden zwei Konformationen für die restlichen Moleküle eine Konformation auf HF/6-31G\*-Niveau geometrieoptimiert und hieraus ESP-Ladungen erhalten. Diese wurden nach dem zweistufigen RESP-Modell wie folgt angepasst. Zunächst wurden allen Atomen, mit Ausnahme der Wasserstoffe, schwache Randbedingungen (Faktor = 0.0005 au) in Form einer hyperbolischen Funktion auferlegt. Zusätzlich wurden Symmetriefunktionen eingeführt, durch die beide Phosphoratome und die vier Carboxylsauerstoffe bei DMDP und DPP äquivalent wurden. Im zweiten Schritt wurden die Ladungen der Wasserstoffe symmetrisiert. Hierzu wurden die Methylgruppen von DMDP und DPP, die Hydroxymethylgruppen der Nucleoside und Pyranosen und die alkyllischen Gruppen des Uracilrings von 5,6-Dihydrouridin mit stärkeren Randbedingungen berechnet (Faktor = 0.001 au). Die Ladungen der Wasserstoffe wurden während des Anpassungsprozesses gemittelt und die der Kohlenstoffe neu berechnet. Die Ladungen aller übrigen Atome werden konstant gehalten. In Tabelle 9-3 sind ESP Ladungen für DMDP und den daraus resultierenden RESP-Ladungen angegeben. Als Vergleich sind Ladungen aus der Mulliken Populationsanalyse mit aufgeführt. Die RESP-Partialladungen aller übrigen hier ver-

wendeten Moleküle sind in Tabelle 9-4 und Tabelle 9-5 dargestellt und wurden ohne weitere Modifikationen für nachfolgende Kraftfeldrechnungen verwendet.

**Tabelle 9-3:** ESP, Mulliken und RESP-Ladungen von DMDP.

| Atom            | <i>sc</i> -Konformation<br>( $\delta' = 65.3^\circ$ ) |          | - <i>sc</i> -Konformation<br>( $\delta' = -65.3^\circ$ ) |          | RESP   |
|-----------------|-------------------------------------------------------|----------|----------------------------------------------------------|----------|--------|
|                 | ESP                                                   | Mulliken | ESP                                                      | Mulliken |        |
| H (Methyl-)     | 0.087                                                 | 0.222    | -0.019                                                   | 0.126    | 0.009  |
| C (Methyl-)     | 0.068                                                 | -0.141   | 0.271                                                    | -0.148   | 0.167  |
| H (Methyl-)     | -0.014                                                | 0.071    | -0.007                                                   | 0.181    | 0.009  |
| H (Methyl-)     | 0.010                                                 | 0.108    | -0.050                                                   | 0.080    | 0.009  |
| O (Ester-)      | -0.498                                                | -0.750   | -0.572                                                   | -0.719   | -0.575 |
| P               | 1.298                                                 | 1.577    | 1.283                                                    | 1.588    | 1.310  |
| O (Carboxyl-)   | -0.823                                                | -0.852   | -0.813                                                   | -0.871   | -0.828 |
| O (Carboxyl-)   | -0.865                                                | -0.815   | -0.838                                                   | -0.804   | -0.828 |
| O <sub>pp</sub> | -0.518                                                | -0.854   | -0.514                                                   | -0.854   | -0.543 |
| P               | 1.277                                                 | 1.588    | 1.294                                                    | 1.577    | 1.310  |
| O (Carboxyl-)   | -0.812                                                | -0.871   | -0.823                                                   | -0.852   | -0.828 |
| O (Carboxyl-)   | -0.836                                                | -0.804   | -0.866                                                   | -0.815   | -0.828 |
| O (Ester-)      | -0.560                                                | -0.719   | -0.506                                                   | -0.750   | -0.575 |
| C (Methyl-)     | 0.233                                                 | -0.148   | 0.122                                                    | -0.141   | 0.167  |
| H (Methyl-)     | -0.011                                                | 0.126    | -0.029                                                   | 0.071    | 0.009  |
| H (Methyl-)     | 0.004                                                 | 0.181    | -0.001                                                   | 0.108    | 0.009  |
| H (Methyl-)     | -0.041                                                | 0.080    | 0.069                                                    | 0.222    | 0.009  |

**Tabelle 9-4:** RESP-Ladungen von Uridin (U), 2'-Desoxyuridin (2dU), 3'-Desoxyuridin (3dU), 2',3'-Didesoxyuridin (ddU) und 5,6-Dihydrouridin (56dihydroU).

| Atom        | U      | 2dU    | 3dU    | ddU    | 56dihydroU |
|-------------|--------|--------|--------|--------|------------|
| N1          | 0.096  | 0.0359 | 0.059  | -0.013 | -0.073     |
| C2          | 0.522  | -0.564 | 0.500  | 0.561  | 0.522      |
| O2          | -0.571 | -0.575 | -0.573 | -0.585 | -0.584     |
| N3          | -0.418 | -0.472 | -0.398 | -0.425 | -0.465     |
| HN3         | 0.322  | 0.334  | 0.314  | 0.323  | 0.336      |
| C4          | 0.635  | 0.656  | 0.638  | 0.622  | 0.603      |
| O4          | -0.563 | -0.575 | -0.570 | -0.561 | -0.561     |
| C5          | -0.354 | -0.383 | -0.352 | -0.368 | -0.076     |
| H5          | 0.179  | 0.176  | 0.175  | 0.179  | 0.062      |
| H5'b        | -      | -      | -      | -      | 0.062      |
| C6          | -0.153 | -0.086 | -0.184 | -0.069 | -0.076     |
| H6          | 0.233  | 0.234  | 0.272  | 0.205  | 0.092      |
| H6'b        | -      | -      | -      | -      | 0.092      |
| C1'         | 0.057  | 0.039  | 0.126  | 0.078  | 0.051      |
| H1'         | 0.166  | 0.187  | 0.117  | 0.157  | 0.143      |
| H1'b        | -      | -      | -      | -      | -          |
| C2'         | 0.221  | -0.119 | 0.117  | -0.028 | 0.140      |
| O2' o. H2'R | -0.667 | 0.108  | -0.635 | 0.045  | -0.691     |
| HO2'        | 0.446  | -      | 0.117  | -      | 0.462      |
| H2' o. H2'S | 0.114  | 0.050  | 0.073  | 0.040  | 0.073      |
| C3'         | 0.103  | 0.204  | -0.016 | -0.090 | 0.322      |
| O3' o. H3'S | -0.659 | -0.643 | 0.075  | 0.049  | -0.703     |
| HO3'        | 0.435  | 0.407  | -      | -      | 0.457      |
| H3' o. H3'R | 0.096  | 0.070  | 0.011  | 0.062  | 0.050      |
| C4'         | 0.198  | 0.112  | 0.105  | 0.158  | 0.075      |
| O4'         | -0.426 | -0.393 | -0.383 | -0.400 | -0.384     |
| H4'         | 0.060  | 0.085  | 0.081  | 0.063  | 0.128      |
| H4'b        | -      | -      | -      | -      | -          |
| C5'         | 0.034  | 0.019  | 0.061  | 0.037  | -0.007     |
| O5'         | -0.718 | -0.608 | -0.646 | -0.589 | -0.693     |
| HO5'        | 0.482  | 0.429  | 0.444  | 0.423  | 0.475      |
| H5'R        | 0.068  | 0.072  | 0.079  | 0.063  | 0.084      |
| H5'S        | 0.068  | 0.072  | 0.079  | 0.063  | 0.084      |

**Tabelle 9-5:** RESP-Ladungen von 2'-Desoxy-2'-fluorouridin (2fU), 3'-Desoxy-3'-fluorouridin (3fU), 2',3'-Dideoxy-2',3'-difluorouridin (dfU), Galactose-1-phosphat (GalP) und Glucose-1-phosphat (GlcP).

| Atom       | 2fU    | 3fU    | dfU    | Atom           | GalP   | GlcP   |
|------------|--------|--------|--------|----------------|--------|--------|
| N1         | 0.058  | 0.071  | 0.037  | P              | 1.195  | 1.207  |
| C2         | 0.567  | 0.472  | 0.571  | O(Hydroxyl-)   | -0.696 | -0.690 |
| O2         | -0.571 | -0.573 | -0.574 | O(Carboxylat-) | -0.772 | -0.772 |
| N3         | -0.455 | -0.354 | -0.447 | H(Hydroxyl-)   | -0.399 | -0.393 |
| HN3        | 0.329  | 0.311  | 0.328  | O1"            | -0.377 | -0.391 |
| C4         | 0.658  | 0.601  | 0.653  | C1"            | 0.042  | 0.086  |
| O4         | -0.568 | -0.558 | -0.564 | H1"            | 0.148  | 0.154  |
| C5         | -0.366 | -0.326 | -0.357 | C2"            | 0.152  | 0.174  |
| H5         | 0.180  | 0.176  | 0.181  | O2"            | -0.669 | -0.686 |
| C6         | -0.138 | -0.187 | -0.138 | HO2"           | 0.445  | 0.438  |
| H6         | 0.236  | 0.248  | 0.233  | H2"            | 0.099  | 0.082  |
| C1'        | 0.029  | 0.100  | 0.042  | C3"            | 0.196  | 0.148  |
| H1'        | 0.197  | 0.131  | 0.191  | O3"            | -0.651 | -0.698 |
| C2'        | 0.122  | 0.273  | 0.152  | HO3"           | 0.422  | 0.446  |
| O2' o. F2' | -0.220 | -0.674 | -0.234 | H3"            | 0.107  | 0.094  |
| HO2'       | -      | 0.445  | -      | C4"            | -0.056 | 0.070  |
| H2'        | 0.097  | 0.046  | 0.091  | O4"            | -0.618 | -0.713 |
| C3'        | 0.212  | 0.123  | 0.168  | HO4"           | 0.408  | 0.475  |
| O3' o. F3' | -0.632 | -0.226 | -0.247 | H4"            | 0.136  | 0.092  |
| HO3'       | 0.417  | -      | -      | C5"            | 0.013  | 0.112  |
| H3'        | 0.078  | 0.118  | 0.110  | O5"            | -0.347 | -0.416 |
| C4'        | 0.110  | 0.090  | 0.116  | C5"            | 0.093  | 0.112  |
| O4'        | -0.380 | -0.392 | -0.378 | C6"            | 0.241  | 0.183  |
| H4'        | 0.081  | 0.110  | 0.097  | O6"            | -0.693 | -0.701 |
| C5'        | 0.032  | 0.016  | 0.026  | HO6"           | 0.454  | 0.464  |
| O5'        | -0.690 | -0.660 | -0.689 | H6'R           | 0.031  | 0.047  |
| HO5'       | 0.471  | 0.461  | 0.472  | H6'S           | 0.031  | 0.047  |
| H5'R       | 0.072  | 0.076  | 0.079  |                |        |        |
| H5'S       | 0.072  | 0.076  | 0.079  |                |        |        |

### Molekülmechanische Rechnungen

Molekülmechanische Rechnungen wurde mit dem AMBER 5.0 Programmpaket<sup>183</sup> auf SGI Workstations (R4400 und R10000) durchgeführt mit Ausnahme des gelösten Proteins, das auf einer HP-Workstation (J 5000) berechnet wurde. Für MD-Simulationen wurde eine Zieltemperatur von 300 K gewählt. Die Integrationsweite betrug 1 fs und die Simulationsdauer 20.3 ns. Während der ersten 0.3 ns wurden die Randbedingungen langsam angeschaltet und das System langsam von 0 K auf 300 K erwärmt. Die Geschwindigkeiten der Atome wurden alle 500 fs der Temperatur angepasst. Die nichtbindenden Wechselwirkungen wurden alle

## 9. Experimenteller Teil

---

100 fs neu berechnet. Die Translation und Rotation des Systems wurden alle 50 fs entfernt. Es wurden nur die letzten 20 ns sowie jede 200ste Konformation gespeichert.

Startstrukturen für die MD-Simulationen wurden analog zur Röntgenstruktur von 2dU<sup>103</sup> bei den Nucleosiden, von UDP-Glc<sup>28</sup> bei den Zuckernucleotiden und von GalT<sup>163</sup> gewählt. Bei DMDP diente das energetische Minimum der ab initio Rechnung als Startstruktur. Vor der MD-Simulation wurde das System die ersten 50 Zyklen mit der Steepest Descent und maximal weitere 450 Zyklen mit der Conjugated Gradient Methode<sup>184</sup> energieminiert mit einem Energiegradienten von 0.001 kcal/mol als Abbruchkriterium. Der Enzym-Substrat-Komplex wurde mit insgesamt 9962 Wassermolekülen in einer Box mit einer Kantenlänge von 78.587 Å, 71.550 Å und 76.702 Å gelöst und vier Chloridionen zugefügt, um ein elektrisch neutrales System zu erhalten. Das System besaß eine Gesamtmasse von 211681.6 g/mol und eine Dichte von 0.815 g/cm<sup>3</sup>. Anschließend wurde das System mit dem AMBER99/GYLCAM 93-Kraftfeld unter Verwendung der PME Methode in 30000 Zyklen geometrioptimiert. Die Quadratwurzelabweichung im Gradienten der Energien betrug letztlich  $6.39 \cdot 10^{-3}$  N. Diese Struktur diente als Basis für alle weiteren Berechnungen des Enzyms mit modifizierten Donorsubstraten. Für die Berechnungen der Nucleoside wurde das AMBER91-Kraftfeld im Vakuum verwendet. Dasselbe Kraftfeld diente zur Berechnung der Zuckernucleotide, wurde jedoch für den Pyrophosphatteil um die hier entwickelten Parameter ergänzt. Auch der Pyranoseteil erforderte zusätzliche Parameter, die im GLYCAM93-Kraftfeld enthalten sind. Für den Torsionswinkel  $\psi$  des Phosphatrests am anomeren Sauerstoff der Pyranose wurden die Parameter des Torsionswinkels C-O-C-C für Oligosaccharide aus dem GLYCAM93-Kraftfeld übernommen. Bei Verwendung des AMBER91-Kraftfelds wurde die Dielektrizitätskonstante auf  $\epsilon = 8$  C<sup>2</sup>/Jm (distanzabhängig) gesetzt. Da das AMBER94/99-Kraftfeld nur mit explizitem Lösungsmittel arbeitet, betrug dort  $\epsilon = 1$  C<sup>2</sup>/Jm. Bei den Nucleosiden und DMDP wurden nur innerhalb eines Radius von 9 Å die nichtbindenden Wechselwirkungen berechnet, bei den Zuckernucleotiden innerhalb von 12 Å und bei der gelösten GalT mit den verschiedenen Substraten innerhalb von 8 Å. Die Energie der elektrostatischen Wechselwirkungsterme wurde entsprechend dem RESP-Modell stets durch  $EEL_S = 1.2$  dividiert, die restlichen nichtbindenden Wechselwirkungen durch  $VDW_S = 2.0$ .

Sowohl NOE-Distanzen als auch Kopplungskonstante wurden als Randbedingungen für eine MD-Rechnung verwendet. Wenn keine größeren Änderungen in der internen Koordinate zu



erwarten waren, wurde auf eine zeitliche Mittelung verzichtet. Andernfalls wurden die Torsionswinkel und Kopplungskonstanten zeitlich gemittelt in Kombination mit der ersten Ableitung der potenziellen Energie. Die pseudo-Kraft-Formulierung wurde bei Atomdistanzen verwendet. Der Exponentialabfall betrug bei Protonendistanzen  $\tau = 20$  ps, bei Torsionswinkel und Kopplungskonstanten  $\tau = 5$  ps. Der Exponent wurde für NOE-Distanzen auf *Exponent* = 6, sonst auf *Exponent* = -1 gesetzt. Da bei der pseudo-Kraft Formulierung die interne Koordinate zu Beginn der MD-Simulation nicht definiert ist, wurde sie aus einem reduzierten Mittel der Zielrandbedingung erhalten  $((r_2+r_3)/2-0.2)$  (vgl. Abbildung 3-3).

Die Randbedingungen wurden wie folgt definiert und angepasst: Sämtliche experimentell bestimmten NOE-Aufbaukurven wurden mit den NOEs verglichen, die aus den MD-Rechnungen erhalten wurden. Bei Auftreten von Diskrepanzen wurden aus den betreffenden NOEs Abstandsrandbedingungen formuliert. Dabei wurde ein definierter Abstand (z.B. H5/H6 = 2.47 Å) als Referenz verwendet und der unbekannte Abstand nach der Formel

$$r_{IS} = r_{ref} \sqrt[6]{\frac{\sigma_{ref}}{\sigma_{IS}}} \quad \text{Gleichung 9-1}$$

kalkuliert. Es wurden zunächst kleine Kraftkonstanten gewählt. In einem iterativen Prozess wurden sowohl die Kraftkonstanten als auch die Abstände durch Vergleich der experimentellen und theoretischen Daten in jeder MD-Simulation verbessert, bis sich eine annähernde Übereinstimmung einstellte. Die Kraftkonstanten der Randbedingungen sind in der Einheit kcal/mol angegeben, da es so das AMBER-Programm fordert. Eine Umrechnung in SI-Einheiten erschien daher nicht sinnvoll. Wie zuvor beschrieben können Kopplungskonstanten nur entsprechend der Gleichung 3-12 als Randbedingung definiert werden. Somit muss die hier verwendete Karplus-Beziehung für Protonen von *Altona et al.*<sup>76</sup>, die im Allgemeinen gute Resultate liefert<sup>143</sup>, in die allgemeine Form umgewandelt werden. Der dabei entstehende maximale Fehler ist in den Tabellen angegeben. Es wurden folgende Randbedingungen gewählt:

## 9. Experimenteller Teil

**Tabelle 9-6:** Randbedingungen für die MD-Rechnung von 3'-Desoxyuridin (3dU) mit den Zielrandbedingungen  $r1$ - $r4$  in Hz, Grad oder Å, den Kraftkonstanten  $k1$  und  $k2$  in kcal/mol, den Parametern für die allgemeine Karplus-Beziehung nach Gleichung 3-12  $A$ ,  $B$  und  $C$  in Hz und dem Fehler in Hz bei der Umformung der Karplus-Beziehung von *Altona et al.* in die allgemeine Gleichung.

| Rand-<br>bedingung | $r1$ | $r2$ | $r3$ | $r4$  | $k1$ | $k2$ | zeitliche<br>Mittelung | $A$  | $B$   | $C$  | Fehler |
|--------------------|------|------|------|-------|------|------|------------------------|------|-------|------|--------|
| $^3J_{H1'/H2'}$    | 1.45 | 1.5  | 1.5  | 1.55  | 0.45 | 0.45 | -                      | 5.01 | -0.91 | 1.36 | 0.3    |
| $^3J_{H2'/H3'R}$   | 4.3  | 5.3  | 5.3  | 6.3   | 1.2  | 1.2  | +                      | 7.16 | -0.99 | 1.85 | 0.8    |
| $^3J_{H2'/H3'S}$   | 1.7  | 2.7  | 2.7  | 3.7   | 1.7  | 1.7  | +                      | 6.96 | -0.99 | 2.05 | 0.4    |
| $^3J_{H3'R/H4'}$   | 9.75 | 9.8  | 9.8  | 9.85  | 0.4  | 0.4  | -                      | 7.11 | -0.99 | 1.90 | 1.0    |
| $^3J_{H3'S/H4'}$   | 5.3  | 6.3  | 6.3  | 7.3   | 1.1  | 1.1  | +                      | 6.96 | -0.99 | 2.05 | 0.3    |
| $^3J_{H4'/H5'R}$   | 3.6  | 4.6  | 4.6  | 5.6   | 2.2  | 2.2  | +                      | 8.28 | -0.99 | 1.15 | 1.3    |
| $^3J_{H4'/H5'S}$   | 1.9  | 2.9  | 2.9  | 3.9   | 2.0  | 2.0  | +                      | 7.81 | -0.99 | 1.62 | 0.3    |
| $\gamma$           | 30.0 | 60.0 | 60.0 | 90.0  | 0.3  | 0.3  | -                      |      |       |      |        |
| $\chi$             | 0.0  | 60.0 | 60.0 | 120.0 | 0.5  | 0.5  | +                      |      |       |      |        |
| H1'/H4'            | 3.2  | 3.4  | 3.4  | 3.6   | 8.0  | 8.0  | +                      |      |       |      |        |
| H1'/H3'S           | 3.9  | 4.2  | 4.2  | 4.5   | 1.0  | 1.0  | +                      |      |       |      |        |

**Tabelle 9-7:** Aus der MD-Simulation gemittelte Randbedingungen und Energien von 3dU.

| Rand-<br>bedingung | $\langle r \rangle$ |
|--------------------|---------------------|
| $^3J_{H1'/H2'}$    | 2.1 Hz              |
| $^3J_{H2'/H3'R}$   | 5.5 Hz              |
| $^3J_{H2'/H3'S}$   | 2.5 Hz              |
| $^3J_{H3'R/H4'}$   | 8.8 Hz              |
| $^3J_{H3'S/H4'}$   | 5.6 Hz              |
| $^3J_{H4'/H5'R}$   | 6.0 Hz              |
| $^3J_{H4'/H5'S}$   | 3.4 Hz              |
| $\gamma$           | 118.2°              |
| $\chi$             | 194.3°              |
| H1'/H4'            | 3.2 Å               |
| H1'/H3'S           | 3.9 Å               |
| Energien           |                     |
| T                  | 319.7 K             |
| $E_{Kin}$          | 103.8 kJ/mol        |
| $E_{Pot}$          | 213.1 kJ/mol        |
| $E_{Tot}$          | 316.9 kJ/mol        |

**Tabelle 9-8:** Randbedingungen für die MD-Rechnung von 2',3'-Didesoxyuridin (ddU) mit den Zielrandbedingungen  $r1$ - $r4$  in Hz, Grad oder Å, den Kraftkonstanten  $k1$  und  $k2$  in kcal/mol, den Parametern für die allgemeine Karplus-Beziehung nach Gleichung 3-12  $A$ ,  $B$  und  $C$  in Hz und dem Fehler in Hz bei der Umformung der Karplus-Beziehung von *Altona et al.* in die allgemeine Gleichung.

| Rand-<br>bedingung | $r1$ | $r2$ | $r3$ | $r4$ | $k1$ | $k2$ | zeitliche<br>Mittelung | $A$  | $B$   | $C$  | Fehler |
|--------------------|------|------|------|------|------|------|------------------------|------|-------|------|--------|
| $^3J_{H1'/H2'S}$   | 3.1  | 3.2  | 3.2  | 3.3  | 0.8  | 0.8  | +                      | 7.28 | -0.99 | 2.76 | 0.6    |
| $^3J_{H1'/H2'R}$   | 6.9  | 7.0  | 7.0  | 7.1  | 0.8  | 0.8  | +                      | 7.28 | -0.99 | 2.76 | 0.05   |
| $^3J_{H2'S/H3'R}$  | 8.3  | 8.4  | 8.4  | 8.5  | 0.8  | 0.8  | +                      | 7.09 | -0.98 | 3.06 | 0.1    |
| $^3J_{H2'S/H3'S}$  | 3.4  | 3.5  | 3.5  | 3.6  | 0.8  | 0.8  | +                      | 7.09 | -0.98 | 3.06 | 0.1    |
| $^3J_{H2'R/H3'R}$  | 9.9  | 10.0 | 10.0 | 10.1 | 0.4  | 0.4  | -                      | 7.09 | -0.98 | 3.06 | 0.1    |
| $^3J_{H2'R/H3'S}$  | 8.3  | 8.4  | 8.4  | 8.5  | 0.9  | 0.9  | +                      | 7.09 | -0.98 | 3.06 | 0.1    |
| $^3J_{H3'R/H4'}$   | 8.9  | 9.0  | 9.0  | 9.1  | 0.4  | 0.4  | -                      | 6.96 | -0.99 | 2.92 | 1.0    |
| $^3J_{H3'S/H4'}$   | 5.9  | 6.0  | 6.0  | 6.1  | 0.8  | 0.8  | +                      | 6.96 | -0.99 | 2.92 | 0.3    |
| $^3J_{H4'/H5'R}$   | 5.1  | 5.2  | 5.2  | 5.1  | 2.0  | 2.0  | +                      | 7.80 | -0.99 | 2.5  | 1.5    |
| $^3J_{H4'/H5'S}$   | 3.1  | 3.2  | 3.2  | 3.3  | 2.0  | 2.0  | +                      | 7.80 | -0.99 | 2.5  | 0.4    |
| $\gamma$           | 30   | 60   | 60   | 90   | 0.25 | 0.25 | -                      |      |       |      |        |
| $\chi$             | 35   | 45   | 45   | 55   | 0.2  | 0.2  | +                      |      |       |      |        |
| H1'/H4'            | 3.2  | 3.4  | 3.4  | 3.6  | 8.0  | 8.0  | +                      |      |       |      |        |
| H1'/H3'S           | 3.9  | 4.2  | 4.2  | 4.5  | 1.0  | 1.0  | +                      |      |       |      |        |

**Tabelle 9-9:** Aus der MD-Simulation gemittelte Randbedingungen und Energien von ddU.

| Rand-<br>bedingung | $\langle r \rangle$ |
|--------------------|---------------------|
| $^3J_{H1'/H2'S}$   | 4.7 Hz              |
| $^3J_{H1'/H2'R}$   | 7.7 Hz              |
| $^3J_{H2'S/H3'R}$  | 6.8 Hz              |
| $^3J_{H2'S/H3'S}$  | 4.3 Hz              |
| $^3J_{H2'R/H3'R}$  | 8.8 Hz              |
| $^3J_{H2'R/H3'S}$  | 7.0 Hz              |
| $^3J_{H3'R/H4'}$   | 8.7 Hz              |
| $^3J_{H3'S/H4'}$   | 6.8 Hz              |
| $^3J_{H4'/H5'R}$   | 7.3 Hz              |
| $^3J_{H4'/H5'S}$   | 4.9 Hz              |
| $\gamma$           | 142.8°              |
| $\chi$             | 199.4°              |
| H1'/H4'            | 3.1 Å               |
| H1'/H3'S           | 7.3 Å               |
| <b>Energien</b>    |                     |
| T                  | 296.6 K             |
| $E_{Kin}$          | 58.2 kJ/mol         |
| $E_{Pot}$          | 120.6 kJ/mol        |
| $E_{Tot}$          | 178.8 kJ/mol        |

## 9. Experimenteller Teil

Fluorierte Nucleoside sind im AMBER91-Kraftfeld nicht parametrisiert. Die Implementierung entsprechender Parameter aus dem neuen AMBER94-Kraftfeld erschien insofern problematisch, da es keine Terme für Wasserstoffbrückenbindungen enthält. Deshalb wurden Parameter aus dem MM2-Kraftfeld, welches die Grundlage für AMBER91 darstellt, umgerechnet und in AMBER 91 implementiert.

**Tabelle 9-10:** Aus dem MM2-Kraftfeld konvertierte und in das AMBER91-Kraftfeld implementierte Parameter für fluorierte Nucleoside.

|                             |   |            |                   |          |
|-----------------------------|---|------------|-------------------|----------|
| Atomgewicht                 |   |            |                   |          |
| F                           |   | 19.00      |                   |          |
| Bindungsabstände            |   |            |                   |          |
|                             |   | $K_r$      | $r_0$             |          |
| CT-F                        |   | 424.45     | 1.392             |          |
| Bindungswinkel              |   |            |                   |          |
|                             |   | $K_\theta$ | $\theta_0$        |          |
| CT-CT-F                     |   | 54.9       | 110.8             |          |
| HC-CT-F                     |   | 38.8       | 108.5             |          |
| Torsionswinkel              |   |            |                   |          |
|                             |   | Divisor    | $V_n$             | $\gamma$ |
| CT-CT-CT-F                  |   | 2          | 0.78              | 0        |
|                             |   | 2          | 0                 | 180      |
|                             |   | 2          | 0.3               | 0        |
| N*-CT-CT-F                  |   | 2          | 0                 | 0        |
|                             |   | 2          | -1.4              | 180      |
|                             |   | 2          | 0.18              | 0        |
| OS-CT-CT-F                  |   | 2          | 0                 | 0        |
|                             |   | 2          | -1.4              | 180      |
|                             |   | 2          | 0.18              | 0        |
| HC-CT-CT-F                  |   | 2          | -0.46             | 0        |
|                             |   | 2          | 1.19              | 180      |
|                             |   | 2          | 0.327             | 0        |
| OH-CT-CT-F                  |   | 2          | 0                 | 0        |
|                             |   | 2          | -1.4              | 180      |
|                             |   | 2          | 0.18              | 0        |
| Wasserstoffbrückenbindungen |   |            |                   |          |
|                             |   | $C_{ij}$   | $D_{ij}$          |          |
| H                           | F | 1704       | 488               |          |
| H2                          | F | 1704       | 488               |          |
| H3                          | F | 1704       | 488               |          |
| HO                          | F | 1704       | 488               |          |
| HW                          | F | 1704       | 488               |          |
| Van-der-Waals-Parameter     |   |            |                   |          |
|                             |   | $R^*_i$    | $\varepsilon^*_i$ |          |
| F                           |   | 1.51       | 0.18              |          |

**Tabelle 9-11:** Randbedingungen für die MD-Rechnung von 2'-Desoxy-2'-fluorouridin (2fU) mit den Zielrandbedingungen  $r1$ - $r4$  in Hz, Grad oder Å, den Kraftkonstanten  $k1$  und  $k2$  in kcal/mol, den Parametern für die allgemeine Karplus-Beziehung nach Gleichung 3-12  $A$ ,  $B$  und  $C$  in Hz und dem Fehler in Hz bei der Umformung der Karplus-Beziehung von *Altona et al.* in die allgemeine Gleichung.

| Rand-<br>bedingung | $r1$ | $r2$ | $r3$ | $r4$ | $k1$ | $k2$ | zeitliche<br>Mittelung | $A$  | $B$   | $C$  | Fehler |
|--------------------|------|------|------|------|------|------|------------------------|------|-------|------|--------|
| $^3J_{H1'/H2'}$    | 0.0  | 1.5  | 1.5  | 10.0 | 0.1  | 0.1  | -                      | 6.10 | -0.91 | 0.91 | 1.0    |
| $^3J_{H2'/H3'}$    | 1.0  | 4.9  | 4.9  | 10.0 | 0.1  | 0.1  | -                      | 8.2  | -0.91 | 0.45 | 0.6    |
| $^3J_{H3'/H4'}$    | 1.0  | 8.5  | 8.5  | 12.0 | 0.1  | 0.1  | -                      | 8.15 | -0.91 | 0.74 | 0.1    |
| $^3J_{H4'/H5'R}$   | 1.0  | 4.5  | 4.5  | 10.0 | 0.2  | 0.2  | +                      | 8.31 | -0.99 | 1.37 | 2.3    |
| $^3J_{H4'/H5'S}$   | 1.0  | 2.4  | 2.4  | 10.0 | 0.2  | 0.2  | +                      | 8.31 | -0.99 | 1.37 | 0.1    |
| $\gamma$           | 30   | 60   | 60   | 90   | 1.3  | 1.3  | -                      |      |       |      |        |
| $\gamma$           | 120  | 180  | 180  | -120 | 0.5  | 0.5  | -                      |      |       |      |        |
| $\chi$             | 35   | 45   | 45   | 55   | 1.0  | 1.0  | -                      |      |       |      |        |
| H1'/H4'            | 2.2  | 3.2  | 3.2  | 4.2  | 3.1  | 3.1  | +                      |      |       |      |        |
| C5'/N1             | 1.8  | 2.8  | 2.8  | 3.8  | 2.0  | 2.0  | +                      |      |       |      |        |
| H6/H5'R            | 2.3  | 3.3  | 3.3  | 4.3  | 0.0  | 0.2  | +                      |      |       |      |        |
| H6/H5'S            | 2.3  | 3.3  | 3.3  | 4.3  | 0.0  | 0.2  | +                      |      |       |      |        |

**Tabelle 9-12:** Aus der MD-Simulation gemittelte Randbedingungen und Energien von 2fU.

| Rand-<br>bedingung | $\langle r \rangle$ |
|--------------------|---------------------|
| $^3J_{H1'/H2'}$    | 1.9 Hz              |
| $^3J_{H2'/H3'}$    | 5.0 Hz              |
| $^3J_{H3'/H4'}$    | 8.6 Hz              |
| $^3J_{H4'/H5'R}$   | 5.9 Hz              |
| $^3J_{H4'/H5'S}$   | 4.6 Hz              |
| $\gamma$           | 159.3°              |
| $\chi$             | 117.9°              |
| H1'/H4'            | 3.0 Å               |
| C5'/N1             | 4.2 Å               |
| H6/H5'R            | 4.5 Å               |
| H6/H5'S            | 4.7 Å               |
| <b>Energien</b>    |                     |
| T                  | 298.4 K             |
| $E_{\text{Kin}}$   | 60.7 kJ/mol         |
| $E_{\text{Pot}}$   | 170.0 kJ/mol        |
| $E_{\text{Tot}}$   | 230.7 kJ/mol        |

**Tabelle 9-13:** Randbedingungen für die MD-Rechnung von UDP-Glc mit den Zielrandbedingungen  $r1$ - $r4$  in Hz, Grad oder Å, den Kraftkonstanten  $k1$  und  $k2$  in kcal/mol, den Parametern für die allgemeine Karplus-Beziehung nach Gleichung 3-12  $A$ ,  $B$  und  $C$  in Hz und dem Fehler in Hz bei der Umformung der Karplus-Beziehung von *Altona et al.* in die allgemeine Gleichung.

| Rand-<br>bedingung    | $r1$ | $r2$ | $r3$ | $r4$ | $k1$  | $k2$  | zeitliche<br>Mittelung | $A$  | $B$   | $C$  | Fehler |
|-----------------------|------|------|------|------|-------|-------|------------------------|------|-------|------|--------|
| $^3J_{H1'/H2'}$       | 1.0  | 4.6  | 4.6  | 10.0 | 0.55  | 0.55  | -                      | 6.2  | -0.91 | 1.13 | 0.3    |
| $^3J_{H2'/H3'}$       | 1.0  | 4.8  | 4.8  | 10.0 | 0.75  | 0.75  | -                      | 8.3  | -0.91 | 0.67 | 0.01   |
| $^3J_{H3'/H4'}$       | 1.0  | 4.9  | 4.9  | 10.0 | 0.5   | 0.5   | -                      | 7.97 | -0.91 | 0.78 | 0.1    |
| $^3J_{H4'/H5'R}$      | 1.0  | 3.0  | 3.0  | 10.0 | 0.2   | 0.2   | +                      | 9.78 | -0.95 | 0.48 | 2.6    |
| $^3J_{H4'/H5'S}$      | 1.0  | 2.6  | 2.6  | 10.0 | 0.4   | 0.4   | +                      | 8.31 | -0.99 | 1.37 | 0.2    |
| $^3J_{H1''/H2''}$     | 1.0  | 3.5  | 3.5  | 10.0 | 0.8   | 0.8   | -                      | 5.95 | -0.91 | 1.01 | 0.5    |
| $^3J_{H2''/H3''}$     | 1.0  | 9.8  | 9.8  | 11.0 | 0.7   | 0.7   | -                      | 9.2  | -0.99 | 0.03 | 1.5    |
| $^3J_{H5''/H6''R}$    | 1.0  | 4.5  | 4.5  | 15.0 | 0.5   | 0.5   | +                      | 8.31 | -0.99 | 1.37 | 2.3    |
| $^3J_{H5''/H6''S}$    | 1.0  | 2.4  | 2.4  | 15.0 | 0.8   | 0.8   | +                      | 8.31 | -0.99 | 1.37 | 0.2    |
| $^3J_{C2''/P\beta}$   | 1.0  | 8.7  | 8.7  | 10.0 | 0.6   | 0.6   | +                      | 6.9  | -3.4  | 0.7  |        |
| $N1/C5'$              | 2.3  | 3.3  | 3.3  | 4.3  | 1.8   | 1.8   | +                      |      |       |      |        |
| $H5/H3''$             | 4.9  | 5.9  | 5.9  | 6.9  | 0.2   | 0.2   | +                      |      |       |      |        |
| $H1'/H4'$             | 2.4  | 3.4  | 3.4  | 4.4  | 2.8   | 2.8   | +                      |      |       |      |        |
| $H2'/H1''$            | 4.8  | 5.8  | 5.8  | 6.8  | 0.2   | 0.2   | +                      |      |       |      |        |
| $H3'/H3''$            | 4.5  | 5.5  | 5.5  | 6.5  | 0.2   | 0.2   | +                      |      |       |      |        |
| $H4'/H1''$            | 4.6  | 5.6  | 5.6  | 6.6  | 0.1   | 0.1   | +                      |      |       |      |        |
| $H4'/H6''R$           | 5.4  | 6.4  | 6.4  | 7.4  | 0.1   | 0.1   | +                      |      |       |      |        |
| $H4'/H6''S$           | 5.4  | 6.4  | 6.4  | 7.4  | 0.1   | 0.1   | +                      |      |       |      |        |
| $\chi$                | 40   | 45   | 45   | 50   | 0.3   | 0.3   | -                      |      |       |      |        |
| $\chi$                | -110 | -60  | -60  | -10  | 0.4   | 0.4   | -                      |      |       |      |        |
| $\gamma$              | 0    | 60   | 60   | 120  | 1.73  | 1.73  | -                      |      |       |      |        |
| $\gamma$              | 120  | 180  | 180  | -120 | 1.18  | 1.18  | -                      |      |       |      |        |
| $\omega$              | -110 | -60  | -60  | -10  | 1.6   | 1.6   | -                      |      |       |      |        |
| $\omega$              | 0    | 60   | 60   | 120  | 1.13  | 1.13  | -                      |      |       |      |        |
| $\beta$               | 120  | 180  | 180  | -120 | -0.32 | -0.32 | -                      |      |       |      |        |
| $\phi_G$              | 100  | 150  | 150  | -160 | 1.1   | 1.1   | -                      |      |       |      |        |
| $H2''-C2''-C3''-H3''$ | 120  | 180  | 180  | -120 | 1.5   | 1.5   | -                      |      |       |      |        |
| $H4''-C4''-C5''-H5''$ | 120  | 180  | 180  | -120 | 1.5   | 1.5   | -                      |      |       |      |        |

**Tabelle 9-14:** Aus der MD-Simulation erhaltene Randbedingungen für UDP-Glc.

| Rand-<br>bedingung  | $\langle r \rangle$ |
|---------------------|---------------------|
| $^3J_{H1'/H2'}$     | 4.3 Hz              |
| $^3J_{H2'/H3'}$     | 5.5 Hz              |
| $^3J_{H3'/H4'}$     | 4.9 Hz              |
| $^3J_{H4'/H5'R}$    | 4.2 Hz              |
| $^3J_{H4'/H5'S}$    | 3.7 Hz              |
| $^3J_{H1''/H2''}$   | 3.1 Hz              |
| $^3J_{H2''/H3''}$   | 9.9 Hz              |
| $^3J_{H5''/H6''R}$  | 5.6 Hz              |
| $^3J_{H5''/H6''S}$  | 3.5 Hz              |
| $^3J_{C2''/P\beta}$ | 8.0 Hz              |
| N1/C5'              | 4.0 Å               |
| H5/H3''             | 5.3 Å               |
| H1'/H4'             | 3.2 Å               |
| H2'/H1''            | 5.9 Å               |
| H3'/H3''            | 6.0 Å               |
| H4'/H1''            | 5.7 Å               |
| H4'/H6''R           | 7.0 Å               |
| H4'/H6''S           | 6.2 Å               |
| $\chi$              | -140.2°             |
| $\gamma$            | 91.4°               |
| $\omega$            | -149.5°             |
| $\beta$             | 168.8°              |
| $\phi_G$            | 88.3°               |
| H2''-C2''-C3''-H3'' | 172.7°              |
| H4''-C4''-C5''-H5'' | -175.6°             |
| <b>Energien</b>     |                     |
| T                   | 299.3 K             |
| $E_{Kin}$           | 134.4 kJ/mol        |
| $E_{Pot}$           | 365.5 kJ/mol        |
| $E_{Tot}$           | 499.9 kJ/mol        |

**Tabelle 9-15:** Randbedingungen für die MD-Rechnung von UDP-Gal mit den Zielrandbedingungen  $r1$ - $r4$  in Hz, Grad oder Å, den Kraftkonstanten  $k1$  und  $k2$  in kcal/mol, den Parametern für die allgemeine Karplus-Beziehung nach Gleichung 3-12  $A$ ,  $B$  und  $C$  in Hz und dem Fehler in Hz bei der Umformung der Karplus-Beziehung von *Altona et al.* in die allgemeine Gleichung.

| Rand-<br>bedingung  | $r1$ | $r2$ | $r3$ | $r4$ | $k1$  | $k2$  | zeitliche<br>Mittelung | $A$  | $B$   | $C$  | Fehler |
|---------------------|------|------|------|------|-------|-------|------------------------|------|-------|------|--------|
| $^3J_{H1'/H2'}$     | 1.0  | 4.6  | 4.6  | 10.0 | 0.55  | 0.55  | -                      | 6.2  | -0.91 | 1.13 | 0.3    |
| $^3J_{H2'/H3'}$     | 1.0  | 4.9  | 4.9  | 10.0 | 0.75  | 0.75  | -                      | 8.3  | -0.91 | 0.67 | 0.01   |
| $^3J_{H3'/H4'}$     | 1.0  | 4.8  | 4.8  | 10.0 | 0.5   | 0.5   | -                      | 7.97 | -0.91 | 0.78 | 0.1    |
| $^3J_{H4'/H5'R}$    | 1.0  | 3.2  | 3.2  | 10.0 | 0.2   | 0.2   | +                      | 9.78 | -0.95 | 0.48 | 2.6    |
| $^3J_{H4'/H5'S}$    | 1.0  | 2.7  | 2.7  | 10.0 | 0.2   | 0.2   | +                      | 8.31 | -0.99 | 1.37 | 0.2    |
| $^3J_{H1''/H2''}$   | 1.0  | 3.5  | 3.5  | 10.0 | 0.5   | 0.5   | -                      | 5.95 | -0.91 | 1.01 | 0.5    |
| $^3J_{H2''/H3''}$   | 1.0  | 9.8  | 9.8  | 11.0 | 0.5   | 0.5   | -                      | 9.2  | -0.99 | 0.03 | 1.5    |
| $^3J_{H5''/H6''R}$  | 5.0  | 5.2  | 5.2  | 5.4  | 0.5   | 0.5   | +                      | 8.31 | -0.99 | 1.37 | 2.3    |
| $^3J_{H5''/H6''S}$  | 7.0  | 7.2  | 7.2  | 7.4  | 0.5   | 0.5   | +                      | 8.31 | -0.99 | 1.37 | 0.2    |
| $^3J_{C2''/P\beta}$ | 1.0  | 8.2  | 8.2  | 10.0 | 1.0   | 1.0   | +                      | 6.9  | -3.4  | 0.7  |        |
| N1/C5'              | 2.1  | 3.1  | 3.1  | 4.1  | 1.9   | 1.9   | +                      |      |       |      |        |
| H5/H3''             | 5.0  | 6.0  | 6.0  | 7.0  | 0.2   | 0.2   | +                      |      |       |      |        |
| H5/H1''             | 4.5  | 5.5  | 5.5  | 6.5  | 0.2   | 0.2   | +                      |      |       |      |        |
| H1'/H4'             | 2.4  | 3.4  | 3.4  | 4.4  | 2.8   | 2.8   | +                      |      |       |      |        |
| H1'/H3''            | 5.0  | 6.0  | 6.0  | 7.0  | 0.2   | 0.2   | +                      |      |       |      |        |
| H2'/H1''            | 4.4  | 5.4  | 5.4  | 6.4  | 0.2   | 0.2   | +                      |      |       |      |        |
| H2'/H3''            | 4.0  | 5.0  | 5.0  | 6.0  | 0.3   | 0.3   | +                      |      |       |      |        |
| H3'/H1''            | 3.9  | 4.9  | 4.9  | 5.9  | 0.2   | 0.2   | +                      |      |       |      |        |
| H3'/H3''            | 3.6  | 4.6  | 4.6  | 5.6  | 0.3   | 0.3   | +                      |      |       |      |        |
| H4'/H1''            | 4.6  | 5.6  | 5.6  | 6.6  | 0.1   | 0.1   | +                      |      |       |      |        |
| $\chi$              | -110 | -60  | -60  | -10  | 0.2   | 0.2   | -                      |      |       |      |        |
| $\gamma$            | 0    | 60   | 60   | 120  | 1.74  | 1.74  | -                      |      |       |      |        |
| $\gamma$            | 120  | 180  | 180  | -120 | 1.2   | 1.2   | -                      |      |       |      |        |
| $\omega$            | 0    | 60   | 60   | 120  | 0.3   | 0.3   | -                      |      |       |      |        |
| $\omega$            | 120  | 180  | 180  | -120 | -0.02 | -0.02 | -                      |      |       |      |        |
| $\beta$             | 120  | 180  | 180  | -120 | -0.32 | -0.32 | -                      |      |       |      |        |
| $\phi_G$            | 100  | 150  | 150  | -160 | 1.1   | 1.1   | -                      |      |       |      |        |
| H2''-C2''-C3''-H3'' | 120  | 180  | 180  | -120 | 1.5   | 1.5   | -                      |      |       |      |        |
| H3''-C3''-C4''-O4'' | 120  | 180  | 180  | -120 | 1.5   | 1.5   | -                      |      |       |      |        |
| O4''-C4''-C5''-H5'' | 120  | 180  | 180  | -120 | 1.5   | 1.5   | -                      |      |       |      |        |



**Tabelle 9-16:** Gemittelte Randbedingungen und Energien der MD-Simulation von UDP-Gal.

| Rand-<br>bedingung  | $\langle r \rangle$ |
|---------------------|---------------------|
| $^3J_{H1'/H2'}$     | 4.5 Hz              |
| $^3J_{H2'/H3'}$     | 5.6 Hz              |
| $^3J_{H3'/H4'}$     | 4.4 Hz              |
| $^3J_{H4'/H5'R}$    | 4.3 Hz              |
| $^3J_{H4'/H5'S}$    | 3.7 Hz              |
| $^3J_{H1''/H2''}$   | 3.0 Hz              |
| $^3J_{H2''/H3''}$   | 10.0 Hz             |
| $^3J_{H5''/H6''R}$  | 7.2 Hz              |
| $^3J_{H5''/H6''S}$  | 5.2 Hz              |
| $^3J_{C2''/P\beta}$ | 7.9 Hz              |
| N1/C5'              | 3.9 Å               |
| H5/H3''             | 5.4 Å               |
| H5/H1''             | 5.5 Å               |
| H1'/H4'             | 3.2 Å               |
| H1'/H3''            | 6.2 Å               |
| H2'/H1''            | 5.6 Å               |
| H2'/H3''            | 5.5 Å               |
| H3'/H1''            | 4.9 Å               |
| H3'/H3''            | 4.9 Å               |
| H4'/H1''            | 5.8 Å               |
| $\chi$              | -154.2°             |
| $\gamma$            | 92.8°               |
| $\omega$            | 117.2°              |
| $\beta$             | 172.5°              |
| $\phi_G$            | 88.9°               |
| H2''-C2''-C3''-H3'' | -174.6°             |
| H3''-C3''-C4''-O4'' | 173.1°              |
| O4''-C4''-C5''-H5'' | -174.4°             |
| <b>Energien</b>     |                     |
| T                   | 300.7 K             |
| $E_{Kin}$           | 135.2 kJ/mol        |
| $E_{Pot}$           | 360.5 kJ/mol        |
| $E_{Tot}$           | 495.7 kJ/mol        |

## 9. Experimenteller Teil

**Tabelle 9-17:** Randbedingungen für die MD-Rechnung von 56dihydroUDP-Gal mit den Zielrandbedingungen  $r1$ - $r4$  in Hz, Grad oder Å, den Kraftkonstanten  $k1$  und  $k2$  in kcal/mol, den Parametern für die allgemeine Karplus-Beziehung nach Gleichung 3-12  $A$ ,  $B$  und  $C$  in Hz und dem Fehler in Hz bei der Umformung der Karplus-Beziehung von *Altona et al.* in die allgemeine Gleichung.

| Rand-<br>bedingung  | $r1$ | $r2$ | $r3$ | $r4$ | $k1$  | $k2$  | zeitliche<br>Mittelung | $A$  | $B$   | $C$  | Fehler |
|---------------------|------|------|------|------|-------|-------|------------------------|------|-------|------|--------|
| $^3J_{H1'/H2'}$     | 1.0  | 7.0  | 7.0  | 10.0 | 0.6   | 0.6   | -                      | 6.2  | -0.91 | 1.13 | 0.3    |
| $^3J_{H2'/H3'}$     | 1.0  | 5.5  | 5.5  | 10.0 | 0.7   | 0.7   | +                      | 8.3  | -0.91 | 0.67 | 0.01   |
| $^3J_{H3'/H4'}$     | 1.0  | 2.7  | 2.7  | 10.0 | 0.8   | 0.8   | +                      | 7.97 | -0.91 | 0.78 | 0.1    |
| $^3J_{H4'/H5'R}$    | 1.0  | 3.2  | 3.2  | 10.0 | 0.4   | 0.4   | +                      | 9.78 | -0.95 | 0.48 | 2.6    |
| $^3J_{H4'/H5'S}$    | 1.0  | 3.1  | 3.1  | 15.0 | 0.6   | 0.6   | +                      | 8.31 | -0.99 | 1.37 | 0.2    |
| $^3J_{H1''/H2''}$   | 1.0  | 3.7  | 3.7  | 15.0 | 0.5   | 0.5   | -                      | 5.95 | -0.91 | 1.01 | 0.5    |
| $^3J_{H2''/H3''}$   | 1.0  | 10.3 | 10.3 | 11.0 | 0.5   | 0.5   | -                      | 9.2  | -0.99 | 0.03 | 1.5    |
| $^3J_{H5''/H6'R}$   | 1.0  | 5.2  | 5.2  | 15.0 | 0.5   | 0.5   | +                      | 8.31 | -0.99 | 1.37 | 2.3    |
| $^3J_{H5''/H6'S}$   | 1.0  | 7.2  | 7.2  | 15.0 | 0.5   | 0.5   | +                      | 8.31 | -0.99 | 1.37 | 0.2    |
| $^3J_{C2''/P\beta}$ | 1.0  | 8.3  | 8.3  | 10.0 | 0.6   | 0.6   | +                      | 6.9  | -3.4  | 0.7  |        |
| N1/C5'              | 2.2  | 3.2  | 3.2  | 4.2  | 2.2   | 2.2   | +                      |      |       |      |        |
| C6/H2'              | 1.1  | 2.1  | 2.1  | 3.1  | 0.9   | 0.9   | +                      |      |       |      |        |
| H6R/H3'             | 1.5  | 2.5  | 2.5  | 3.5  | 1.4   | 1.4   | +                      |      |       |      |        |
| H1'/H4'             | 2.2  | 3.2  | 3.2  | 4.2  | 3.0   | 3.0   | +                      |      |       |      |        |
| H2'/H1''            | 3.8  | 4.8  | 4.8  | 5.8  | 0.2   | 0.2   | +                      |      |       |      |        |
| H2'/H3''            | 2.8  | 3.8  | 3.8  | 4.8  | 0.4   | 0.4   |                        |      |       |      |        |
| H3'/H1''            | 3.6  | 4.6  | 4.6  | 5.6  | 0.2   | 0.2   | +                      |      |       |      |        |
| H3'/H3''            | 2.6  | 3.6  | 3.6  | 4.6  | 0.4   | 0.4   | +                      |      |       |      |        |
| H4'/H1''            | 4.4  | 5.4  | 5.4  | 6.4  | 0.2   | 0.2   | +                      |      |       |      |        |
| H5'R/H1''           | 4.0  | 5.0  | 5.0  | 6.0  | 0.1   | 0.1   | +                      |      |       |      |        |
| H5'S/H1''           | 4.0  | 5.0  | 5.0  | 6.0  | 0.1   | 0.1   | +                      |      |       |      |        |
| H5'R/H3''           | 4.6  | 5.6  | 5.6  | 6.6  | 0.1   | 0.1   | +                      |      |       |      |        |
| H5'S/H3''           | 4.6  | 5.6  | 5.6  | 6.6  | 0.1   | 0.1   | +                      |      |       |      |        |
| $\chi$              | 0    | 45   | 45   | 90   | 0.9   | 0.9   | -                      |      |       |      |        |
| $\gamma$            | 30   | 60   | 60   | 90   | 1.78  | 1.78  | -                      |      |       |      |        |
| $\gamma$            | 120  | 180  | 180  | -120 | 0.68  | 0.68  | -                      |      |       |      |        |
| $\omega$            | 0    | 60   | 60   | 120  | 0.28  | 0.28  | -                      |      |       |      |        |
| $\omega$            | 120  | 180  | 180  | -120 | -0.05 | -0.05 | -                      |      |       |      |        |
| $\beta$             | 120  | 180  | 180  | -120 | 0.16  | -0.03 | -                      |      |       |      |        |
| $\beta$             | -120 | -60  | -60  | 0    | 0.03  | 0.03  | -                      |      |       |      |        |
| $\phi_G$            | 100  | 150  | 150  | -160 | 1.55  | 1.55  | -                      |      |       |      |        |
| H2''-C2''-C3''-H3'' | 120  | 180  | 180  | -120 | 1.5   | 1.5   | -                      |      |       |      |        |
| H3''-C3''-C4''-O4'' | 120  | 180  | 180  | -120 | 1.5   | 1.5   | -                      |      |       |      |        |
| O4''-C4''-C5''-H5'' | 120  | 180  | 180  | -120 | 1.5   | 1.5   | -                      |      |       |      |        |

**Tabelle 9-18:** Gemittelte Randbedingungen und Energien der MD-Simulation von 56dihydro-UDP-Gal.

| Rand-<br>bedingung  | $\langle r \rangle$ |
|---------------------|---------------------|
| $^3J_{H1'/H2'}$     | 6.8 Hz              |
| $^3J_{H2'/H3'}$     | 6.2 Hz              |
| $^3J_{H3'/H4'}$     | 2.8 Hz              |
| $^3J_{H4'/H5'R}$    | 4.3 Hz              |
| $^3J_{H4'/H5'S}$    | 3.9 Hz              |
| $^3J_{H1''/H2''}$   | 3.1 Hz              |
| $^3J_{H2''/H3''}$   | 10.0 Hz             |
| $^3J_{H5''/H6''R}$  | 6.9 Hz              |
| $^3J_{H5''/H6''S}$  | 5.4 Hz              |
| $^3J_{C2''/P\beta}$ | 7.6 Hz              |
| N1/C5'              | 4.0 Å               |
| C6/H2'              | 2.7 Å               |
| H6R/H3'             | 3.6 Å               |
| H1'/H4'             | 3.1 Å               |
| H2'/H1''            | 5.2 Å               |
| H2'/H3''            | 4.2 Å               |
| H3'/H1''            | 5.2 Å               |
| H3'/H3''            | 4.8 Å               |
| H4'/H1''            | 6.2 Å               |
| H5'R/H1''           | 5.2 Å               |
| H5'S/H1''           | 5.5 Å               |
| H5'R/H3''           | 4.9 Å               |
| H5'S/H3''           | 5.0 Å               |
| $\chi$              | -95.2°              |
| $\gamma$            | 107.3°              |
| $\omega$            | 124.2°              |
| $\beta$             | -174.4°             |
| $\phi_G$            | 95.1°               |
| H2''-C2''-C3''-H3'' | -175.5°             |
| H3''-C3''-C4''-O4'' | 173.4°              |
| O4''-C4''-C5''-H5'' | -174.2°             |
| <b>Energien</b>     |                     |
| T                   | 299.9 K             |
| $E_{Kin}$           | 139.8 kJ/mol        |
| $E_{Pot}$           | 398.6 kJ/mol        |
| $E_{Tot}$           | 539.4 kJ/mol        |

**Tabelle 9-19:** Randbedingungen für die MD-Rechnung von 2dUDP-Gal mit den Zielrandbedingungen  $r1$ - $r4$  in Hz, Grad oder Å, den Kraftkonstanten  $k1$  und  $k2$  in kcal/mol, den Parametern für die allgemeine Karplus-Beziehung nach Gleichung 3-12  $A$ ,  $B$  und  $C$  in Hz und dem Fehler in Hz bei der Umformung der Karplus-Beziehung von *Altona et al.* in die allgemeine Gleichung.

| Rand-<br>bedingung  | $r1$ | $r2$ | $r3$ | $r4$ | $k1$ | $k2$ | zeitliche<br>Mittelung | $A$  | $B$   | $C$  | Fehler |
|---------------------|------|------|------|------|------|------|------------------------|------|-------|------|--------|
| $^3J_{H3'/H4'}$     | 1.0  | 3.4  | 3.4  | 10.0 | 0.17 | 0.17 | -                      | 7.97 | -0.91 | 0.78 | 0.1    |
| $^3J_{H4'/H5'R}$    | 1.0  | 3.2  | 3.2  | 10.0 | 0.4  | 0.3  | +                      | 9.78 | -0.95 | 0.48 | 2.6    |
| $^3J_{H4'/H5'S}$    | 1.0  | 3.0  | 3.0  | 15.0 | 0.6  | 0.6  | +                      | 8.31 | -0.99 | 1.37 | 0.2    |
| $^3J_{H5''/H6''R}$  | 1.0  | 7.2  | 7.2  | 15.0 | 0.5  | 0.5  | +                      | 8.31 | -0.99 | 1.37 | 2.3    |
| $^3J_{H5''/H6''S}$  | 1.0  | 5.2  | 5.2  | 15.0 | 0.5  | 0.5  | +                      | 8.31 | -0.99 | 1.37 | 0.2    |
| $^3J_{C2''/P\beta}$ | 1.0  | 8.3  | 8.3  | 10.0 | 0.6  | 0.6  | +                      | 6.9  | -3.4  | 0.7  |        |
| N1/C5'              | 2.9  | 3.9  | 3.9  | 4.9  | 2.0  | 2.0  | +                      |      |       |      |        |
| H5/H1''             | 3.3  | 4.3  | 4.3  | 5.3  | 0.2  | 0.2  | +                      |      |       |      |        |
| H5/H3''             | 4.0  | 5.0  | 5.0  | 6.0  | 0.2  | 0.2  | +                      |      |       |      |        |
| H1'/H4'             | 2.3  | 3.3  | 3.3  | 4.3  | 3.0  | 3.0  | +                      |      |       |      |        |
| H1'/H1''            | 2.4  | 3.4  | 3.4  | 4.4  | 0.4  | 0.4  | +                      |      |       |      |        |
| H2'S/H1''           | 3.0  | 4.0  | 4.0  | 5.0  | 0.2  | 0.2  | +                      |      |       |      |        |
| H2'R/H1''           | 3.0  | 4.0  | 4.0  | 5.0  | 0.2  | 0.2  | +                      |      |       |      |        |
| H3'/H1''            | 2.5  | 3.5  | 3.5  | 4.5  | 0.15 | 0.15 | +                      |      |       |      |        |
| H3'/H2''            | 2.6  | 3.6  | 3.6  | 4.6  | 0.2  | 0.2  | +                      |      |       |      |        |
| H3'/H3''            | 2.6  | 3.6  | 3.6  | 4.6  | 0.3  | 0.3  | +                      |      |       |      |        |
| H3''/H5''           | 1.2  | 2.2  | 2.2  | 3.2  | 1.5  | 1.5  | -                      |      |       |      |        |
| $\chi$              | 10   | 60   | 60   | 110  | 0.2  | 0.2  | -                      |      |       |      |        |
| $\chi$              | -110 | -60  | -60  | -10  | 0.2  | 0.2  | -                      |      |       |      |        |
| $\gamma$            | 30   | 60   | 60   | 90   | 1.83 | 1.83 | -                      |      |       |      |        |
| $\gamma$            | 120  | 180  | 180  | -120 | 0.63 | 0.63 | -                      |      |       |      |        |
| $\beta$             | 120  | 180  | 180  | -120 | -0.1 | -0.1 | -                      |      |       |      |        |
| $\omega$            | 0    | 60   | 60   | 180  | 0.27 | 0.27 | -                      |      |       |      |        |
| $\omega$            | 120  | 180  | 180  | -120 | 0.0  | 0.0  | -                      |      |       |      |        |
| $\phi$              | 100  | 150  | 150  | -160 | 1.5  | 1.5  | -                      |      |       |      |        |
| H2''-C2''-C3''-H3'' | 120  | 180  | 180  | -120 | 1.5  | 1.5  | -                      |      |       |      |        |
| H3''-C3''-C4''-O4'' | 120  | 180  | 180  | -120 | 1.5  | 1.5  | -                      |      |       |      |        |
| O4''-C4''-C5''-H5'' | 120  | 180  | 180  | -120 | 1.5  | 1.5  | -                      |      |       |      |        |

**Tabelle 9-20:** Gemittelte Randbedingungen und Energien der MD-Simulation von 2dUDP-Gal.

| Rand-<br>bedingung  | $\langle r \rangle$ |
|---------------------|---------------------|
| $^3J_{H3'/H4'}$     | 3.2 Hz              |
| $^3J_{H4'/H5'R}$    | 5.0 Hz              |
| $^3J_{H4'/H5'S}$    | 3.4 Hz              |
| $^3J_{H5''/H6''R}$  | 7.1 Hz              |
| $^3J_{H5''/H6''S}$  | 5.3 Hz              |
| $^3J_{C2''/P\beta}$ | 8.5 Hz              |
| N1/C5'              | 4.1 Å               |
| H5/H1''             | 4.0 Å               |
| H5/H3''             | 5.8 Å               |
| H1'/H4'             | 3.0 Å               |
| H1'/H1''            | 4.9 Å               |
| H2'S/H1''           | 3.2 Å               |
| H2'R/H1''           | 4.8 Å               |
| H3'/H1''            | 3.7 Å               |
| H3'/H2''            | 4.4 Å               |
| H3'/H3''            | 5.6 Å               |
| H3''/H5''           | 2.5 Å               |
| $\chi$              | 223.2°              |
| $\gamma$            | 95.7°               |
| $\beta$             | 176.2°              |
| $\omega$            | 118.3°              |
| $\phi$              | 89.6°               |
| H2''-C2''-C3''-H3'' | 183.2°              |
| H3''-C3''-C4''-O4'' | 173.8°              |
| O4''-C4''-C5''-H5'' | 185.7°              |
| <b>Energien</b>     |                     |
| T                   | 299.6 K             |
| $E_{Kin}$           | 131.3 kJ/mol        |
| $E_{Pot}$           | 335.3 kJ/mol        |
| $E_{Tot}$           | 466.6 kJ/mol        |

**Tabelle 9-21:** Randbedingungen für die MD-Rechnung von 3dUDP-Gal mit den Zielrandbedingungen  $r1$ - $r4$  in Hz, Grad oder Å, den Kraftkonstanten  $k1$  und  $k2$  in kcal/mol, den Parametern für die allgemeine Karplus-Beziehung nach Gleichung 3-12  $A$ ,  $B$  und  $C$  in Hz und dem Fehler in Hz bei der Umformung der Karplus-Beziehung von *Altona et al.* in die allgemeine Gleichung.

| Rand-<br>bedingung  | $r1$ | $r2$ | $r3$ | $r4$ | $k1$  | $k2$  | zeitliche<br>Mittelung | $A$  | $B$   | $C$  | Fehler |
|---------------------|------|------|------|------|-------|-------|------------------------|------|-------|------|--------|
| $^3J_{H1'/H2'}$     | 0.0  | 2.0  | 2.0  | 10.0 | 0.3   | 0.3   | -                      | 6.2  | -0.91 | 1.13 | 0.3    |
| $^3J_{H2'/H3'R}$    | 1.0  | 5.8  | 5.8  | 10.0 | 0.8   | 0.8   | +                      | 9.35 | -0.99 | 1.18 | 0.5    |
| $^3J_{H2'/H3'S}$    | 1.0  | 2.7  | 2.7  | 10.0 | 2.5   | 2.5   | +                      | 9.35 | -0.99 | 1.18 | 1.2    |
| $^3J_{H3'R/H4'}$    | 1.0  | 9.6  | 9.6  | 12.0 | 0.5   | 0.5   | +                      | 9.35 | -0.99 | 1.18 | 1.2    |
| $^3J_{H3'S/H4'}$    | 1.0  | 5.9  | 5.9  | 12.0 | 0.4   | 0.4   | +                      | 9.35 | -0.99 | 1.18 | 0.1    |
| $^3J_{H4'/H5'R}$    | 1.0  | 3.6  | 3.6  | 10.0 | 0.3   | 0.3   | +                      | 9.78 | -0.95 | 0.48 | 2.6    |
| $^3J_{H4'/H5'S}$    | 1.0  | 2.4  | 2.4  | 10.0 | 0.2   | 0.2   | +                      | 8.31 | -0.99 | 1.37 | 0.2    |
| $^3J_{H5''/H6''R}$  | 1.0  | 5.2  | 5.2  | 15.0 | 0.5   | 0.5   | +                      | 8.31 | -0.99 | 1.37 | 2.3    |
| $^3J_{H5''/H6''S}$  | 1.0  | 7.2  | 7.2  | 15.0 | 0.5   | 0.5   | +                      | 8.31 | -0.99 | 1.37 | 0.2    |
| $^3J_{C2''/P\beta}$ | 1.0  | 8.3  | 8.3  | 10.0 | 0.6   | 0.6   | +                      | 6.9  | -3.4  | 0.7  |        |
| N1/C5'              | 2.6  | 3.6  | 3.6  | 4.6  | 2.0   | 2.0   | +                      |      |       |      |        |
| H5/H3''             | 3.2  | 4.2  | 4.2  | 5.2  | 0.2   | 0.2   | +                      |      |       |      |        |
| H5/H6''R            | 3.1  | 4.1  | 4.1  | 5.1  | 0.2   | 0.2   | +                      |      |       |      |        |
| H5/H6''S            | 3.1  | 4.1  | 4.1  | .51  | 0.2   | 0.2   | +                      |      |       |      |        |
| H6/H3'R             | 1.4  | 2.4  | 2.4  | 3.4  | 0.4   | 0.4   | +                      |      |       |      |        |
| H6/H5'R             | 1.8  | 2.8  | 2.8  | 3.8  | 0.2   | 0.2   | +                      |      |       |      |        |
| H6/H5'S             | 0.0  | 2.2  | 2.2  | 10.0 | 0.6   | 0.6   | +                      |      |       |      |        |
| H6/H1''             | 1.0  | 7.5  | 7.5  | 15.0 | 0.2   | 0.2   | +                      |      |       |      |        |
| H1'/H4'             | 1.8  | 2.8  | 2.8  | 3.8  | 2.8   | 2.8   | +                      |      |       |      |        |
| H1'/H4''            | 0.0  | 3.5  | 3.5  | 10.0 | 0.2   | 0.2   | +                      |      |       |      |        |
| H2'/H6''R           | 2.5  | 3.5  | 3.5  | 4.5  | 0.1   | 0.1   | +                      |      |       |      |        |
| H2'/H2''            | 2.3  | 3.3  | 3.3  | 4.3  | 0.2   | 0.2   | +                      |      |       |      |        |
| H4'/H1''            | 0.0  | 2.3  | 2.3  | 10.0 | 0.3   | 0.3   | +                      |      |       |      |        |
| H5'S/H1''           | 3.4  | 4.4  | 4.4  | 5.4  | 0.2   | 0.2   | +                      |      |       |      |        |
| H3''/H5''           | 1.1  | 2.1  | 2.1  | 3.1  | 0.5   | 0.5   | -                      |      |       |      |        |
| $\chi$              | 0    | 45   | 45   | 90   | 1.8   | 1.8   | -                      |      |       |      |        |
| $\chi$              | -110 | -60  | -60  | -10  | 0.5   | 0.5   | -                      |      |       |      |        |
| $\gamma$            | 30   | 60   | 60   | 90   | 3.3   | 3.3   | -                      |      |       |      |        |
| $\gamma$            | 120  | 180  | 180  | -120 | 0.8   | 0.8   | -                      |      |       |      |        |
| $\omega$            | 0    | 60   | 60   | 120  | 0.3   | 0.3   | -                      |      |       |      |        |
| $\omega$            | 120  | 180  | 180  | -120 | -0.04 | -0.04 | -                      |      |       |      |        |
| $\beta$             | 120  | 180  | 180  | -120 | 0.5   | 0.5   | -                      |      |       |      |        |
| $\phi_G$            | 80   | 140  | 140  | -160 | 1.7   | 1.7   | -                      |      |       |      |        |
| H2''-C2''-C3''-H3'' | 120  | 180  | 180  | -120 | 1.5   | 1.5   | -                      |      |       |      |        |
| H3''-C3''-C4''-O4'' | 120  | 180  | 180  | -120 | 1.5   | 1.5   | -                      |      |       |      |        |
| O4''-C4''-C5''-H5'' | 120  | 180  | 180  | -120 | 1.5   | 1.5   | -                      |      |       |      |        |

**Tabelle 9-22:** Gemittelte Randbedingungen und Energien der MD-Simulation von 3dUDP-Gal.

| Rand-<br>bedingung  | $\langle r \rangle$ |
|---------------------|---------------------|
| $^3J_{H1'/H2'}$     | 2.4 Hz              |
| $^3J_{H2'/H3'R}$    | 7.1 Hz              |
| $^3J_{H2'/H3'S}$    | 2.4 Hz              |
| $^3J_{H3'R/H4'}$    | 8.6 Hz              |
| $^3J_{H3'S/H4'}$    | 6.5 Hz              |
| $^3J_{H4'/H5'R}$    | 4.1 Hz              |
| $^3J_{H4'/H5'S}$    | 3.8 Hz              |
| $^3J_{H5''/H6''R}$  | 7.4 Hz              |
| $^3J_{H5''/H6''S}$  | 4.8 Hz              |
| $^3J_{C2''/P\beta}$ | 7.4 Hz              |
| N1/C5'              | 4.0 Å               |
| H5/H3''             | 5.9 Å               |
| H5/H6''R            | 4.5 Å               |
| H5/H6''S            | 4.7 Å               |
| H6/H3'R             | 2.8 Å               |
| H6/H5'R             | 4.0 Å               |
| H6/H5'S             | 3.4 Å               |
| H6/H1''             | 5.4 Å               |
| H1'/H4'             | 3.1 Å               |
| H1'/H4''            | 5.4 Å               |
| H2'/H6''R           | 5.1 Å               |
| H2'/H2''            | 6.1 Å               |
| H4'/H1''            | 5.1 Å               |
| H5'S/H1''           | 4.7 Å               |
| H3''/H5''           | 2.5 Å               |
| $\chi$              | -152.4°             |
| $\gamma$            | 103.1°              |
| $\omega$            | 119.2°              |
| $\beta$             | 183.3°              |
| $\phi_G$            | 97.1°               |
| H2''-C2''-C3''-H3'' | 183.6°              |
| H3''-C3''-C4''-O4'' | 173.5°              |
| O4''-C4''-C5''-H5'' | 185.4°              |
| <b>Energien</b>     |                     |
| T                   | 299.8 K             |
| $E_{Kin}$           | 132.2 kJ/mol        |
| $E_{Pot}$           | 424.1 kJ/mol        |
| $E_{Tot}$           | 556.3 kJ/mol        |

QM/MM-MD-Simulationen von DMDP wurden mit Hilfe des ROAR Moduls<sup>183,185,186</sup> des AMBER5.0-Programmpakets<sup>183</sup> auf einer SGI Workstation O2 (R 10000) durchgeführt. Die quantenmechanische Region wurde semiempirisch mit der PM3-Methode<sup>59</sup> berechnet, die molekülmechanische mit AMBER91<sup>65</sup>. Es wurden 10 Simulationen mit einer Dauer von 200 ps durchgeführt, wobei die resultierenden Konformationen als Startpunkte für die nächste Simulation dienten. Die Startkonformation war das energetische Minimum der ab initio Rechnung. Die Dielektrizitätskonstante war distanzabhängig und betrug  $8.0 \text{ C}^2/\text{Jm}$ , der Abbruchradius für nichtbindende Wechselwirkungen  $12.0 \text{ \AA}$ . Die nichtbindenden Wechselwirkungen wurden alle 10 fs neu berechnet, die van-der-Waals-Wechselwirkungen wurden durch 2.0 dividiert und die elektrostatischen durch 1.2. Die Integrationsweite betrug 1 fs. Während der MD-Simulation wurde die Temperatur von Beginn an konstant bei 300 K gehalten. Dabei wurden zwei Thermostatketten verwendet, jeweils eine für die quantenmechanische und für die molekülmechanische Region. Jede Kette bestand jeweils aus drei Thermostaten. Die Massen  $Q_i$  wurden automatisch gesetzt.

Die MD-Simulationen wurden mit dem CARNAL-Modul des AMBER-Programmpakets ausgewertet und so Atomabstände und Torsionswinkel erhalten. Mit Hilfe des Programms C-P (vgl. Kapitel 10.3) wurden aus den MD-Simulationen Cremer-Pople-Parameter berechnet. Das konformative Verhalten der Torsionswinkel und Cremer-Pople-Parameter wurde mit dem Programm pv-wave Version 7.00 visualisiert.

Torsionswinkel wurden mit dem hier entwickelten Computerprogramm KARPLUS (vgl. Kapitel 10.1) in Kopplungskonstanten umgerechnet. Zur Berechnung der NOE-Aufbaukurven entsprechend dem Relaxationsmatrixverfahren wurden sämtliche Protonenabstände aus der MD-Rechnung über die Zeit gewichtet und gemittelt.

$$\langle r_{ij} \rangle = \left( \frac{\sum r_{ij}^{-6}}{n} \right)^{-1/6} \quad \text{Gleichung 9-2}$$

Aus dieser Abstandsmatrix wurden mit Hilfe des Programms GEGOP<sup>187</sup> Kreuzrelaxationsraten bei verschiedenen Mischzeiten erhalten. Die Korrelationszeit für die exocyclische Gruppe wurde auf  $\tau_c = 1.0 \cdot 10^{-13} \text{ s}$  festgesetzt. Die Korrelationszeit des restlichen Moleküls wurde anhand fester Protonenabstände (z.B. H5/H6 oder H1"/H2") auf  $\tau_c = 1.9 \cdot 10^{-11} \text{ s}$



(3dU),  $\tau_C = 1.7 \cdot 10^{-11}$  s (ddU),  $\tau_C = 3.4 \cdot 10^{-11}$  s (2fU) oder  $\tau_C = 4.5 \cdot 10^{-11}$  s (Zuckernucleotide) gesetzt. Die Kreuzrelaxationsraten wurden mit dem Programm Lotus 1-2-3 visualisiert und so NOE-Aufbaukurven erhalten. Die Differenzen aller gemessenen und aus der MD-Simulation berechneten NOEs wurden über die längsten vier Mischzeiten arithmetisch gemittelt und die prozentualen Abweichungen angegeben. Hieraus wurden Differenzen der betreffenden Protonenabstände nach der Zweispinnäherung (Gleichung 9-1) berechnet, wobei ein gemittelter Protonenabstand aus der MD-Rechnung als Referenz diente. Bei Signalüberlagerung wurde der kürzeste Abstand verwendet. Aufgrund der Zweispinnäherung und Problemen bei Signalüberlagerungen sind die Abweichungen im Protonenabstand nicht als exakte Werte zu verstehen sondern lediglich als Abschätzung des Fehlers, der bei der MD-Simulation auftritt.

## 10. Anhang

### 10.1. KARPLUS.cpp

Die Eigenrotationen von Atomkernen können über Elektronen skalar miteinander gekoppelt sein. Die vicinalen Kopplungen sind neben der elektronischen Umgebung auch von der betrachteten Kernsorte und von den Torsionswinkeln abhängig. Zur Überprüfung einer Geometrie eines Moleküls kann ein Satz von C,H-, F,H-, H,H-, P,C- und P,H-Torsionswinkeln mit Hilfe dieses Programms in vicinale Kopplungskonstanten umgerechnet werden, um sie anschließend mit experimentellen Daten zu vergleichen.

```
//
// Program      : karplus.cpp
// Description   : Calculation of coupling constants
// Author       : Andreas Willecke
// Date        : 25.08.1999
//
// Analysis
// =====
// The program transforms torsion angles into vicinal coupling constants. The
// values of the torsion angles are in space separated format.
// It is possible to calculate following coupling constants:
// CH, FH, HH, PC and PH.
// Alternatively, an ad lib. coupling constant can be calculates by specifying
// the parameter A, B, C of the common Karplus type equation. A detailed descrip-
// tion is given in the source code or by typing
// >karplus hh
// at the command line for example.
// An example input file for the calculation of a H,H coupling constants according
// to the Altona, Haasnoot equation is given. The file hhtor.spa contains 100000
// torsion angles:

// hh
// hhtor.spa
// jhh.out
// 100000
// 1
// Uridine:H1/H2
// 4
// 1 -1 1 -1
// 0.7 1.22 1.3 0.32
// 3.85

// Classes
// =====
// Prepare
// CH
//   for calculating of the C-C-C-H system
//   according to Ippel
// FH
//   for calculating of the F-C-C-H system
//   according to Thibaudeau
// HH
//   for calculating of the H-C-C-H system
//   according to Altona, Durette
// PC
//   for calculating of the P-C-C-C system
//   according to Erkelens
```

```

// PH
//   for calculating of the P-C-C-H system
//   according to Lankhorst, Sarma
// MY
//   for calculating an ad lib. system
// Xfile
//   exception class for file handling
//
// Implementation
// =====
// For to calculate the coupling constants from torsion angle the six classes
// CH, FH, HH, PH, PC, MY are implemented. They inherit all methods from
// the basic class Prepare. The methods calcJ, readInfileCont, writeHeader
// and writeResult are virtual, overwritten and bound at runtime. The virtual
// methods getfcc, gethcc, readAngle and closeAngle are implemented only in the
// class FH.
// The attribute systemFlag is read in from the inputfile and specifies the spin
// system. It is converted into an integer value by the method convertFlag(char *)
// and is stored in the attribute flag. The attribute flag adopts the values:
// 1 : ch coupling, class: CH
// 2 : fh coupling, class: FH
// 3 : hh coupling, class: HH
// 4 : ph coupling, class: PH
// 5 : cp coupling, class: PC
// 6 : my coupling, class: MY

#include <iostream.h>
#include <iomanip.h>
#include <fstream.h>
#include <stdlib.h>
#include <string.h>
#include <stdio.h>
#include <math.h>

const int TRUE  = 1;
const int FALSE = 0;

// *****
//                               Declarations                               *
// *****

// ***** Prepare *****

class Prepare
{
public:

// Constructor/Destructor
Prepare();
Prepare(char *);
~Prepare(void);

// Methods
virtual void    calcJ();           // calculate the coupling constant
                                   // for the specified system
virtual void    closeAngle();
    int         convertFlag(char *); // convert the systemFlag into an int
    int         getFlag();
    int         getNumberOfCouplings();
    int         getRows();
    void        initializeSum(); // set the values of the array sum to zero
virtual void    readAngle();
virtual double  getfcc();
virtual double  gethcc();

```

## 10. Anhang

---

```
        int      readInfile();
    virtual void readInfileCont();
        double   readTorsion(int);
        void      resetTorsionFile();// set the file pointer to the beginning
        void      summation();          // summation of the coupling constants
    virtual void  writeHeader();          // write the header of the outfile
    virtual void  writeResult();

protected:

// Attributes
    ifstream     inFile,      // contains the kind of spinsystem, the torsion filename
                                // the name of the outfile, the number of rows and tor-
                                // sions of the torsionfile and finally the parameter
                                // of the karplus type equations
    ofstream     torsionFile;  // file with the torsion angles
    char         *outFileName, // where the results are written to
    *inFileName,
    *torsionFileName,
    *systemFlag;              // the first line of infile e.g. ch,fh etc.
    int          rows,        // 4th line of infile, number of rows in torsionfile
    flag,          // the converted systemflag: ch=1, fh=2, etc.
    numberOfCouplings;        // 5th line of infile, number of torsion angles

    double       torsion,      // in torsionfile
                                // value of the torsionfile
    torsionInRad, // the torsion in in rad
    *sum,         // the sum of coupling constants
    *coupling;    // coupling constant for the system
};

// ***** CH *****

class CH: public Prepare
{
public:

// Constructor
    CH();
    CH(char *);

// Methods
    void calcJ();
    void readInfileCont();
    void writeHeader();
    void writeResult();

private:

// Attributes
    char * torsionName; // name for each dihedral angle
    int p;              // 1 for H1'-C2/4, and 2 for H1'-C6/8
};

// ***** FH *****

class FH: public Prepare
{
public:

// Constructor
    FH();
    FH(char *);

// Methods
```

```

void calcJ();
void closeAngle();
void readAngle();
void readInfileCont();
void writeHeader();
void writeResult();
double getfcc();
double gethcc();

private:
// Attributes
char * torsionName,
      * angleFFFileName,
      * angleHFileName;
ifstream angleFFFile,
          angleHFile;

int * zeta, // according to Thibaudeau equation. it defines
          // the orientation of the substituent
      numberOfSubst; // number of substituents
double * chi, // the difference in electronegativity
          electro, // the summed chi values
          hcc, // bond angle H-C-C
          fcc, // bond angle F-C-C
          * p; // internal parameter
};

// ***** HH *****

class HH: public Prepare
{
public:
// Constructor
HH();
HH(char *);

// Methods
void calcJ();
void readInfileCont();
void writeHeader();
void writeResult();

private:
// Attributes
char * torsionName; // name of each dehedral angle
int * zeta, // according to Altona equation it defines
            // the orientation of the substituent
      numberOfSubst;
double * p, // internal parameter
          * chi, // the difference in electronegativity
          electro, // the summed chi values
          X; // diffences in electronegativity according to
              // Durette, Horton
};

// ***** PC *****

class PC: public Prepare
{
public:
// Constructor
PC();
PC(char *);

```

## 10. Anhang

---

```
// Methods
void calcJ();
void readInfileCont();
void writeHeader();
void writeResult();

private:

// Attributes
char * torsionName;
};

// ***** PH *****

class PH: public Prepare
{
public:

// Constructor
PH();
PH(char *);

// Methods
void calcJ();
void readInfileCont();
void writeHeader();
void writeResult();

private:

// Attributes
char * torsionName;
};

// ***** MY *****

class MY: public Prepare
{
public:

// Constructor
MY();
MY(char *);

// Methods
void calcJ();
void readInfileCont();
void writeHeader();
void writeResult();

private:

// Attributes
char * torsionName;
double A,
       B,
       C;
};

int testArg(int);
int main(int, char * []);
```

```

// *****
//                                     Definitions                                     *
// *****

// ***** Xfile *****

class Xfile
{
public:

// Constructor
Xfile(char * name)
{
    cerr << "Error in opening " << name << "." << endl;
}
};

// ***** Prepare *****

// ---- Constructor -----
Prepare::Prepare()
{}

// ---- Constructor -----
Prepare::Prepare(char * fileName)
{
    outFileName      = new char[30];
    systemFlag       = new char[4];
    inFileName       = new char[30];
    torsionFileName  = new char[30];
    coupling         = new double[3];
    sum              = new double[3];

    inFileName = fileName;
    rows = -1;
    numberOfCouplings = -1;
}

// ---- Destructor -----
Prepare::~~Prepare()
{
    if(inFile)
        inFile.close();
    if(torsionFile)
        torsionFile.close();
    if(outFile)
        outFile.close();
}

// ---- calcJ() -----
void Prepare::calcJ()
{}

// ---- closeAngle() -----
void Prepare::closeAngle()
{}

// ---- convertFlag() -----
int Prepare::convertFlag(char * flag)
{
    if(flag[1] == 'h' && flag[2] == '\0')
    {

```

## 10. Anhang

---

```
        switch( flag[0] )
        {
            case 'c' : return 1;
            case 'f' : return 2;
            case 'h' : return 3;
            case 'p' : return 4;
        }
    }
    if(flag[0] == 'c' && flag[1] == 'p' && flag[2] == '\0')
        return 5;
    if(flag[0] == 'm' && flag[1] == 'y' && flag[2] == '\0')
        return 6;
    return(FALSE);
}

// ---- getFlag() -----
int Prepare::getFlag()
{
    return this->convertFlag(systemFlag);
}

// ---- getNumberOfCouplings() -----
int Prepare::getNumberOfCouplings()
{
    return numberOfCouplings;
}

// ---- getRows() -----
int Prepare::getRows()
{
    return rows;
}

// ---- initializeSum() -----
void Prepare::initializeSum()
{
    for(int i=0; i<10; i++)
        sum[i] = 0.0;
}

// ---- readAngle() -----
void Prepare::readAngle()
{}

// ---- getfcc() -----
double Prepare::getfcc()
{ return -1;}

// ---- gethcc() -----
double Prepare::gethcc()
{ return -1;}

// ---- readInfile() -----
int Prepare::readInfile()
{
    inFile.open(inFileName, ios::nocreate);
    if(! inFile)
    {
        throw Xfile(inFileName);
        return(FALSE);
    }
}
```



```

inFile >> systemFlag >> torsionFileName;
inFile >> outFileName >> rows >> numberOfCouplings;

torsionFile.open(torsionFileName, ios::nocreate);
if(! torsionFile)
{
    throw Xfile(torsionFileName);
    return(FALSE);
}
outFile.open(outFileName, ios::out);
return(TRUE);
}

// ---- readInfileCont() -----
void Prepare::readInfileCont()
{}

// ---- readTorsion() -----
double Prepare::readTorsion(int counter)
{
    int i=0;
    double dummy;

    for(; i<counter; i++)
        torsionFile >> dummy;
    torsionFile >> torsion;
    i ++;
    for(; i<numberOfCouplings; i++)
        torsionFile >> dummy;
    torsionInRad = (torsion/180) * 3.14159265359;
    return torsion;
}

// ---- resetTorsionFile() -----
void Prepare::resetTorsionFile()
{
    torsionFile.seekg(ios::beg);
}

// ---- summation() -----
void Prepare::summation()
{
    sum[0] += coupling[0];
    sum[1] += coupling[1];
    sum[2] += coupling[2];
}

// ---- writeHeader() -----
void Prepare::writeHeader()
{}

// ---- writeResult() -----
void Prepare::writeResult()
{}

// ***** CH *****

// ---- Default constructor -----
CH::CH()
{

```

## 10. Anhang

---

```
cout <<endl<<endl
    << "Calculation of vicinal C,H coupling constants in nucleotides."
    <<endl<<endl
    << "The coupling 3J H1'C6/8 or H1'C2/4 is calculated." << endl
    << "Two karplus type equations are used which were published in "
    << endl
    <<" J. H. Ippel, S. S. Wijmenga, R. de Jong, H. A. Heus, C. W. Hilbers"
    << endl
    << " E. de Vroom, G. A. van Marel and J. H. van Boom," << endl
    << " Magn. Reson. Chem., 34 (1996) S156-S176." << endl
    << " D. B. Davies, P. Rajani, M. MacCoss, S. S. Danyluk, " << endl
    << " Magn. Reson. Chem., 23 (1985) 72-77. " << endl
    << "Format of infile : " << endl
    << " 1. line : <ch> specifies the spin system (char[4])"<<endl
    << " 2. line : file with torsion angles (char [30])" << endl
    << " 3. line : file where the results are written to (char[30])"
    <<endl
    << " 4. line : number of columns in the torsionfile (int)" <<endl
    << " 5. line : number of coupling constants (int)" <<endl
    << " 6. line : name of torsionsangle (char[30])" << endl
    << " 7. line : 1 for 3J H1'C6/8 " << endl
    << "                2 for 3J H1'C2/4 " << endl
    << " 8. line : = 6. line" << endl
    << " etc... : until all parameters for all couplings are read in"
    << endl;
}

// ---- Constructor -----
CH::CH(char * fileName):Prepare(fileName)
{
    torsionName = new char[30];

    readInfile();
    initializeSum();
}

// ---- calcJ() -----
void CH::calcJ()
{
    if(p == 1)
    {
        coupling[0]= 4.5*(cos(torsionInRad-1.0472)*cos(torsionInRad-1.0472))
                    -0.6*cos(torsionInRad-1.0472)+0.1;
        coupling[1]= 6.2*pow(cos(torsionInRad),2)-2.4*cos(torsionInRad)+0.1;
    }
    if(p == 2)
    {
        coupling[0]= 4.7*(cos(torsionInRad-1.0472)*cos(torsionInRad-1.0472))
                    +2.3*cos(torsionInRad-1.0472 )+0.1;
        coupling[1]= 5.0*pow(cos(torsionInRad),2)-2.1*cos(torsionInRad)+0.1;
    }
}

// ---- readInfileCont() -----
void CH::readInfileCont()
{
    inFile >> torsionName;
    inFile >> p;
}

// ---- writeHeader() -----
void CH::writeHeader()
{
    outFile << "Calculation of vicinal C,H coupling constants according to" << endl
```

```

        << " J. H. Ippel, S. S. Wijmenga, R. de Jong, H. A. Heus, C. W. Hilbers"
        << endl
        << " E. de Vroom, G. A. van Marel and J. H. van Boom," << endl
        << " Magn. Reson. Chem., 34 (1996) S156-S176 and" << endl
        << " D. B. Davies, P. Rajani, M. MacCoss, S. S. Danyluk, " << endl
        << " Magn. Reson. Chem., 23 (1985) 72-77. " << endl << endl;
    }

// ---- writeResult() -----
void CH::writeResult()
{
    double result1 = sum[0]/rows;
    double result2 = sum[1]/rows;
    outFile << torsionName << " : Ippel et al. : " << result1 << endl
        << setw(strlen(torsionName)+18) << "Davies et al.: " << result2
        << endl;
}

// ***** FH *****

// ---- Default constructor -----
FH::FH()
{
    cout << endl << endl << "Calculation of F,H coupling constants"
        << endl
        << "according to" << endl
        << "C. Thibaudau, J. Pavlec, J. Chattopadhyaya, J. Org. Chem"
        << " 63 (1998) 4967-4984." << endl
        << " 1. line : <fh> specifies the spin system (char[4])" << endl
        << " 2. line : file with the torsion angles (char[30])" << endl
        << " 3. line : file where the results are written to (char[30])"
        << endl
        << " 4. line : number of rows in the torsionfile (int)" << endl
        << " 5. line : number of coupling constants (int)" << endl
        << " 6. line : name of torsion angle (char[30])" << endl
        << " 7. line : n n for default values for bond angle FCH and CCH "
        << endl
        << "          d number d number for own values for bond"
        << " angle FCH and CCH " << endl
        << "          f filename f filename with bond angles averaged from "
        << endl
        << "          all concerning bond angles. (see literature)" << endl
        << " 7. line : number of substituents (short)" << endl
        << " 8. line : values of zeta describes the orientation "
        << "of substituents (int)" << endl
        << " 9. line : values of chi describe the electronegativity "
        << "of substituents" << endl
        << " 10. line : = 6. line" << endl
        << " etc... : until all parameters for all couplings are read in"
        << endl;
}

// ---- Constructor -----
FH::FH(char * fileName):Prepare(fileName)
{
    torsionName      = new char[30];
    zeta              = new int[4];
    p                 = new double[7];
    chi               = new double[4];
    angleFFFileName   = new char[30];
    angleHFileName    = new char[30];

    numberOfSubst     = -1;
    electro            = -1.0;
}

```

## 10. Anhang

---

```
p[0] = 40.61;
p[1] = -4.22;
p[2] = 5.88;
p[3] = -1.27;
p[4] = -6.20;
p[5] = 0.20;
p[6] = -3.72;

readInfile();
initializeSum();
}

// ---- calcJ() -----
void FH::calcJ()
{
    electro = 0.0;
    for(int i=0; i<numberOfSubst; i++ )
        electro = electro+chi[i]*(p[3]+p[4]*pow(cos(zeta[i]*torsionInRad+
            p[5]*chi[i]),2)+p[6]*(((fcc+hcc)/2)-110)*pow(cos(torsionInRad),2));
    coupling[0] = p[0]*pow(cos(torsionInRad),2)+p[1]*cos(torsionInRad)+p[2]
        +electro;
}

// ---- closeAngle() -----
void FH::closeAngle()
{
    if(angleFFile)
        angleFFile.close();
    if(angleHFile)
        angleHFile.close();
}

// ---- readAngle() -----
void FH::readAngle()
{
    if(angleFFile)
        angleFFile >> fcc;

    if(angleHFile)
        angleHFile >> hcc;
}

// ---- readInfileCont() -----
void FH::readInfileCont()
{
    char controller;
    char * dummy = new char[30];
    angleFFileName ="default";
    angleHFileName ="default";

    inFile >> torsionName >> controller;
    switch(controller)
    {
        case 'n' : fcc = 110.8;  // bond angle F-C-C from MM3
            break;
        case 'd' : inFile >> fcc;
            break;
        case 'f' : inFile >> angleFFileName;
            angleFFile.open(angleFFileName, ios::nocreate);
            if(! angleFFile)
                fcc = 110.8;
            break;
    }

    inFile >> controller;
```

```

switch(controller)
{
case 'n' : hcc = 109.5;  // bond angle H-C-C from AMBER
          break;
case 'd' : inFile >> hcc;
          break;
case 'f' : inFile >> angleHFileName;
          angleHFile.open(angleHFileName, ios::nocreate);
          if(! angleHFile)
             hcc = 109.5;
          break;
}
inFile >> numberOfSubst;
for(int i=0; i<numberOfSubst; i++)
    inFile >> zeta[i];
for(i=0; i<numberOfSubst; i++)
    inFile >> chi[i];
}

// ---- writeHeader() -----
void FH::writeHeader()
{
    outFile << "Calculation of F,H vicinal coupling constants according to" << endl
              << "C. Thibaudeau, J. Pavlec, J. Chattopadhyaya, J. Org. Chem"
              << " 63 (1998) 4967-4984."
              << endl << endl;
}

// ---- getfcc() -----
double FH::getfcc()
{
    return fcc;
}

// ---- gethcc() -----
double FH::gethcc()
{
    return hcc;
}

// ---- writeResult() -----
void FH::writeResult()
{
    double result = sum[0]/rows;
    outFile << torsionName
              << setw(12) << result << endl;
}

// ***** HH *****

// ---- Default constructor -----
HH::HH()
{
    cout << endl<<endl<< "Calculation of H,H coupling constants" <<endl<<endl
          << "according to the equations from" <<endl
          << "C. A. G. Haasnoot, F. A. A. M. de Leeuw und C. Altona, Tetrahedron"
          << " 36 (1980) 2783-2792." << endl
          << "Having a reference value another equation was used." <<endl
          << "P. L. Durette, D. Horton, Org. Magn. Res. 3 (1971) 417-427."
          << endl << endl
          << "Format of infile : " << endl
          << " 1. line : <hh> specifies the spin system (char[4])" << endl
          << " 2. line : file with the torsion angles (char[30])" << endl
          << " 3. line : file where the results are written to (char[30])" <<endl
          << " 4. line : number of rows in torsionfile (int)" << endl
          << " 5. line : number of coupling constants which "

```

## 10. Anhang

---

```
<< "shall be calculated (int)" <<endl
<< " 6. line : name of torsion angle (char[30])" << endl
<< " 7. line : number of substituents (short)" << endl
<< " 8. line : values of zeta describes the orientation"
<< " of substituents (int)" <<endl
<< " 9. line : values of chi(group) describe the electronegativity"
<< " of substituents" << endl
<< "          note that chi(group) = chi(alfa)-P7*sum(chi(beta))"
<< " (double)" <<endl
<< " 10. line : electronegativies according to Horton-Durette-Equation"
<< " (double)" <<endl
<< " 11. line : = 6. line" << endl
<< " etc... : until all parameters for all couplings are read in"
<< endl;
}

// ---- Constructor -----
HH::HH(char * fileName):Prepare(fileName)
{
    p          = new double[7];
    torsionName = new char[30];
    electro     = 0.0;
    zeta        = new int[4];
    numberOfSubst = 0;
    chi         = new double[4];
    electro     = 0.0;
    X           = 0.0;

    readInfile();
    initializeSum();
}

// ---- calcJ() -----
void HH::calcJ()
{
    switch(numberOfSubst)
    {
    case 0: break;
    case 1: p[1]=13.7;
           p[2]=-0.73;
           p[3]=0;
           p[4]=0.56;
           p[5]=-2.47;
           p[6]=0.295;
           break;
    case 2: p[1]=13.89;
           p[2]=-0.98;
           p[3]=0;
           p[4]=1.02;
           p[5]=-3.40;
           p[6]=0.260;
           break;
    case 3: p[1]=13.22;
           p[2]=-0.99;
           p[3]=0;
           p[4]=0.87;
           p[5]=-2.46;
           p[6]=0.347;
           break;
    case 4: p[1]=13.24;
           p[2]=-0.91;
           p[3]=0;
           p[4]=0.53;
           p[5]=-2.41;
           p[6]=0.271;
```

```

        break;
    }

    electro = 0.0;
    for(int i=0; i<numberOfSubst; i++ )
        electro = electro+chi[i]*(p[4]+p[5]*(cos(zeta[i]*torsionInRad \
            +p[6]*fabs(chi[i]))*cos(zeta[i]*torsionInRad+p[6]*fabs(chi[i]))));
    coupling[0] = p[1]*(cos(torsionInRad)*cos(torsionInRad))+p[2]*
        (cos(torsionInRad))+p[3]+electro;

    coupling[1] = (7.8-1.0*(cos(torsionInRad))+5.6*(cos(2*torsionInRad)))
        *(1-0.1*X);
}

// ---- readInfileCont() -----
void HH::readInfileCont()
{
    inFile >> torsionName >> numberOfSubst;
    for(int i=0; i<numberOfSubst; i++)
        inFile >> zeta[i];
    for(i=0; i<numberOfSubst; i++)
        inFile >> chi[i];
    inFile >> X;
}

// ---- writeHeader() -----
void HH::writeHeader()
{
    outFile << "Calculation of vicinal H,H coupling constants according to" << endl
        << "1. C. A. G. Haasnoot, F. A. A. M. de Leeuw und C. Altona, "
        << "Tetrahedron 36 (1980) 2783-2792." << endl
        << "2. P. L. Durette, D. Horton, Org. Magn. Res. 3 (1971) 417-427."
        << endl << endl;
}

// ---- writeResult() -----
void HH::writeResult()
{
    double result1 = sum[0]/rows;
    double result2 = sum[1]/rows;
    outFile << torsionName << " : Haasnoot: " << result1 << endl
        << setw(strlen(torsionName)+14) << "Durette : " << result2 << endl;
}

// ***** PC *****

// ---- Default constructor -----
PC::PC()
{
    cout <<endl<<endl<< "Calculation of P,C coupling constants." << endl << endl
        << "The carbon-phosphorous coupling constants" <<endl
        << "are calculated according to the equations from" <<endl
        << "P. P. Lankhorst, C. A. G. Haasnoot, C. Erkelens, C. Altona," <<endl
        << "J. Biomol. Struct. Dynam. 1 (1984) 1387-1405." << endl<< endl
        << "Format of infile : " <<endl
        << " 1. line : <PC> specifies the spin system (char[4])" <<endl
        << " 2. line : file with torsion angles (char [30])" << endl
        << " 3. line : file where the results are written to (char[30])" <<endl
        << " 4. line : number of columns in torsionfile (int)" <<endl
        << " 5. line : number of coupling constants which shall be "
        << "calculated (int)"<<endl
        << " 6. line : name of torsionsangle (char[30])" << endl
        << " 7. line : = 6. line" << endl
        << " etc... : until all parameters for all coupling "
        << " are read in"<< endl;
}

```

## 10. Anhang

---

```
}

// ---- Constructor -----
PC::PC(char * fileName):Prepare(fileName)
{
    torsionName = new char[30];

    readInfile();
    initializeSum();
}

// ---- calcJ() -----
void PC::calcJ()
{
    coupling[0] = 6.9*(cos(torsionInRad)*cos(torsionInRad))
                -3.4*cos(torsionInRad)+0.7;
}

// ---- readInfileCont() -----
void PC::readInfileCont()
{
    inFile >> torsionName;
}

// ---- writeHeader() -----
void PC::writeHeader()
{
    outFile << "Calculation of vicinal C,P coupling constants according to" << endl
              << "P. P. Lankhorst, C. A. G. Haasnoot, C. Erkelens, C. Altona,"
              << " J. Biomol. Struct. Dynam. 1 (1984) 1387-1405."
              << endl << endl;
}

// ---- writeResult() -----
void PC::writeResult()
{
    double result = sum[0]/rows;
    outFile << torsionName << " : " << result << endl;
}

// ***** PH *****

// ---- Default constructor -----
PH::PH()
{
    cout <<endl<<endl<< "Calculation of P,H coupling constants" <<endl<<endl
          << "according to the equations from" <<endl
          << "P. P. Lankhorst, C. A. G. Haasnoot, C. Erkelens, C. Altona," <<endl
          << "J. Biomol. Struct. Dynam. 1 (1984) 1387-1405 and" << endl
          << "C-H. Lee, R. H. Sarma, Biochemistry 15 (1976) 697-704." <<endl<<endl
          << "Format of infile : " <<endl
          << " 1. line : <ph> specifies the spin system (char[4])" <<endl
          << " 2. line : file with torsion angles (char [30])" << endl
          << " 3. line : file where the results are written to (char[30])" <<endl
          << " 4. line : number of columns in torsionfile (int)" <<endl
          << " 5. line : number of coupling constants which shall be "
          << "calculated (int)"<<endl
          << " 6. line : name of torsionsangle (char[30])" << endl
          << " 7. line : = 6. line" << endl
          << " etc... : until all parameters for all couplings are read in"
```



```

        << endl;
    }

// ---- Constructor -----
PH::PH(char * fileName):Prepare(fileName)
{
    torsionName = new char[30];

    readInfile();
    initializeSum();
}

// ---- calcJ() -----
void PH::calcJ()
{
    coupling[0] = 15.3*(cos(torsionInRad)*cos(torsionInRad))
                -6.1*cos(torsionInRad)+1.6;
    coupling[1] = 18.1*(cos(torsionInRad)*cos(torsionInRad))
                -4.8*cos(torsionInRad)+1.6;
}

// ---- readInfileCont() -----
void PH::readInfileCont()
{
    inFile >> torsionName;
}

// ---- writeHeader() -----
void PH::writeHeader()
{
    outFile << "Calculation of vicinal P,H coupling constants according to" << endl
              << "1. P. P. Lankhorst, C. A. G. Haasnoot, C. Erkelens, C. Altona,"
              << " J. Biomol. Struct. Dynam. 1 (1984) 1387-1405." << endl
              << "2. C-H. Lee, R. H. Sarma, Biochemistry 15 (1976) 697-704."
              << endl << endl;
}

// ---- writeResult() -----
void PH::writeResult()
{
    double result1 = sum[0]/rows;
    double result2 = sum[1]/rows;
    outFile << torsionName << " : Lankhorst: " << result1 << endl
              << setw(strlen(torsionName)+15) << "Lee      : " << result2 << endl;
}

// ***** MY *****

// ---- Default constructor -----
MY::MY()
{
    cout << endl << endl << "Calculation of an ad lib. coupling constant"
          << endl << endl
          << "with the equation:  $J = A * \cos^2(\phi) + B * \cos(\phi) + C$ " << endl
          << "The parameter A, B, C had to be specified in the infile"
          << endl << endl
          << "Format of infile : " << endl
          << " 1. line : <my> for an ad lib. Karplus type equation (char[4])"
          << endl
          << " 2. line : file with torsion angles (char[30])" << endl
          << " 3. line : file where the results are written to (char[30])" << endl;
}

```

## 10. Anhang

---

```
<< " 4. line : number of columns in torsionfile (int)" <<endl
<< " 5. line : number of coupling constants which shall be"
<< " calculated (int)"<<endl
<< " 6. line : name of torsionsangle (char[30])" << endl
<< " 7. line : values of A, B, C (double)" << endl
<< " 8. line : = 6. line" << endl
<< " etc... : until all parameters for all couplings are read in"
<< endl;
}

// ---- Constructor -----
MY::MY(char * fileName):Prepare(fileName)
{
    torsionName = new char[30];
    A           = 0;
    B           = 0;
    C           = 0;

    readInfile();
    initializeSum();
}

// ---- calcJ() -----
void MY::calcJ()
{
    coupling[0] = A*(cos(torsionInRad)*cos(torsionInRad))
                +B*cos(torsionInRad)+C;
}

// ---- readInfileCont() -----
void MY::readInfileCont()
{
    inFile >> torsionName;
    inFile >> A >> B >> C;
}

// ---- writeHeader() -----
void MY::writeHeader()
{
    outFile << "Calculation of vicinal coupling constants" << endl
            << "according to own parameters."
            << endl << endl;
}

// ---- writeResult() -----
void MY::writeResult()
{
    double result = sum[0]/rows;
    outFile << torsionName << endl
            << " A=" << A << ", B=" << B << ", C=" << C << endl
            << " coupling constant: " << result << endl;
}

// **** testArg() ****
int testArg(int numberOfArg)
{
    if(numberOfArg != 2)
    {
        cout <<endl<<endl<< "Program karplus" << endl
            << "===== " << endl << endl
            << "Calculating of coupling constants from torsion angles."
            << endl
            << "Written by Andreas Willecke" << endl << endl
    }
}
```

```

        << "Usage : karplus infile" << endl
        << " or : karplus <hh, ph, ch, cp, fh or my> for help" << endl;
    return(FALSE);
}
else
    return(TRUE);
}

// ***** MAIN *****

int main(int arg, char * argv[])
{
    Prepare * prep = new Prepare(argv[1]);
    Prepare * j;
    int flag = 0;

    if(!testArg(arg))
        return(EXIT_FAILURE);

    // test if argument of command line is a file or the help directive
    if(!prep->convertFlag(argv[1]) )
    {
        try
        {
            prep->readInfile();
        }
        catch(Xfile)
        {
            return(EXIT_FAILURE);
        }
    }

    // test if argument of command line is the help directive
    if(flag = prep->convertFlag(argv[1]))
    {
        switch(flag)
        {
            case 1 : new CH();
                     break;
            case 2 : new FH();
                     break;
            case 3 : new HH();
                     break;
            case 4 : new PH();
                     break;
            case 5 : new PC();
                     break;
            case 6 : new MY();
                     break;
        }
        return(EXIT_FAILURE);
    }

    flag = prep->getFlag();
    switch(flag)
    {
        case 1 : j = new CH(argv[1]);
                 break;
        case 2 : j = new FH(argv[1]);
                 break;
        case 3 : j = new HH(argv[1]);
                 break;
        case 4 : j = new PH(argv[1]);
                 break;
        case 5 : j = new PC(argv[1]);
                 break;
    }
}

```

## 10. Anhang

---

```
case 6 : j = new MY(argv[1]);
        break;
}

j->writeHeader();
for(int k=0; k<j->getNumberOfCouplings(); k++)
{
    j->initializeSum();
    j->readInfileCont();
    for(int l=0; l<j->getRows(); l++)
    {
        j->readTorsion(k);
        j->readAngle();
        j->calcJ();
        j->summation();
    }
    j->writeResult();
    j->resetTorsionFile();
    j->closeAngle();
}

delete j;
delete prep;
return(EXIT_SUCCESS);
}
```

### 10.2. CLUSTER.cpp

Clusteranalysen haben das Ziel, Objekte zu gruppieren. Objekte mit relativ ähnlichen Eigenschaften werden dabei derselben Kategorie zugeordnet. Bei der Clusteranalyse werden alle Objekte in Partitionen eingeteilt. Unter einer Partition versteht man einen Satz von Untergruppen, in die jedes Objekt zugeordnet wird. Jedes Objekt gehört dabei nur in eine Untergruppe der Partition. Die Klassifikation der Objekte kann dabei in eine einzige Partition oder in verschiedene geschachtelte Partitionen erfolgen.

Dieses Programm dient der Gruppierung von Konformationen eines Moleküls, die aus einer MD-Simulation erhalten wurden. Der Konformationsraum des Moleküls kann bis zu neun Freiheitsgrade (Partitionen) umfassen, die jeweils in vier Populationsmaxima (Untergruppen) aufgeteilt werden können. In einem einfachen sequenziellen Algorithmus werden alle Objekte den Partitionen zugeordnet, die zuvor in einer Datei definiert wurden. Die Häufigkeit der Untergruppen, die diskrete Konformationen repräsentieren, wird ermittelt und daraus die freien Enthalpien errechnet.

```
//
// Program      : cluster.cpp
// Description   : Analysis of MD trajectory
// Author       : Andreas Willecke
// Date        : 09.03.1999
//
// Analysis
```

```

// =====
// The analysis of MD simulations focusses on the trajectory of one or two degrees
// of freedom at a time to get information of the distribution of their popula-
// tions or to identify their correlations. However, this method is not suited to
// give a picture of the whole molecule.
// To improve this handicap a cluster analysis of the MD simulation can be carried
// out by this program. Nine degrees of freedom are divided into four preferred
// orientations dividing the conformational space of the molecule into distinct
// conformations. The frequency of occurrence of these conformations is stored and
// summed over the MD time. Finally the difference in the free enthalpy is calcu-
// lated according to the equation  $dG = -RT \ln K$ . The averaged potential energy is
// also calculated, but is not reasonable in the case of time-averaged restraint
// MD simulations.
//
// Implementation
// =====
// The class Cluster was implemented containing all evident methods. The ensemble
// of conformations of the MD simulation is stored in an  $4^9$  array representing
// four different states of nine degrees of freedom. Each conformation of the tra-
// jectory is tested and assigned to this array. A second array sums the poten-
// tional energy of each conformation. A third array stores the timestep of ex-
// amples of each conformation. After reading in the whole trajectory the most
// populated conformation is searched and its population, averaged energy and
// example conformations are written to the outfile. Subsequently, the next popu-
// lated conformation is searched and written to the outfile. This is continued
// until all or the specified number of conformations were searched. Finally the
// difference in the free enthalpy is calculated with the above-quoted equation.

#include <math.h>
#include <stdio.h>
#include <stdlib.h>
#include <string.h>
#include <iostream.h>
#include <fstream.h>

const int TRUE  = 1;
const int FALSE = 0;

//=====
//      declarations
//=====

class Cluster
{
public:

// Constructor and destructor
Cluster(int number, char * inFile);
~Cluster();

// Methods
int  getMaxConfToCalc();
int  readTorsion();
void incrementPopulation();
int  findHighestPopulation();
int  getPointer();
void incrementEnergy();
void storeTimeExample();
void writeHeader(char *);
void writePopulation(int);
void destroyPopulation();
void writeTail(int, int);

private:

```

## 10. Anhang

---

```
// Attributes
int    rows;                // number of rows in the torsionFile
int    cols;                // number of degrees of freedom (max. 9)
int    maxConfToCalc;       // max. number of conformations. It is set auto-
                           // matically or is specified in the infile

long   numberOfAllConformations; // the max. possible number of conformations
float  (* currentTorsion);     // current degrees of freedom
float  currentEnergy;         // current energy
float  currentTime;          // current time
int    (* numberOfMaxima);    // number of maxima of the concerning degree of
                           // freedom,

float  (* allTorsion)[4];     // the value of the maxima
float  (* allRange)[4];      // and their ranges
int    (* p);                // pointer to the conformation
int    (* storedPops);       // up to ten examples of the conformation
char   (* torsionName)[30];  // name of the degree of freedom
int    (* popTorsion)[4][4][4][4][4][4][4][4][4][4]; // population of the conf.
float  (* energy)[4][4][4][4][4][4][4][4][4][4];    // energy of the conf.
float  (* time)[4][4][4][4][4][4][4][4][4][4][10];  // time example of the conf.
ifstream torsionFile;        // file containing up to nine degrees of freedom
ofstream resultFile;         // file where the results are written to

// Methods
int  doesFileExist(char *);
int  rightNumberOfArguments(int);

void initArray(int(* array));
void initArray(float(* array));
void initArray(float(* array) [4]);
void initArray(int(* array) [4][4][4][4][4][4][4][4][4][4]);
void initArray(float(* array) [4][4][4][4][4][4][4][4][4][4]);
void initArray(float(* array) [4][4][4][4][4][4][4][4][4][4][10]);
};

int main(int counter, char * value []);

//=====
//      Definitions
//=====

// ----- constructor -----
Cluster::Cluster(int number, char * file)
{
    char   * string = new char [100];
            torsionName = new char [10][30];
    ifstream inFile;

    numberOfAllConformations = 0;
    cols = 0;
    rows = 0;

    // allocate fields
    numberOfMaxima = new int [10];
    currentTorsion = new float[10];
    p              = new int [10];
    storedPops     = new int [10];
    allTorsion     = new float[10][4];
    allRange       = new float[10][4];
    popTorsion     = new int  [4][4][4][4][4][4][4][4][4][4];
    energy         = new float[4][4][4][4][4][4][4][4][4][4];
    time          = new float[4][4][4][4][4][4][4][4][4][4][10];

    // initialization of all arrays
    initArray(numberOfMaxima);
    initArray(currentTorsion);
    initArray(p);
}
```

```

initArray(storedPops);
initArray(allTorsion);
initArray(allRange);
initArray(popTorsion);
initArray(energy);
initArray(time);

// right number of arguments
if(!(rightNumberOfArguments(number)))
    exit(EXIT_FAILURE);

// the values of the attributes are read in from the inFile
if(doesFileExist(file))
    inFile.open(file, ios::nocreate);
else
    exit(EXIT_FAILURE);

inFile >> string >> cols >> rows >> maxConfToCalc;
if(doesFileExist(string))
    torsionFile.open(string, ios::nocreate);
else
    exit(EXIT_FAILURE);

inFile >> string;
resultFile.open(string);
for(int i=0; i<cols; i++) {
    inFile >> torsionName[i];
    inFile >> numberOfMaxima[i];
    for(int j=0; j<numberOfMaxima[i]; j++) {
        inFile >> allTorsion[i][j] >> allRange[i][j];
    }
}

// find the maximal number of possible conformations,
if(maxConfToCalc == 0) {
    maxConfToCalc = 1;
    for(int i=0; i<cols; i++)
        maxConfToCalc *= numberOfMaxima[i];
}
inFile.close();
}

// ---- Destructor -----
Cluster::~Cluster()
{
    torsionFile.close();
    resultFile.close();

    delete    numberOfMaxima;
    delete    currentTorsion;
    delete    p;
    delete    allTorsion;
    delete    allRange;
    delete    popTorsion;
    delete    energy;
    delete    time;
}

// ---- Method : writeTail -----
void Cluster::writeTail(int number, int counter)
{
    int n = 1;
    double deltaG = 0;
    for(int i=0 ; i<cols; i++)
        n *= numberOfMaxima[i];

```

## 10. Anhang

---

```
resultFile << endl << numberOfAllConformations << " of " << rows
    << " geometries are in the specified ranges" << endl
    << number << " geometries are in the first " << counter
    << " conformations." << endl
    << n << " conformations are possible." << endl << endl
    << "Calculations of the free enthalpy (dG) of max. ten"
    << " conformations:" << endl;

for(i=0; i<maxConfToCalc && i<10 && i<n; i++)
    for ( int j = i + 1; j < maxConfToCalc && j < 10 && j < n; j ++ ) {
        deltaG = -8.314412*300*log(double(storedPops[j])
            /double(storedPops[i]))/1000.0;
        resultFile << "dG(300K) of " << j+1 << ".-" << i+1 << ". conf"
            << " is " << deltaG << " kJ/mol or " << deltaG/4.1868
            << " kcal/mol" << endl;
    }
}

// ---- Method : getMaxConfToCalc -----
int Cluster::getMaxConfToCalc()
{
    return(maxConfToCalc);
}

// ---- Method : destroyPopulation -----
void Cluster::destroyPopulation()
{
    popTorsion[p[0]][p[1]][p[2]][p[3]][p[4]][p[5]][p[6]][p[7]][p[8]][p[9]] = 0;
    energy[p[0]][p[1]][p[2]][p[3]][p[4]][p[5]][p[6]][p[7]][p[8]][p[9]] = 0;
    for( int i = 0; i < 10; i ++ )
        time[p[0]][p[1]][p[2]][p[3]][p[4]][p[5]][p[6]][p[7]][p[8]][p[9]][i] = 0;
}

// ---- Method : writePopulation -----
void Cluster::writePopulation( int counter)
{
    resultFile << (counter + 1) << ". highest populated conformation : " <<endl;
    resultFile << " is described with torsion angles : " << endl;
    for(int i=0; i<cols; i++)
        resultFile << " " << torsionName[i] << " : " <<allTorsion[i][p[i]]<<endl;
    resultFile<<" The population amount to "<<popTorsion[p[0]][p[1]][p[2]][p[3]]
        [p[4]][p[5]][p[6]][p[7]][p[8]][p[9]] << "." << endl
        << " This corresponds to " << ( popTorsion[p[0]][p[1]][p[2]][p[3]]
        [p[4]][p[5]][p[6]][p[7]][p[8]][p[9]]*100/numberOfAllConformations)
        << "%." << endl
        << " The averaged energy of this conformational ensemble is "
        << (energy[p[0]][p[1]][p[2]][p[3]][p[4]][p[5]][p[6]][p[7]]
        [p[8]][p[9]]/popTorsion[p[0]][p[1]][p[2]][p[3]][p[4]][p[5]]
        [p[6]][p[7]][p[8]][p[9]]) <<" kcal/mol (or kJ/mol)." << endl
        << " Examples for this conformational ensemble can be found at"
        << "timestep: " << endl;

    for(i=0; i<10; i++)
        if(time[p[0]][p[1]][p[2]][p[3]][p[4]][p[5]][p[6]][p[7]][p[8]][p[9]][i] >0)
            resultFile << " " << time[p[0]][p[1]][p[2]][p[3]][p[4]][p[5]]
                [p[6]][p[7]][p[8]][p[9]][i] << endl;
    storedPops[counter] = popTorsion[p[0]][p[1]][p[2]][p[3]][p[4]][p[5]]
        [p[6]][p[7]][p[8]][p[9]];
}

// ---- Method : findHighestPopulation -----
int Cluster::findHighestPopulation()
```



```

{
    int max = 0;
    int (* z) = new int [10];

    initArray(p);
    initArray(z);
    for(z[0]=0; z[0]<4; z[0]++) {
        for(z[1]=0; z[1]<4; z[1]++) {
            for(z[2]=0; z[2]<4; z[2]++) {
                for(z[3]=0; z[3]<4; z[3]++) {
                    for(z[4]=0; z[4]<4; z[4]++) {
                        for(z[5]=0; z[5]<4; z[5]++) {
                            for(z[6]=0; z[6]<4; z[6]++) {
                                for(z[7]=0; z[7]<4; z[7]++) {
                                    for(z[8]=0; z[8]<4; z[8]++) {
                                        for(z[9]=0; z[9]<4; z[9]++)
                                            if( popTorsion[z[0]][z[1]][z[2]][z[3]][z[4]] // higher populated?
                                                [z[5]][z[6]][z[7]][z[8]][z[9]] > max) {
                                                max = popTorsion[z[0]][z[1]][z[2]][z[3]][z[4]]
                                                    [z[5]][z[6]][z[7]][z[8]][z[9]]; //new highest conformation
                                                for(int i=0; i<10; i++) // store the pointer of
                                                    p[i] = z[i]; // this conformation
                                            }
                                        }
                                    }
                                }
                            }
                        }
                    }
                }
            }
        }
    }
    return(max);
}

// ---- Method : writeHeader -----
void Cluster::writeHeader(char * inFile)
{
    resultFile << "Input file          : " << inFile << endl
                << "Number of torsionangles : " << cols << endl
                << "Number of rows          : " << rows << endl;
    if(maxConfToCalc == 0)
        resultFile << "All";
    else
        resultFile << "The first " << maxConfToCalc;
    resultFile << " conformations should be calculated" << endl;

    for(int i=0; i< cols;i++) {
        resultFile << endl << (i + 1) << ". Torsionangle (" << torsionName[i]
                << "):" << endl << " " << numberOfMaxima[i]
                << " Maxima(um)" << endl;
        for(int j = 0; j < numberOfMaxima[i]; j++)
            resultFile << " " << (j + 1) << ". Max. at "
                << allTorsion[i][j] << " degree +- "
                << allRange[i][j] << " degree " << endl;
    }
}

// ---- Method : getPointer -----
int Cluster::getPointer()
{
    int all = 0;
    initArray(p);

    // in which conformation does the degree of freedom lie ?
    for(int i = 0; i<cols; i++)
        for(int j=0; j<numberOfMaxima[i]; j++)
            if((( currentTorsion[i] >= (allTorsion[i][j] - allRange[i][j]))
                &&(currentTorsion[i] <= (allTorsion[i][j] + allRange[i][j]))))||
                (((currentTorsion[i]+360.0) >= (allTorsion[i][j] - allRange[i][j]))
                &&((currentTorsion[i]+360.0) <= (allTorsion[i][j] + allRange[i][j]))))||
                (((currentTorsion[i]-360.0) >= (allTorsion[i][j] - allRange[i][j]))
                &&((currentTorsion[i]-360.0) <= (allTorsion[i][j] + allRange[i][j])))) {

```

## 10. Anhang

---

```
        p[i]=j;
        all ++;
    }
    if(all == cols)
        return(TRUE);
    else {
        initArray(p);
        return(FALSE);
    }
}

// ---- Method : incrementPopulation -----
void Cluster::incrementPopulation()
{
    if(getPointer()) {
        popTorsion[p[0]][p[1]][p[2]][p[3]][p[4]][p[5]][p[6]][p[7]][p[8]][p[9]] ++;
        numberOfAllConformations ++;
    }
}

// ---- Method : incrementEnergy -----
void Cluster::incrementEnergy()
{
    if(getPointer())
        energy[p[0]][p[1]][p[2]][p[3]][p[4]][p[5]][p[6]][p[7]][p[8]][p[9]] +=
            currentEnergy;
}

// ---- Method : storeTimeExample -----
void Cluster::storeTimeExample()
{
    int counter = 0;
    for(int i=0; i<10; i++)
        if(time[p[0]][p[1]][p[2]][p[3]][p[4]][p[5]][p[6]][p[7]][p[8]][p[9]][i])
            counter ++;

    if(getPointer()) {
        if(counter == 0)
            time[p[0]][p[1]][p[2]][p[3]][p[4]][p[5]][p[6]][p[7]][p[8]][p[9]][0]
                = currentTime;
        else
            if(currentTime-time[p[0]][p[1]][p[2]][p[3]][p[4]][p[5]]
                [p[6]][p[7]][p[8]][p[9]][counter-1]>(rows/50))
                time[p[0]][p[1]][p[2]][p[3]][p[4]][p[5]][p[6]][p[7]][p[8]][p[9]][counter]
                    = currentTime;
    }
}

// ---- Method : readTorsion -----
int Cluster::readTorsion()
{
    torsionFile >> currentTime >> currentEnergy;
    for(int i=0; i<cols; i++)
        torsionFile >> currentTorsion[i];
    if(torsionFile)
        return(TRUE);
    else
        return(FALSE);
}

// ---- Method : doesFileExist -----
int Cluster::doesFileExist(char * name)
```

```

{
    ifstream dummy(name);
    if(!dummy) {
        cout << "Error in opening file " << name << endl;
        dummy.close();
        return(FALSE);
    }
    else {
        dummy.close();
        return(TRUE);
    }
}

// ---- Method : rightNumberOfArguments -----
int Cluster::rightNumberOfArguments(int number)
{
    if(number == 2)
        return(TRUE);
    else
    {
        cout << "\nP R O G R A M Cluster" << endl
            << "======" << endl
            << "written by Andreas Willecke (27.03.1999)" << endl
            << "calculates the population of whole conformations " << endl
            << "\n\nUsage : " << endl
            << "cluster <inputfilename> " << endl
            << "\n\nINPUTFILE : " << endl
            << "1. line : name of file containing the degrees of freedom;" << endl
            << "                the first column must contain the time step" << endl
            << "                the second column the potential energy" << endl
            << "2. line : # of torsion angles (is equal with # of columns -2"
            << " , max. 9)" << endl
            << "3. line : # of rows of the torsionfile" << endl
            << "4. line : # of conformations from which the populations" << endl
            << "                should be calculated (0=all)" << endl
            << "5. line : name of outputfile" << endl
            << "6. line : name of torsion " << endl
            << "                # of population maxima of the first torsion," << endl
            << "                degree and range of first maximum" << endl
            << "                degree and range of second maximum ... up to fourth"
            << endl
            << "7. line : # of population maxima of the second torsion angle"
            << endl
            << "                degree and range of first maximum" << endl
            << "                up to degree and range of fourth maximum" << endl
            << "8. line : etc." << endl
            << "OUTPUTFILE : " << endl
            << "The first conformation is the highest populated one, " << endl
            << "the second conformation the second highest etc." << endl
            << "The population and any examples are given, too.\n" << endl;

        return(FALSE);
    }
}

// ---- Method : initArray -----
void Cluster::initArray(int (* array))
{
    for(int i= 0; i<10; i++)
        array[i] = 0;
}

// ---- Method : initArray -----

```

## 10. Anhang

---

```
void Cluster::initArray(float (* array))
{
    for(int i=0; i<10; i++)
        array[i] = 0;
}

// ---- Method : initArray -----
void Cluster::initArray(float (* array) [4])
{
    for(int i=0; i<10; i++)
        for(int j=0; j<4; j++)
            array[i][j] = 0;
}

// ---- Method : initArray -----
void Cluster::initArray(int (* array) [4][4][4][4][4][4][4][4][4][4])
{
    int (* z) = new int [10];

    for(z[0]=0; z[0]<4; z[0]++) {
        for(z[1]=0; z[1]<4; z[1]++) {
            for(z[2]=0; z[2]<4; z[2]++) {
                for(z[3]=0; z[3]<4; z[3]++) {
                    for(z[4]=0; z[4]<4; z[4]++) {
                        for(z[5]=0; z[5]<4; z[5]++) {
                            for(z[6]=0; z[6]<4; z[6]++) {
                                for(z[7]=0; z[7]<4; z[7]++) {
                                    for(z[8]=0; z[8]<4; z[8]++) {
                                        for(z[9]=0; z[9]<4; z[9]++)
                                            array[z[0]][z[1]][z[2]][z[3]][z[4]]
                                                [z[5]][z[6]][z[7]][z[8]][z[9]] = 0;
                                    }}}}}}}}}
                                }
                            }
                        }
                    }
                }
            }
        }
    }

// ---- Method : initArray -----
void Cluster::initArray(float (* array) [4][4][4][4][4][4][4][4][4][4])
{
    int (* z) = new int [10];

    for(z[0]=0; z[0]<4; z[0]++) {
        for(z[1]=0; z[1]<4; z[1]++) {
            for(z[2]=0; z[2]<4; z[2]++) {
                for(z[3]=0; z[3]<4; z[3]++) {
                    for(z[4]=0; z[4]<4; z[4]++) {
                        for(z[5]=0; z[5]<4; z[5]++) {
                            for(z[6]=0; z[6]<4; z[6]++) {
                                for(z[7]=0; z[7]<4; z[7]++) {
                                    for(z[8]=0; z[8]<4; z[8]++) {
                                        for(z[9]=0; z[9]<4; z[9]++)
                                            array[z[0]][z[1]][z[2]][z[3]][z[4]]
                                                [z[5]][z[6]][z[7]][z[8]][z[9]] = 0;
                                        }}}}}}}}}
                                    }
                                }
                            }
                        }
                    }
                }
            }
        }
    }

// ---- Method : initArray -----
void Cluster::initArray( float (* array) [4][4][4][4][4][4][4][4][4][10] )
{
    int (* z) = new int [10];

    for(z[0]=0; z[0]<4; z[0]++) {
        for(z[1]=0; z[1]<4; z[1]++) {
            for(z[2]=0; z[2]<4; z[2]++) {
                for(z[3]=0; z[3]<4; z[3]++) {
                    for(z[4]=0; z[4]<4; z[4]++) {
```

```

        for(z[5]=0; z[5]<4; z[5]++) {
            for(z[6]=0; z[6]<4; z[6]++) {
                for(z[7]=0; z[7]<4; z[7]++) {
                    for(z[8]=0; z[8]<4; z[8]++) {
                        for(z[9]=0; z[9]<4; z[9]++) {
                            for(int i=0; i<10; i++)
                                array[z[0]][z[1]][z[2]][z[3]][z[4]]
                                    [z[5]][z[6]][z[7]][z[8]][z[9]][i] = 0;
                        }
                    }
                }
            }
        }
    }

//=====
//      MAIN
//=====

int main(int argCounter, char * argValue [])
{
    int counter = 0;
    int sumOfPopulation = 0;
    Cluster cluster(argCounter, argValue[1]);

    while(cluster.readTorsion()) {
        cluster.getPointer();
        cluster.incrementPopulation();
        cluster.incrementEnergy();
        cluster.storeTimeExample();
    }

    cluster.writeHeader(argValue[1]);

    while(cluster.findHighestPopulation() && counter<cluster.getMaxConfToCalc())
    {
        sumOfPopulation += cluster.findHighestPopulation();
        cluster.writePopulation(counter);
        cluster.destroyPopulation();
        counter ++;
    }
    cluster.writeTail(sumOfPopulation, counter);
    return (EXIT_SUCCESS);
}

```

### 10.3. C-P.c

Torsionswinkel eines Rings ändern sich stets abhängig voneinander. Das führt zu einer Reduzierung um drei Freiheitsgrade. In einem Konzept von Cremer und Pople werden aus Atomkoordinaten Parameter berechnet, mit deren Hilfe die Geometrie eines Rings einfach beschrieben werden kann (vgl. Kapitel 3.4). Dieses Programm setzt dieses Konzept für Ringe mit einer Größe von maximal 10 Atomen um. Hierbei können beliebig viele Konformationen eines Moleküls mit maximal 10000 Atomen berechnet werden. Die Cremer-Pople-Parameter werden in einer Datei gespeichert.

```

/*=====*/
/* PROGRAM : c-p.c */
/* */
/* WRITTEN BY */
/* ANDREAS WILLECKE */
/* Oct. 1997 */
/* Calculation of Cremer Pople parameter of a cyclic system */
/*=====*/

```

## 10. Anhang

---

```
#include <math.h>
#include <stdio.h>
#include <stdlib.h>
#include <string.h>

/*=====*/
/*      Globalvariables                                */
/*=====*/

const double pi=3.1415927;

int   ringatoms,
      mmax;

float q[9],
      phi[9],
      theta,
      Q,
      ringcoor[10][4];

/*=====*/
/*      declarations                                */
/*=====*/

int main(int argc, char *argv[]);
int CremPop(void);

/*=====*/
/*      main()                                      */
/*=====*/

int main(int argc, char *argv[])
{
    FILE *in_ptr;
    FILE *out_ptr;
    FILE *crd_ptr;

    int   totalatoms,
          steps,
          i=0,
          j=0,
          m=0,
          oddeven=0;

    int   ID[20];

    float atomcoor[10000][4];

    char  name[20][50],
          crdFile[30],
          inFile[30],
          outFile[30];

    /*=====*/
    /*  wrong # of parameters                                */
    /*=====*/

    if(argc!=2)
    {
        printf("\nP R O G R A M c-p\n");
        printf("=====\n");
        printf("written by Andreas Willecke\n\n");
        printf("calculates Cremer-Pople parameters from crd files \n");
    }
}
```

```

printf("and writes the results to a .cpout file. \n");
printf("\n\nUsage : \n");
printf("c-p inputfilename (must end on .cpin) \n");
printf("\n\nFILE cpin : \n");
printf("1. line : # of atoms in the ring (3-10)\n");
printf("2. line : total # of atoms in the molecule (max. 10000)\n");
printf("3. line : # of recorded time steps from trajectory\n");
printf("4. line : names of atoms in the ring (separated with space)\n");
printf("5. line : IDs of ring atoms (separated with space)\n");
printf("6. line : name of trajectory file\n\n");
printf("FILE cpout\n");
printf("contains the calculated Cremer-Pople-parameter \n");
printf("of every recorded step.\n\n");
printf("Trajectory FILE\ncan be generated from SYBYL his-file ");
printf("with SYBYL command:\n");
printf("DYNAMICS mol_area DUMP history_file COORDINATES |\n\n");
exit(0);
}

/*=====*/
/* read and convert variables */
/*=====*/

strcpy(inFile,argv[1]);
strcat(inFile, ".cpin");
strcpy(outFile, argv[1]);
strcat(outFile, ".cpout");

in_ptr=fopen(inFile,"r");
out_ptr=fopen(outFile, "w");

/*=====*/
/* read inFile */
/*=====*/

if((in_ptr==NULL))
{
    printf("Error : File not found!\n");
    return(-1);
}

fscanf(in_ptr,"%d ", &ringatoms);
fscanf(in_ptr,"%d ", &totalatoms);
fscanf(in_ptr,"%d ", &steps);
for(j=1; j<=ringatoms; j++)
    fscanf(in_ptr,"%s ", name[j]);
for(j=1; j<=ringatoms; j++)
    fscanf(in_ptr,"%d ",&ID[j]);
fscanf(in_ptr,"%s ", crdFile);

/*=====*/
/* wrong parameters of the cpin-file */
/*=====*/

if(ringatoms<3 || ringatoms>10)
{
    printf("wrong # of ringatoms\n# of ringatoms must be in range 3-10");
    return(-1);
}

if(totalatoms>10000)
{
    printf("wrong # of atoms in the molecule\nmax. # is equal 10000");
    return(-1);
}

```

## 10. Anhang

---

```
}

/*=====*/
/* write the header                                     */
/*=====*/

// q[m] and phi[m]
mmax=abs((ringatoms-1)/2);
printf("The columns of %s are :\n", outFile);
for(m=2; m<=mmax; m++)
    printf("q(%d)          phi(%d) ", m, m);

// even # of ringatoms
oddeven=ringatoms%2;
if(oddeven==0)
    printf( "          q(%d) ", mmax+1);
if(ringatoms==6)
    printf("          theta ");
printf("          Q \n");

/*=====*/
/* read crdFile and find the atom coordinates of the ring atoms */
/*=====*/

crd_ptr=fopen(crdFile, "r");

for(i=1; i<=steps; i++)
{
    for(j=1; j<=totalatoms; j++)
        fscanf(crd_ptr,"%f %f %f ",
            &atomcoor[j][1],&atomcoor[j][2],&atomcoor[j][3]);

    for(j=1; j<=ringatoms; j++)
    {
        ringcoor[j][1]=atomcoor[ID[j]][1];
        ringcoor[j][2]=atomcoor[ID[j]][2];
        ringcoor[j][3]=atomcoor[ID[j]][3];
    }

/*=====*/
/* calculate and write the outFile                                     */
/*=====*/

    CremPop();

    for(m=2; m<=mmax; m++)
        fprintf(out_ptr, "%f %f ", q[m], phi[m]);

    // even # of ringatoms
    if(oddeven==0)
        fprintf(out_ptr, "%f ", q[mmax+1]);
    if(ringatoms==6)
    {
        theta=acos(q[3]/Q);
        theta =theta*180.0/pi;
        fprintf(out_ptr, "%f ", theta);
    }
    fprintf(out_ptr, "%f\n", Q);
}

fclose(in_ptr);
fclose(out_ptr);
} // end of main
```



```

/*=====*/
/* calculate outFile with Cremer-Pople equation from */
/* D. Cremer, J. A. Pople, J. Am. Chem. Soc., 97 (1975), 1354-1358 */
/*=====*/

int CremPop(void)
{
    int j=0,
        i=0,
        m=0,
        oddeven;

    float sum=0,
        shift=0,
        newringcoor[10][4],
        z[10],
        R1[4],
        R2[4],
        n[4],
        nBetrag=0,
        dummy1,
        dummy2,
        dummy3=0,
        dummy4=0;

    for(i=1; i<=3; i++)
    {
        R1[i]=0;
        R2[i]=0;
        n[i]=0;
    }

    /* ===== find the new origin at the geometrical center (Eq.4) =====*/
    /* ===== and store the newringcoor[i][j] =====*/

    for(i=1; i<=3; i++)
    {
        sum=0;
        for(j=1; j<=ringatoms; j++)
            sum=sum+ringcoor[j][i];
        shift=sum/ringatoms;

        for(j=1; j<=ringatoms; j++)
            newringcoor[j][i]=ringcoor[j][i]-shift;
    }

    /* ===== definition of the unit vector n (Eq.8, 9 and 10) =====*/

    for(i=1; i<=3; i++)
    {
        for(j=1; j<=ringatoms; j++)
        {
            R1[i]=R1[i]+(newringcoor[j][i]*sin(2*pi*(j-1)/ringatoms)); // Eq.8
            R2[i]=R2[i]+(newringcoor[j][i]*cos(2*pi*(j-1)/ringatoms)); // Eq.9
        }
    }

    n[1]=(R1[2]*R2[3]-R1[3]*R2[2]); // Eq.10
    n[2]=(R1[3]*R2[1]-R1[1]*R2[3]);
    n[3]=(R1[1]*R2[2]-R1[2]*R2[1]);

    nBetrag=sqrt(pow(n[1],2)+pow(n[2],2)+pow(n[3],2));

```

## 10. Anhang

---

```
n[1]=n[1]/nBetrag;
n[2]=n[2]/nBetrag;
n[3]=n[3]/nBetrag;

/* = definition of the displacement zj of every atom from the mean plane =*/

for(j=1; j<=ringatoms; j++)
{
    z[j]=0;
    for(i=1; i<=3; i++)
        z[j]=z[j]+newringcoor[j][i]*n[i]; // Eq. 11 scalar product is sum
}

/* ===== definition of the of the Cremer-Pople-Parameters =====*/

dummy1=0;
dummy2=0;
dummy3=2.0/ringatoms;

for(m=2; m<=mmax; m++)
{
    for(j=1; j<=ringatoms; j++) // Eq. 12 and 13
    {
        dummy4=((2*pi*m*(j-1))/ringatoms);
        dummy1=dummy1+(z[j]*cos(dummy4));
        dummy2=dummy2+(z[j]*sin(dummy4));
    }
    dummy1=sqrt(dummy3)*dummy1;
    dummy2=-sqrt(dummy3)*dummy2;

    phi[m]=atan(dummy2/dummy1); // the right value but not the right phase
    q[m] =dummy1/cos(phi[m]);

    if(q[m]<0) // find the right phase
        phi[m]=phi[m]+pi;
    if(phi[m]<0)
        phi[m]=phi[m]+2*pi;
    q[m]=dummy1/cos(phi[m]);
    phi[m] =phi[m]*180.0/pi;
}

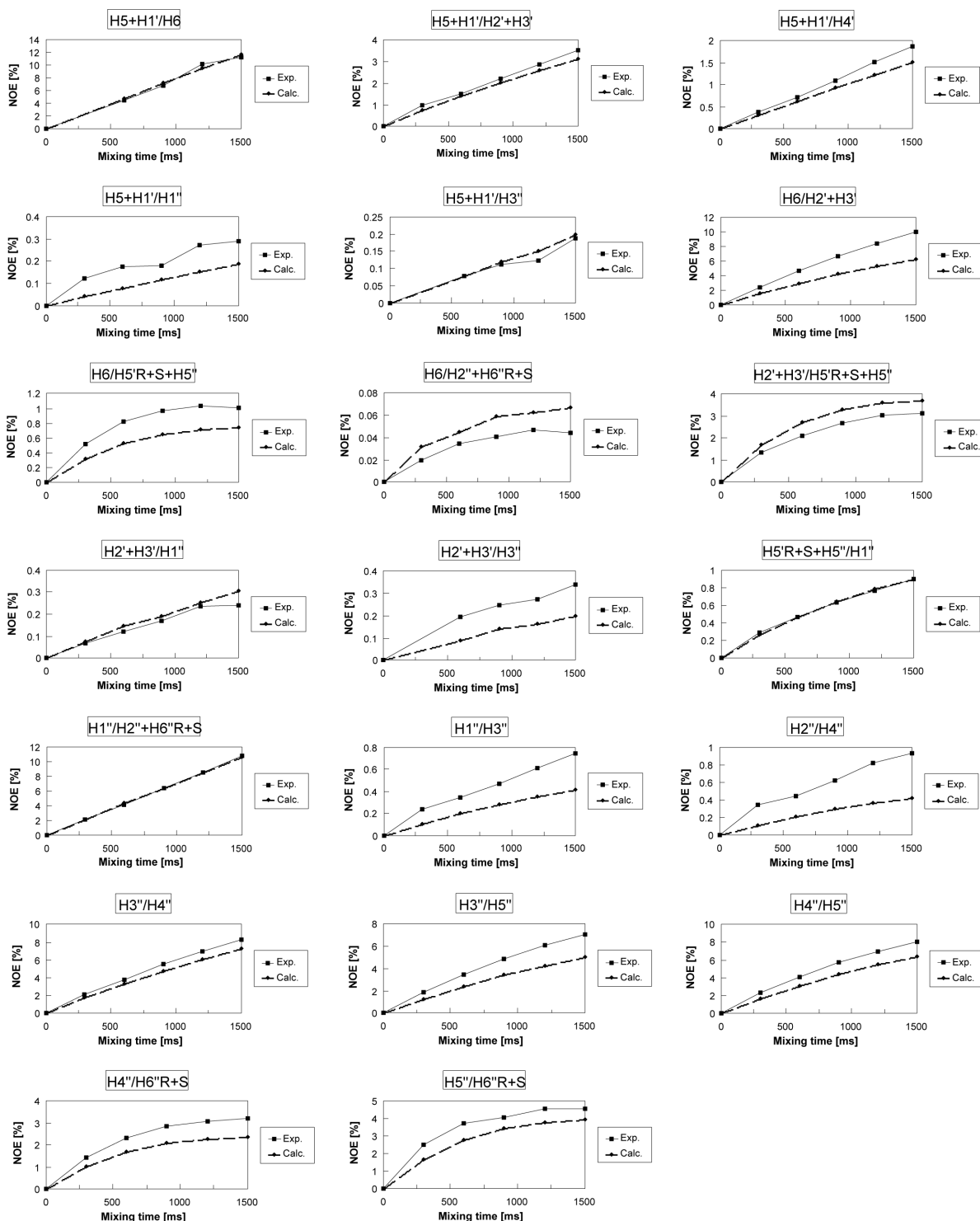
sum=0;
for(j=1; j<=ringatoms; j++) // Eq. 17
    sum=sum+pow(z[j],2);
Q=sqrt(sum);

/* ===== number of ringatoms are even =====*/

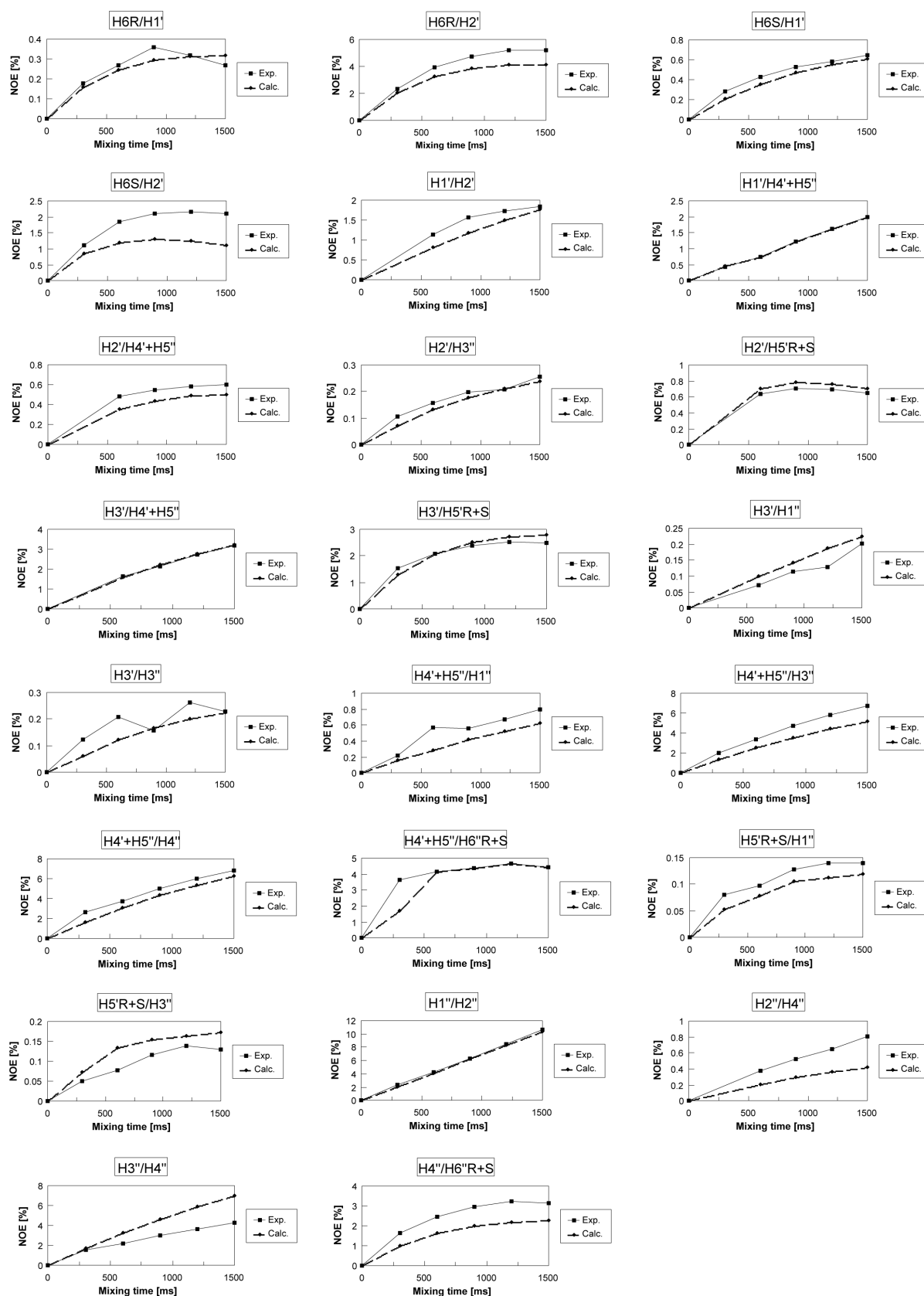
oddeven=ringatoms%2;
if(oddeven==0) // Eq. 14
{
    m=ringatoms/2;
    dummy1=0;
    dummy3=1.0/ringatoms;
    for(j=1; j<=ringatoms; j++)
        dummy1=dummy1+(z[j]*cos(pi*(j-1)));
    q[m]=sqrt(dummy3)*dummy1;
}
return 1;
}
```



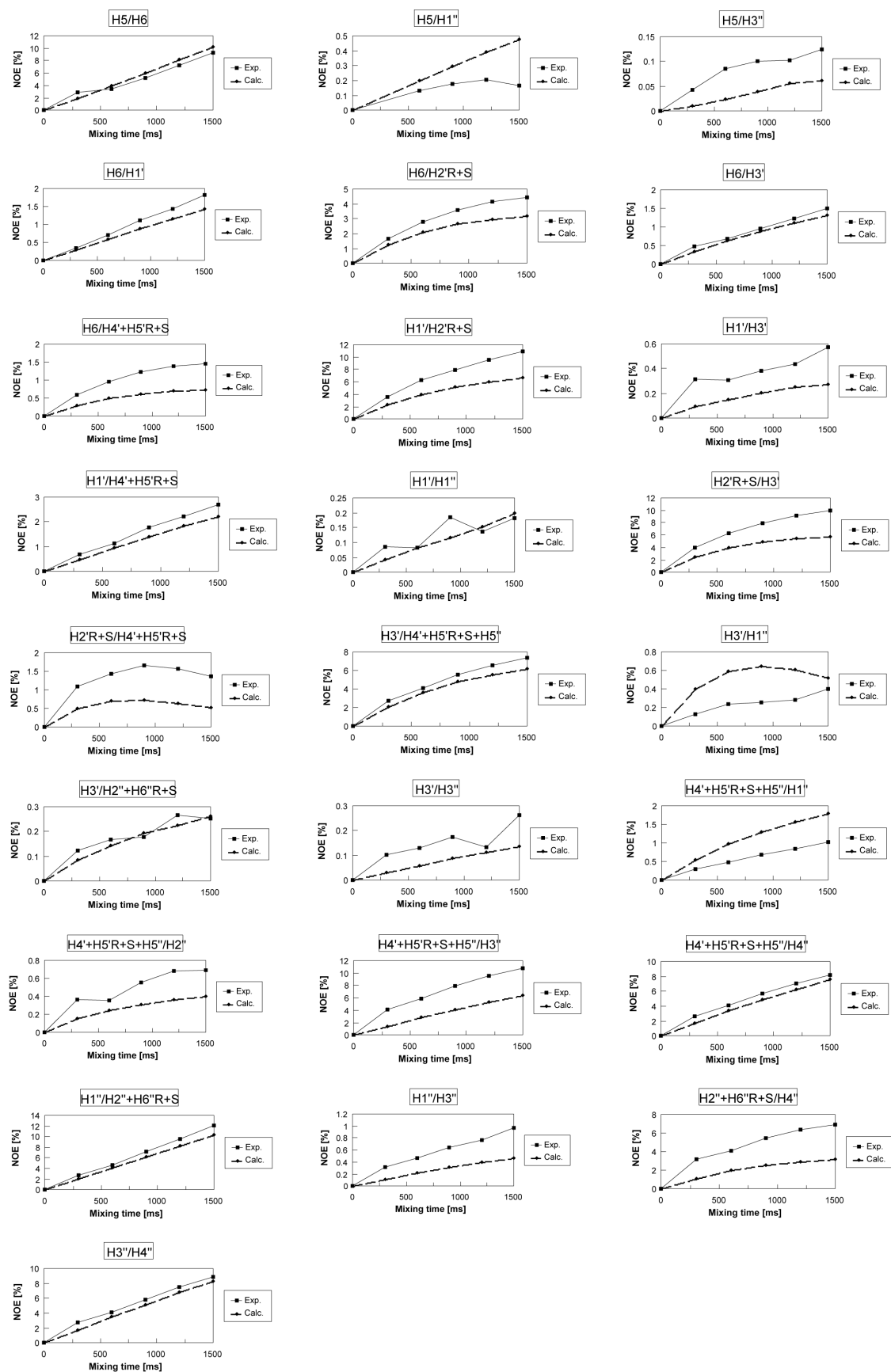
## 10.4. Experimentelle und theoretisch ermittelte NOE-Aufbaukurven



**Abbildung 10-1:** Experimentelle (Exp.) und aus der MD-Simulation erhaltene (Calc.) NOE-Aufbaukurven von UDP-Gal.



**Abbildung 10-2:** Experimentelle (Exp.) und aus der MD-Simulation erhaltene (Calc.) NOE-Aufbaukurven von 56dihydroUDP-Gal.



**Abbildung 10-3:** Experimentelle (Exp.) und aus der MD-Simulation erhaltene (Calc.) NOE-Aufbaukurven von 2dUDP-Gal.

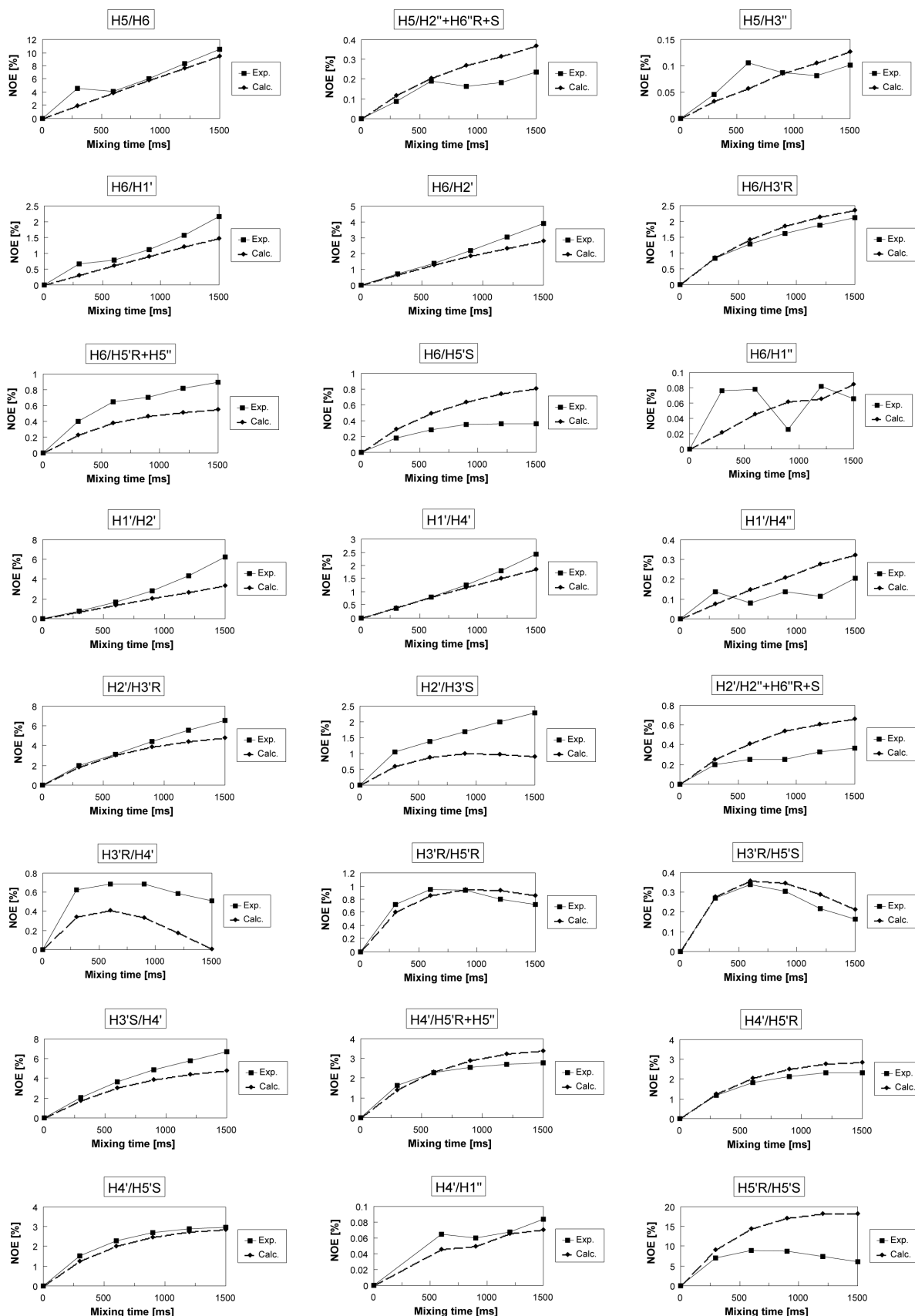
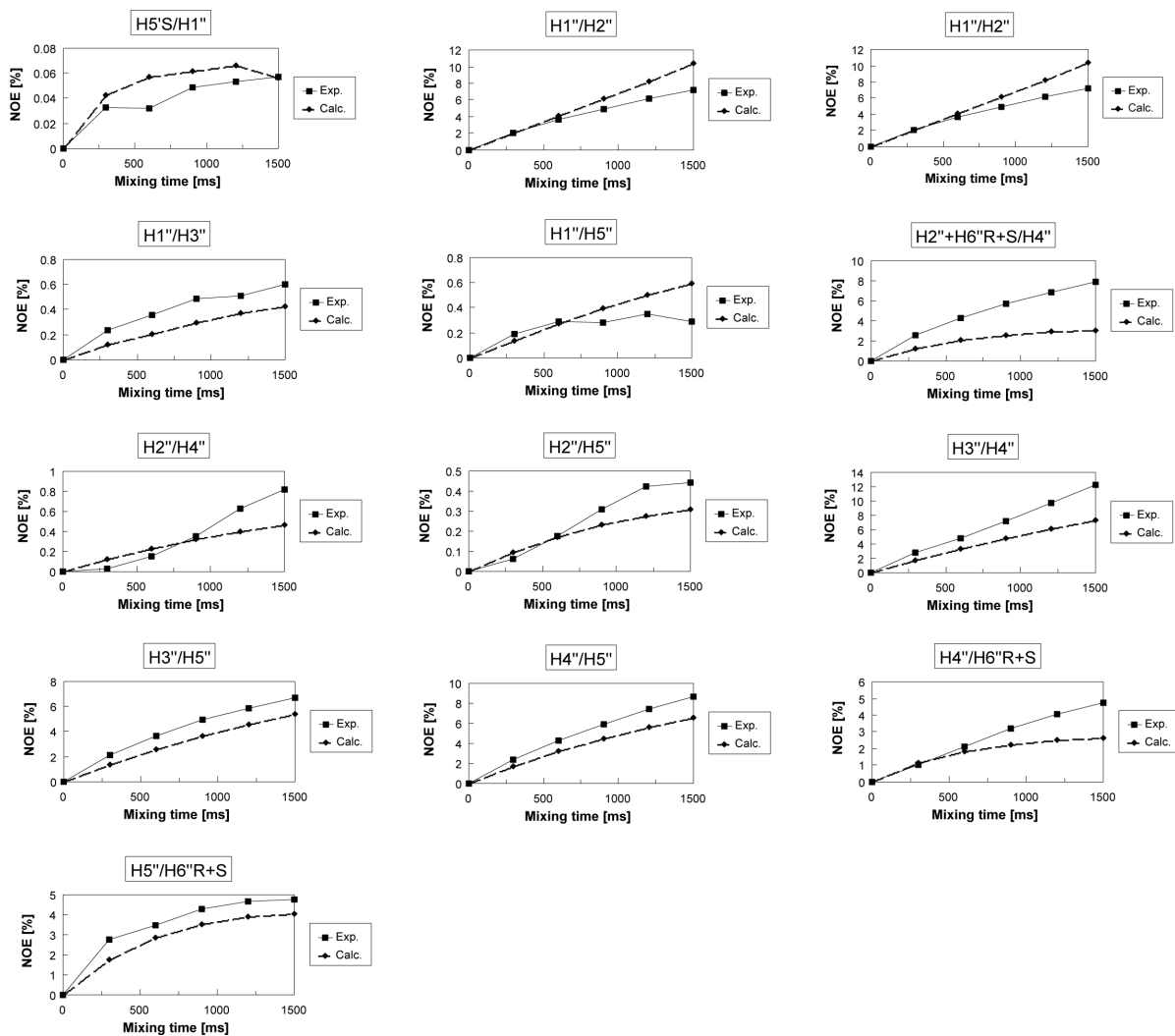


Abbildung 10-4: Experimentelle (Exp.) und aus der MD-Simulation erhaltene (Calc.) NOE-Aufbaukurven von 3dUDP-Gal.

## 10. Anhang



noch Abbildung 10-4.



## 11. Literaturverzeichnis

- <sup>1</sup> Auszug der Rede vor der königlichen schwedischen Akademie der Wissenschaften von K. Myrbäck anlässlich der Chemie-Nobelpreisverleihung an Luis F. Leloir (1970).
- <sup>2</sup> Z. Guo, P. G. Wang, *Appl. Biochem. Biotech.* **68** (1997) 1-20.
- <sup>3</sup> J. A. Campbell, G. J. Davies, V. Bulone, B. Henrisstat, *Biochem. J.* **326** (1997) 929-942.
- <sup>4</sup> C. Breton, E. Bettler, D. H. Joziase, R. Geremia, A. Imberty, *J. Biochem.* **123** (1998) 1000-1009.
- <sup>5</sup> K. Narimatsu, S. Sinha, K. Brew, H. Okayama, P. K. Qasba, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **83** (1986) 4720-4724.
- <sup>6</sup> J. C. Paulson, K. J. Colley, *J. Biol. Chem.* **264** (1989) 203-209.
- <sup>7</sup> a) E. E. Boeggeman, P. V. Balaji, P. K. Qasba, *Glycoconj. J.* **12** (1995) 865-878.  
b) E. E. Boeggeman, P. V. Balaji, N. Sethi, A. S. Masibay, P. K. Qasba, *Protein Eng.* **6** (1993) 779-785.
- <sup>8</sup> D. H. Joziase, *Glycobiology* **2** (1992) 271-277.
- <sup>9</sup> A. M. V. Duncan, M. M. McCorquodale, C. Morgan, T. J. Rutherford, H. E. Appert, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **141** (1986) 1185-1188.
- <sup>10</sup> R. Almeida, M. Amado, L. David, S. B. Levery, E. H. Holmes, G. Merckx, A. G. van Kessel, E. Rygaard, H. Hassan, E. Bennett, H. Clausen, *J. Biol. Chem.* **272** (1997) 31979-31991.
- <sup>11</sup> T. Schwientck, R. Almeida, S. B. Levery, E. H. Holmes, E. Bennett, H. Clausen, *J. Biol. Chem.* **273** (1998) 29331-29340.
- <sup>12</sup> N. W. Lo, J. H. Shaper, J. Pevsner, N. L. Shaper, *Glycobiology* **8** (1998) 517-526.
- <sup>13</sup> T. Nomura, M. Takizawa, J. Aoki, H. Arai, K. Inoue, E. Wakisaka, N. Yoshizuba, G. Imokawa, N. Dohmae, K. Takio, *J. Biol. Chem.* **273** (1998) 13570-13577.
- <sup>14</sup> A. Kuroiwa, Y. Matsuda, T. Okajima, K. Furukawa, *Cytogenet. Cell Genet.* **89** (2000) 8-9.
- <sup>15</sup> T. Sato, K. Furukawa, H. Bakker, D. H. von den Eijnden, I. van Die, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95** (1998) 472-477.
- <sup>16</sup> B. Ramakrishnan, P. S. Shah, P. K. Qasba, *J. Biol. Chem.* **276** (2001) 37665-37671.
- <sup>17</sup> G. d'Agostaro, B. Bendiak, M. Tropak, *Eur. J. Biochem.* **183** (1989) 211-217.
- <sup>18</sup> B. D. Shur, S. Evans, Q. Lu, *Glycoconj.* **15** (1998) 537-548.
- <sup>19</sup> X. Shi, S. Amindari, K. Paruchuru, D. Skalla, H. Burkin, B. D. Shur, *Development* **128** (2001) 645-654.
- <sup>20</sup> M. Asano, K. Furukawa, M. Kido, S. Matsumoto, Y. Umesaki, N. Kochibe, Y. Iwakura, *EMBO J.* **16** (1997) 1850-1857.
- <sup>21</sup> Q. X. Li, P. Hasty, B. D. Shur, *Dev. Biol.* **2** (1997) 257.
- <sup>22</sup> T. Maga, M. Mizuno, S. Tanaka, F. Yoshinaga, Y. Mikami, Y. Kihara, T. Kiso, J. Tomada, J. Okada, T. Tsuji, *Digestion* **4** (1997) 389-395.
- <sup>23</sup> D. Lenoir, S. Gréco, P. Louisot, M.-C. Biol, *Metabolism* **49** (2000) 526-531.
- <sup>24</sup> a) A. Kobata, *Pigment Cell Res.* **2** (1989) 304-308.  
b) P. J. Delves, *Autoimmunity* **27** (1998) 239-253.

- c) Y. Udagawa, D. Akoi, K. Ito, T. Uejima, M. Uemura, S. Nozawa, *Eur. J. Cancer* **34** (1998) 489-495.
- d) K. Kubushiro, J. Ma, T. Fukuchi, K. Banno, Y. Muramatsu, K. Tsukazaki, S. Nozawa, *Gynecol. Obstet. Invest.* **48** (1999) 211-214.
- <sup>25</sup> a) B. R. Parekh, R. A. Dwek, T. W. Rademacher, *Br. J. Rheumatol.* **27** (1988) 162-169.
- b) P. A. Jeddi, K. B. Bodman-Smith, T. Lund, P. M. Lydyard, L. Mengle-Gaw, D. A. Isenberg, P. Youinou, P. J. Delves, *Immunolgy* **87** (1996) 654-659.
- <sup>26</sup> F. Lipmann, *Adv. Enzymol.* **1** (1941) 99-162.
- <sup>27</sup> a) D. B. Boyd, W. Lipscomb, *J. Theor. Biol.* **25** (1969) 403-420.
- b) D. G. Watson, O. Kennard, *Acta Crystallogr. B* **29** (1973) 2358-2364.
- c) H.-J. Haupt, P. Balsaa, U. Flörke, *Angew. Chem.* **100** (1988) 280-281.
- <sup>28</sup> Y. Sugawara, H. Iwasaki, *Acta Crystallogr., Sect. C* **40** (1984) 389-393.
- <sup>29</sup> C. H. Lee, R. H. Sarma, *Biochemistry* **15** (1976) 697-704.
- <sup>30</sup> a) T.-S. Lin, J.-H. Yang, M.-C. Liu, Z.-Y. Shen, Y.-C. Cheng, W. H. Prusoff, G. I. Birnbaum, J. Giziawicz, I. Ghazzouli, V. Brankovan, J.-S. Feng, G.-D. Hsiung, *J. Med. Chem.* **34** (1991) 693-701.
- b) G. Andrei, R. Snoeck, J. Balzarini, E. De Clercq, *Nucleosids Nucleotides* **14** (1995) 559-562.
- c) T. Kulikowski, *Pharm. World Sci.* **16** (1994) 127-138.
- d) C. Teran, L. Santana, M. Teijeira, E. Uriarte, E. De Clercq, *Chem. Pharm. Bull.* **48** (2000) 293-295.
- e) R. Alvarez, M.-L. Jimeno, F. Gago, J. Balzarini, M.-J. Pérez-Pérez, M.-J. Camarasa, *Antivir. Chem. Chemother.* **9** (1998) 333-340.
- <sup>31</sup> E. Ichikawa, K. Kato, *Curr. Med. Chem.* **8** (2001) 385-423.
- <sup>32</sup> a) K. Luzuriaga, Y. Bryson, P. Krogstad, J. Robinsin, B. Stechenberg, M. Lamson, S. Cort, J. L. Sullivan, *N. Engl. J. Med.* **336** (1997) 1343-1349.
- b) A. S. Perelson, P. Essunger, Y. Cao, M. Vesanen, A. Hurley, K. Saksela, M. Markowitz, D. D. Ho, *Nature* **387** (1997) 188-191.
- <sup>33</sup> a) D. Faulds, R. N. Brogden, *Drugs* **44** (1992) 94-116.
- b) R. M. Gulick, J. W. Mellers, D. Havlir, J. J. Eron, C. Gonzales, D. McMahon, D. D. Richman, F. T. Valentine, L. Jonas, E. A. Emini, J. A. Chodakewitz, *N. Engl. J. Med.* **337** (1997) 734-739.
- <sup>34</sup> a) S. M. Daluge, D. J. Purifoy, P. M. Savina, M. H. St. Clair, N. R. Parry, I. K. Dev, P. Nowak, K. M. Ayers, J. E. Reardon, G. B. Roberts, J. A. Fyfe, M. R. Blum, D. R. Averett, R. E. Dornsife, B. A. Domin, R. Ferone, D. A. Lewis, T. A. Krenitsky, *Antimicrob. Agents Chemother.* **38** (1994) 1590-1603.
- b) S. M. Hammer, K. E. Squires, M. D. Hughes, J. M. Grimes, L. M. Demeter, J. S. Currier, J. J. Eron Jr., J. E. Feinberg, H. H. Balfour Jr., L. R. Deyton, J. A. Chodakewitz, M. A. Fischl, *N. Engl. J. Med.* **337** (1997) 725-733.
- c) P. Herdewijn, J. Balzarini, E. De Clercq, R. Pauwels, M. Baba, S. Broder, H. Vanderhaeghe, *J. Med. Chem.* **30** (1987) 1270-1278.

- d) B. A. Larder, S. D. Kemp, P. R. Harrigan, *Science* **269** (1995) 696-699.
- e) H. Mitsuya, K. J. Weinhold, P. A. Furman, M. H. St. Clair, S. P. Nusinoff-Lehrman, R. C. Gallo, D. Bolognesi, D. W. Barry, S. Broder, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82** (1985) 7096-7100.
- <sup>35</sup> a) J. A. V. Coates, N. Cammack, H. J. Jenkinson, I. M. Mutton, B. A. Pearson, R. Storer, J. M. Cameron, C. R. Penn, *Antimicrob. Agents Chemother.* **36** (1992) 202-205.
- b) R. F. Shinazi, C. K. Chu, A. Peck, A. McMillan, R. Mathis, D. Cannon, L.-S. Jeong, J. W. Beach, W.-B. Choi, S. Yeola, D. C. Liotta, *Antimicrob. Agents Chemother.* **36** (1992) 672-676.
- c) R. F. Shinazi, R. M. Lloyd Jr., M.-H. Nguyen, D. L. Cannon, A. McMillan, N. Ilksoy, C. K. Chu, D. C. Liotta, H. Z. Bazmi, J. W. Mellors, *Antimicrob. Agents Chemother.* **37** (1993) 875-881.
- <sup>36</sup> W. Saenger, "Principles of Nucleic Acid Structure" Springer Verlag, Berlin (1988).
- <sup>37</sup> P. van Roey, J. M. Salerno, C. K. Chu, R. F. Shinazi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86** (1989) 3929-3933.
- <sup>38</sup> K. Lee, C. K. Chu, *Antimicrob. Agents Chemother.* **45** (2001) 138-144.
- <sup>39</sup> A. Willecke, Diplomarbeit, Universität Oldenburg (1997).
- <sup>40</sup> G. Haegeler, R. Spiske, H.W. Hoeffken, T. Lenzen, U. Weber, S. Goudetsidis, *Computers & Chemistry* **19** (1995) 277-282.
- Programm erhältlich unter:  
<http://www.uni-duesseldorf.de/WWW/MathNat/AC1/forsch.ung/nmr/nmr.htm>
- <sup>41</sup> H. Kessler, M. Gehrke, C. Griesinger, *Angew. Chem.* **100** (1988) 507-554.
- <sup>42</sup> a) W. P. Aue, E. Bartholdi, R. R. Ernst, *J. Chem. Phys.* **64** (1976) 2229-2246.
- b) A. E. Derome, *Modern NMR Techniques for Chemistry Research*, Pergamon Oxford (1991) 183-234.
- <sup>43</sup> W. P. Aue, J. Karhan, R. R. Ernst, *J. Chem. Phys.* **64** (1976) 4226-4227.
- <sup>44</sup> C. Griesinger, O. W. Sørensen, R. R. Ernst, *J. Am. Chem. Soc.* **107** (1985) 6394-6396.
- <sup>45</sup> L. Müller, *J. Magn. Reson.* **72** (1987) 191-197.
- <sup>46</sup> a) R. E. Hurd, *J. Magn. Reson.* **87** (1990) 422-428.
- b) I. M. Brereton, S. Crozier, J. Field, Dm M. Doddrell, *J. Magn. Reson.* **93** (1991) 54-62.
- c) A. L. Davis, E. D. Laue, J. Keeler, D. Moskau, J. Lohman, *J. Magn. Reson.* **94** (1991) 637-644.
- <sup>47</sup> D. Neuhaus, M. P. Williamson, "The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis" *VCH* Weinheim (1989).
- <sup>48</sup> H. Kessler, H. Oschkinat, C. Griesinger, *J. Magn. Reson.* **70** (1986) 106-133.
- <sup>49</sup> a) J. Jeener, B. H. Meier, P. Bachmann, R. R. Ernst, *J. Chem. Phys.* **71** (1979) 4546-4563.
- b) G. Bodenhausen, H. Kogler, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* **58** (1984) 370-388.
- <sup>50</sup> T. Parella, F. Sánchez-Ferrando, A. Virgili, *J. Magn. Reson.* **112** (1995) 106-108.
- <sup>51</sup> T. Parella, F. Sánchez-Ferrando, A. Virgili, *J. Magn. Reson.* **114** (1995) 32-38.
- <sup>52</sup> V. Blechta, F. del Rio-Portilla, R. Freeman, *Magn. Reson. Chem.* **32** (1994) 134-137.
- <sup>53</sup> T. Nishida, G. Widmalm, P. Sándor, *Magn. Reson. Chem.* **34** (1996) 377-382.

- <sup>54</sup> a) R. Ditchfield, W. J. Hehre, J. A. Pople, *J. Chem. Phys.* **54** (1971) 724-728.  
b) W. J. Hehre, R. Ditchfield, J. A. Pople, *J. Chem. Phys.* **56** (1972) 2257-2261.  
c) M. S. Gordon, *Chem. Phys. Lett.* **76** (1980) 163-169.  
d) P. C. Hariharan, J. A. Pople, *Theo. Chim. Acta.* **28** (1973) 213-222.
- <sup>55</sup> a) G. A. Petersson and M. A. Al-Laham, *J. Chem. Phys.* **94** (1991) 6081-6090.  
b) G. A. Petersson, A. Bennett, T. G. Tensfeldt, M. A. Al-Laham, W. A. Shirley, J. Mantzaris, *J. Chem. Phys.* **89** (1988) 2193-2218.
- <sup>56</sup> a) J. A. Pople, G. A. Segal, *J. Chem. Phys.* **43** (1965) S136-S151.  
b) J. A. Pople, D. P. Santry, G. A. Segal, *J. Chem. Phys.* **43** (1965) S129-S135.
- <sup>57</sup> a) M. J. S. Dewar, W. Thiel, *J. Am. Chem. Soc.* **99** (1977) 4899-4907.  
b) M. J. S. Dewar, W. Thiel, *J. Am. Chem. Soc.* **99** (1977) 4907-4917.
- <sup>58</sup> M. J. S. Dewar, E. G. Zoebisch, E. F. Healy, J. J. P. Stewart, *J. Am. Chem. Soc.* **107** (1985) 3902-3909.
- <sup>59</sup> a) J. J. P. Stewart, *J. Comp. Chem.* **10** (1989) 209-220.  
b) J. J. P. Stewart, *J. Comp. Chem.* **10** (1989) 221-264.  
c) J. J. P. Stewart, *J. Comp. Chem.* **12** (1991) 320-341.
- <sup>60</sup> U. C. Singh, P. A. Kollman, *J. Comput. Chem.* **5** (1984) 129-145.
- <sup>61</sup> a) C. I. Bayly, P. Cieplak, W. D. Cornell, P. A. Kollman, *J. Phys. Chem.* **97** (1993) 10269-10280.  
b) W. D. Cornell, P. Cieplak, C. I. Bayly, P. A. Kollman, *J. Am. Chem. Soc.* **115** (1993) 9629-9631.
- <sup>62</sup> H. J. C. Berendsen, J. P. Pstma, W. F. van Gunsteren, A. Dinola, J. R. Haak, *J. Chem. Phys.* **81**(1984) 3684-3690.
- <sup>63</sup> N. J. Allinger, *J. Am. Chem. Soc.* **99** (1977) 8127-8134.
- <sup>64</sup> N. L. Allinger, Y. H. Yuh, J.-H. Lii, *J. Am. Chem. Soc.* **111** (1989) 8551-8582.
- <sup>65</sup> a) S. J. Weiner, P. A. Kollman, D. A. Case, U. C. Singh, C. Ghio, G. Alagona, S. Profeta, P. Weiner, *J. Am. Chem. Soc.* **106** (1984) 765-784.  
b) S. J. Weiner, P. A. Kollman, D. T. Nguyen, D. A. Case, *J. Comp. Chem.* **7** (1986) 230-252.
- <sup>66</sup> P. Kollman, P. Weiner, A. Dearing, *Biopolymers* **20** (1981) 2583-2621.
- <sup>67</sup> W. D. Cornell, P. Cieplak, C. I. Bayly, I. R. Gould, K. M. Merz (Jr.), D. M. Ferguson, D.C. Spellmeyer, T. Fox, J. W. Caldwell, P. A. Kollman, *J. Am. Chem. Soc.* **177** (1995) 5179-5197.
- <sup>68</sup> R. J. Woods, R. A. Dwek, C. J. Edge, B. Fraser-Reid, *J. Phys. Chem.* **99** (1995) 3832-3846.
- <sup>69</sup> S. W. Homans, *Biochemistry* **29** (1990) 9110-9118.
- <sup>70</sup> J. F. Cannon, *J. Comput. Chem.* **14** (1993) 995-1005.
- <sup>71</sup> H. A. Gabb, S. C. Harvey, *J. Am Chem Soc.* **115** (1993) 4219-4227.
- <sup>72</sup> K. Wütrich, "NMR of Proteins and Nucleic Acids" *John Wiley and Sons*, New York.
- <sup>73</sup> a) A. E. Torda, R. M. Scheek, W. F. van Gunsteren, *Chem. Phys. Lett.* **157** (1989) 289-294.  
b) A. E. Torda, R. M. Scheek, W. F. van Gunsteren, *J. Mol. Biol.* **214** (1990) 223-235.
- <sup>74</sup> A. E. Torda, R. M. Brunne, T. Huber, H. Kessler, W. F. van Gunsteren, *J. Biomol. NMR* **3** (1993) 55-66.

- <sup>75</sup> D. A. Pearlman, *J. Biomol. NMR* **4** (1994) 1-16.
- <sup>76</sup> C. A. G. Haasnoot, F. A. A. M. de Leeuw und C. Altona, *Tetrahedron* **36** (1980) 2783-2792.
- <sup>77</sup> K. Boch. J. Duus, *J. Carb. Chem.* **13** (1994) 513-543.
- <sup>78</sup> A. Warshel, M. Levitt, *J. Mol. Biol.* **103** (1976) 227-249.
- <sup>79</sup> a) M. J. Field; P. A. Bash, M. Karplus, *J. Comp. Chem.* **11** (1990) 700-733.  
b) J. Gao, X. Xio, *Science* **258** (1992) 631-635.  
c) V. Luzhkov, A. Warshel, *J. Comput. Chem.* **13** (1992) 199-213.  
d) M. A. Thompson, *J. Am. Chem. Soc.* **117** (1995) 11341-11344.  
e) M. A. Thompson, *J. Phys. Chem.* **100** (1996) 14492-14507.  
f) D. Bakowies, W. Thiel, *J. Phys. Chem.* **100** (1996) 10580-10594.  
g) G. Monard; M. Loos, V. Théry; K. Baka; J.-L. Rivail *Int. J. Quant. Chem.* **58** (1996) 153-159.
- <sup>80</sup> a) U. C. Singh, P. A. Kollman, *J. Comput. Chem.* **7** (1986) 718-730.  
b) R. V. Stanton, L. R. Little; K. M. Merz Jr., *J. Phys. Chem.* **99** (1995) 17344-17348.  
c) X. Assfeld, J.-L. Rivail, *Chem. Phys. Lett.* **263** (1996) 100-106.
- <sup>81</sup> a) R. V. Stanton, D. S. Hartsough, K. M. Merz Jr., *J. Comput. Chem.* **16** (1994) 113-128.  
b) T. A. Wesolowski, A. Warshel, *J. Phys. Chem.* **97** (1993) 8050-8053.  
c) D. Wei; D. R. Salahub, *J. Chem. Phys.* **101** (1994) 7633-7642.  
d) I. Tuñón, M. T. C. Martins-Costa; C. Milloy, M. F. Ruiz-López, J.-L. Rivail, *J. Comput. Chem.* **17** (1996) 19-29.
- <sup>82</sup> a) S. Nosé, *J. Chem. Phys.* **81** (1984) 511-519.  
b) W. G. Hoover, *Phys. Rev. A* (1985) 1695-1697.  
c) G. J. Martyna, M. L. Klein, *J. Chem. Phys.* **97** (1992) 2635-2643.  
d) H. C. Andersen, *J. Chem. Phys.* **72** (1980) 2384-2393.  
e) M. Parinello, A. Rahman, *Phys. Rev. Lett.* **45** (1980) 1196-1199.  
f) G. J. Martyna, D. J. Tobias, M. L. Klein, *J. Chem. Phys.* **101** (1994) 4177-4189.
- <sup>83</sup> G. J. Martyna, M. E. Tuckerman, D. J. Tobias, M. L. Klein, *Mol. Phys.* **87** (1996) 1117-1157.
- <sup>84</sup> M. E. Tuckerman, G. J. Martyna, B. J. Berne, *J. Chem. Phys.* **93** (1990) 1287-1291.
- <sup>85</sup> M. Karplus, *J. Am. Chem. Soc.* **85** (1963) 2870-2871.
- <sup>86</sup> P. L. Durette, D. Horton, *Org. Magn. Res.* **3** (1971) 417-427.
- <sup>87</sup> J. H. Ippel, S. S. Wijmenga, R. de Jong, H. A. Heus, C. W. Hilbers, E. de Vroom, G. A. van Marel, J. H. van Boom, *Magn. Reson. Chem.* **34** (1996) S156-S176.
- <sup>88</sup> D. B. Davies, P. Rajani, M. MacCoss, S. S. Danyluk, *Magn. Reson. Chem.* **23** (1985) 72-77.
- <sup>89</sup> C. Thibaudeau, J. Pavlec, J. Chattopadhyaya, *J. Org. Chem.* **63** (1998) 4967-4984.
- <sup>90</sup> P. P. Lankhorst, C. A. G. Haasnoot, C. Erkelens, C. Altona, *J. Biomol. Struct. Dynam.* **1** (1984) 1387-1405.
- <sup>91</sup> C-H. Lee, R. H. Sarma, *Biochemistry* **15** (1976) 697-704.
- <sup>92</sup> a) J. W. Keepers, T. L. James, *J. Magn. Reson.* **57** (1984) 404-426.  
b) R. Boelens, T. M. Koning, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, R. Kaptein, *J. Magn. Reson.* **82** (1989) 290-308.  
c) R. Boelens, T. M. Koning, R. Kaptein, *J. Mol. Struct.* **173** (1988) 299-311.
- <sup>93</sup> J. M. Van de Ven, C. W. Hilbers, *Eur. J. Biochem.* **178** (1988) 1-38.

- <sup>94</sup> C. Altona, M. Sundaralingam, *J. Am. Chem. Soc.* **115** (1972) 8205-8212.
- <sup>95</sup> D. Cremer, J. A. Pople, *J. Am. Chem. Soc.* **97** (1975) 1354-1358.
- <sup>96</sup> F. H. Allen, O. Kennard, *Chemical Design Automation News*, **8** (1993) 31-37.  
<http://www.ccdc.cam.ac.uk/>
- <sup>97</sup> a) G. Monard, M. Loos, V. Théry, K. Baka, J.-L. Rivail, *Int. J. Quant. Chem.* **58** (1996) 153-159.  
b) X. Assfeld, J.-L. Rivail, *J. Comp. Chem.* **263** (1996) 100-106.
- <sup>98</sup> A. Saran, B. Pullman, D. Perahia, *Biochim. Biophys. Acta* **299** (1973) 497-499.
- <sup>99</sup> D. Cremer, J. A. Pople, *J. Am. Chem. Soc.* **97** (1975) 1354-1358.
- <sup>100</sup> H. P. M. de Leeuw, C. A. G. Haasnoot, C. Altona, *Isr. J. Chem.* **20** (1980) 108-120.
- <sup>101</sup> F. A. A. M. de Leeuw, C. Altona, *J. Chem. Soc. Perkin II* (1982) 375-384.
- <sup>102</sup> D. B. Davies, P. Rajani, H. Sadikot, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II* (1985) 279-285.
- <sup>103</sup> A. Rahman, H. R. Wilson, *Acta Cryst. B* **28** (1972) 2260-2270.
- <sup>104</sup> A. Saran, D. Perahia, B. Pullman, *Theoret. chim. Acta* **30** (1973) 31-44.
- <sup>105</sup> D. Suck, W. Saenger, *J. Am. Chem. Soc.* **94** (1972) 6520-6526.
- <sup>106</sup> L. M. Rhodes, P. R. Schimmel, *Biochemistry* **10** (1971) 4426-4433.
- <sup>107</sup> a) P. O. P. Ts'o, N. S. Kondo, M. P. Schweizer, D. P. Hollis, *Biochemistry* **8** (1969) 997-1029.  
b) M. P. Schweizer, S. I. Chan, G. H. Helmkamp, P. O. P. Ts'o, *J. Am. Chem. Soc.* **86** (1964) 696-700.  
c) R. N. Maslova, E. A. Lesnik, J. M. Warshavsky, *Mol. Biol. (USSR)* **3** (1969) 575-582.  
d) V. I. Bruskov, V. N. Bushnev, V. I. Poltev, *Mol. Biol. (USSR)* **14** (1980) 245-250.  
e) G. L. Amidon, S. Anik, J. Rubin, In: "Structure and Conformation of Nucleic Acids and Protein-Nucleic Acid Interactions" Univ. Park Press, Baltimore (1975).
- <sup>108</sup> C. Altona, M. Sundaralingam, *J. Am. Chem. Soc.* **94** (1972) 8205-8214.
- <sup>109</sup> W. K. Olson, *J. Am. Chem. Soc.* **104** (1982) 278-286.
- <sup>110</sup> H. A. Gabb, S. C. Harvey, *J. Am. Chem. Soc.* **115** (1993) 4219-4227.
- <sup>111</sup> C. Thibaudeau, J. Plavec, J. Chattopadhyaya, *J. Org. Chem.* **61** (1996) 266-286.
- <sup>112</sup> C. Thibaudeau A. Földesi, J. Chattopadhyaya, *Tetrahedron* **54** (1998) 1867-1900.
- <sup>113</sup> C. Thibaudeau A. Földesi, J. Chattopadhyaya, *Tetrahedron* **53** (1997) 14043-14072.
- <sup>114</sup> I. Luyten, C. Thibaudeau, A. Sandström, J. Chattopadhyaya, *Tetrahedron* **53** (1997) 6433-6464.
- <sup>115</sup> A. J. Kirby, In: "The Anomeric Effect & Related Stereoelectronic Effects at Oxygen" Springer Verlag, Berlin (1983).
- <sup>116</sup> S. Wolf, *Acc. Chem. Res.* **5** (1972) 102-111.
- <sup>117</sup> a) M. A. Murcko, R. A. DiPaola, *J. Am. Chem. Soc.* **114** (1992) 10010-10018.  
b) M. R. Kazerouni, L. Hedberg, K. Hedberg, *J. Am. Chem. Soc.* **119** (1997) 8324-8331.
- <sup>118</sup> N. S. Zefirov, L. G. Gurvich, A. S. Shashkov, M. Z. Krimer, E. A. Vorob'eva, *Tetrahedron* **32** (1976) 1211-1219.
- <sup>119</sup> a) T. K. Brunck, F. J. Weinhold, *J. Am. Chem. Soc.* **101** (1979) 1700-1709.  
b) P. Dionne, M. St-Jacques, *J. Am. Chem. Soc.* **109** (1987) 2616-2623.
- <sup>120</sup> R. U. Limieux, R. K. Kullnig, H. J. Bernstein, W. G. Schneider, *J. Am. Chem. Soc.* **80** (1958) 6098-6105.

- <sup>121</sup> R. K. Jalluri, Y. H. Yuh, E. W. Taylor, In: "The Anomeric Effect & Associated Stereoelectronic Effects" American Chemical Society, Washington D. C. **539** (1993).
- <sup>122</sup> C. Romers, C. Altona, H. R. Buys, E. Havinga, In: "Topics in Stereochemistry" Wiley Interscience, New York **4** (1969).
- <sup>123</sup> A. Braams, Dissertation, Universität Oldenburg (1997)
- <sup>124</sup> W. Guschlbauer, K. Jankowski, *Nucleic Acid Res.* **8** (1980) 1421-1433.
- <sup>125</sup> J. A. Gerlt, A. V. Youngblood, *J. Am. Chem. Soc.* **102** (1980) 7433-7438.
- <sup>126</sup> J. Plavec, C. Thibaudeau, J. Chattopadhyaya, *Pure Appl. Chem.* **68** (1996) 2137-2144.
- <sup>127</sup> N. Hicks, O. W. Howarth, D. W. Hutchinson, *Carbohydr. Res.* **216** (1991) 1-9.
- <sup>128</sup> D. A. Pearlman, S.-H. Kim, *J. Biomol. Struct. Dynamics* **3** (1985) 99-125
- <sup>129</sup> M. Polak, B. Mohar, J. Kobe, J. Plavec, *J. Am. Chem. Soc.* **120** (1998) 2508-2513.
- <sup>130</sup> P. C. Kline, A. S. Serianni, *Magn. Reson. Chem.* **28** (1990) 324-330.
- <sup>131</sup> J. M. Van de Ven, C. W. Hilbers, *Eur. J. Biochem.* **178** (1988) 1-38.
- <sup>132</sup> M.-J. Hwang, P.-Y. Chu, J.-C. Chen, I. Chao, *J. Comput. Chem.* **20** (1999) 1702-1715.
- <sup>133</sup> I. Tvaroska, I. André, J. P. Carver, *J. Mol. Struct. (Theochem)* **469** (1999) 103-114.
- <sup>134</sup> I. Tvaroska, I. André, J. P. Carver, *J. Phys. Chem. B* **103** (1999) 2560-2569.
- <sup>135</sup> I. André, I. Tvaroska, J. P. Carver, *J. Phys. Chem. A* **104** (2000) 4609-4617.
- <sup>136</sup> J. J. Pavelites, J. Gao, P. A. Bash, A. D. Mackerell Jr., *J. Comp. Chem.* **18** (1997) 221-239.
- <sup>137</sup> P. Petrová, J. Koca, A. Imberty, *J. Am. Chem. Soc.* **121** (1999) 5535-5547.
- <sup>138</sup> P. Petrová, J. Koca, A. Imberty, *Molecular Simulation* **24** (2000) 325-340.
- <sup>139</sup> a) K. B. Kim, E. C. Behrman, E. J. Behrman, *Nucleosids Nucleotides* **18** (1999) 1055-1056.  
b) K. B. Kim, E. C. Behrman, C. E. Cttrell, E. J. Behrman, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* (2000) 677-682.
- <sup>140</sup> C. Monteiro, S. Neyret, J. Leforestier, C. Hervé du Penhoat, *Carbohydr. Res.* **329** (2000) 141-155.
- <sup>141</sup> a) M. Sundaralingam, *Jerus. Symp. Quant. Chem. Biochem* **5** (1973) 417-456.  
b) N. Yathindra, M. Sundaralingam, *Biopolymers* **12** (1973) 297-314.
- <sup>142</sup> F. E. Hruska, D. J. Wood, R. J. Mynott, R. H. Sarma, *FEBS Letters* **31** (1973) 153-155.
- <sup>143</sup> K. Bock, J. Ø. Duus, *J. Carbohydr. Chem.* **13** (1994) 513-543.
- <sup>144</sup> I. Tvaroska, T. Bleka, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **47** (1989) 45-119.
- <sup>145</sup> P. Petrová, C. Monteiro, C. Hervé du Penhoat, J. Koca, A. Imberty, *Biopolymers* **58** (2001) 617-635.
- <sup>146</sup> a) J. G. Topliss in "Quantitative Structure-Activity Relationship of Drugs", *Academic Press*, New York (1983).  
b) J. K. Seydel in "QSAR and Strategies in the Design of Bioactive Compounds", *VCH*, Weinheim (1985).
- <sup>147</sup> a) R. Hill, K. Brew, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **43** (1975) 411-490.  
b) K. Nakazawa, K. Furukawa, A. Kobata, H. Narimatsu, *Eur. J. Biochem.* **196** (1991) 363-368.  
c) J.-I. Kawano, T. Oinuma, T. Nakayama, T. Suganuma, *J. Biochem.* **111** (1992) 568-572.

- d) M. M. Weiser, S. Majumdar, J. R. Wilson, R. Luther, *Biochim. Biophys. Acta* **924** (1987) 323-331.
- e) A. Bella, J. S. Whitehead, Y. S. Kim, *Biochem. J.* **167** (1977) 621-628.
- f) M. R. Paquet, S. Narasimhan, H. Schachter, M. A. Moscarello, *J. Biol. Chem.* **259** (1984) 4716-4721.
- g) W. M. Blanken, G. J. M. Hooghwinkel, D. H. van den Eijden, *Eur. J. Biochem.* **127** (1982) 547-552.
- h) Y. Ichikawa, Y. C. Lin, D. P. Dumas, G. J. Shen, E. Garcia-Junceda, M. A. Williams, R. Bayer, C. Ketcham, L. E. Walker, J. C. Paulson, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **114** (1992) 9283-9298.
- i) Y. Kajihara, H. Kodama, T. Endo, H. Hashimoto, *Carbohydr. Res.* **306** (1998) 361-378.
- j) M. M. Palcic, O. P. Srivastava, O. Hindsgaul, *Carbohydr. Res.* **159** (1987) 315-324.
- k) C.-H. Wong, Y. Ichikawa, T. Krach, C. Gautheron, D. Dumas, G. Look, *J. Am. Chem. Soc.* **113** (1991) 8137-8145.
- l) Y. Nishida, T. Wiemann, V. Sinnwell, J. Thiem, *J. Am. Chem. Soc.* **115** (1993) 2536-2537.
- m) T. Wiemann, Y. Nishida, V. Sinnwell, J. Thiem, *J. Org. Chem.* **59** (1994) 6744-6747.
- <sup>148</sup> T. Wiemann, *Dissertation* Universität Hamburg (1992).
- <sup>149</sup> L. J. Berliner, R. D. Robinson, *Biochemistry* **21** (1982) 6340-6343.
- <sup>150</sup> M. M. Palcic, O. Hindsgaul, *Glycobiology* **1** (1991) 205-209.
- <sup>151</sup> T. Uchiyama, O. Hindsgaul, *J. Carbohydr. Chem.* **17** (1998) 1181-1190.
- <sup>152</sup> H. Babad, W. Z. Hassid, *J. Biol. Chem.* **241** (1966) 2672-2678.
- <sup>153</sup> S. Hüsken, *Dissertation* Universität Oldenburg (2001).
  - a) S. 50
  - b) S. 56
- <sup>154</sup> E. T. O'Keeffe, R. L. Hill, E. J. Bell, *Biochemistry* **19** (1980) 4954-4962.
- <sup>155</sup> M. R. Paquet, M. A. Moscarello, *Biochem. J.* **218** (1984) 745-751.
- <sup>156</sup> N. J. Kuhn S. Ward, W. S. Leong, *Eur. J. Biochem.* **195** (1991) 243-250.
- <sup>157</sup> Y. Fujita-Yamaguchi, A. Yoshida, *J. Biol. Chem.* **256** (1981) 2701-2706.
- <sup>158</sup> K. Takase, K. E. Ebner, *J. Biol. Chem.* **256** (1981) 7269-7276.
- <sup>159</sup> I. H. Fraser, S. Mookerjea, *Biochem. J.* **164** (1977) 541-547.
- <sup>160</sup> J. D. Nelson, J. J. Jato-Rogriguez, S. Mookerjea, *Can. J. Biochem.* **52** (1974) 42-50.
- <sup>161</sup> S. Bouchilloux, *Biochim. Biophys. Acta* **569** (1979) 135-144.
- <sup>162</sup> J. T. Powell, K. Brew, *J. Biol. Chem.* **251** (1976) 3645-3652.
- <sup>163</sup> L. Gastinel, C. Cambillau, Y. Bourne, *EMBO J.* **18** (1999) 3546-3557.
- <sup>164</sup> B. Ramakrishnan, P. K. Qasba, *J. Mol. Biol.* **310** (2001) 205-218.
- <sup>165</sup> a) B. S. Khatra, D. G. Herrie, K. Brew, *Eur. J. Biochem.* **44** (1974) 537-560.
  - b) J. E. Bell, T. A. Beyer, R. Hill, *J. Biol. Chem.* **251** (1976) 3003-3013.
- <sup>166</sup> a) J. Skolnick, J. S. Fetrow, A. Kolinski, *Biotechnology* **18** (2000) 283-287.
  - b) L. Jaroszewski, Rychlewski, B. Zhang, A. Godzik, *Prot. Sci.* **6** (1998) 1431-1440.
- <sup>167</sup> M. Rarey, B. Kramer, T. Lengauer, G. Klebe, *J. Mol. Biol.* **261** (1996) 470-489.
- <sup>168</sup> a) C. Meng, B. K. Shoichet, I. D. Kuntz, *J. Comp. Chem.* **13** (1992) 505-524.



- b) S. J. Weiner, P. A. Kollman, D. T. Nguyen, D. A. Case, *J. Comp. Chem.* **7** (1986) 230-252 (1986).
- c) R. M. A. Knegtel, D. M. Bayada, R. A. Engh, W. v.d. Saal, V. J. v. Geerestein, P. D. J. Grootenhuys, *J. Comp.-Aid. Mol. Des.* **13** (1999) 167-183.
- d) M. D. Eldridge, C. W. Murray, T. R. Auton, G. V. Paoliline, R. P. Mee, *J. Comp.-Aid. Mol. Des.* **11** (1997) 425-445.
- e) I. Muegge, Y. C. Martin, *J. Med. Chem.* **42** (1999) 791-804.
- f) G. Jones, P. Willett, R. C. Glen, *J. Mol. Biol.* **245** (1995) 43-53.
- g) G. Jones, P. Willett, R. C. Glen, A. R. Leach, R. Taylor, *J. Mol. Biol.* **267** (1997) 727-748.
- h) M. Rarey, B. Kramer, T. Lengauer, G. Klebe, *J. Mol. Biol.* **261** (1996) 470-489.
- i) M. Rarey, B. Kramer, T. Lengauer, *Bioinformatics* **15** (1999) 243-250.
- j) H.-J. Böhm, *J. Comp.-Aid. Mol. Des.* **8** (1994) 243-256.
- <sup>169</sup> J. Dardemann, *Dissertation* Universität Oldenburg, in Arbeit.
- <sup>170</sup> J. T. Powell, K. Brew, *Eur. J. Biochem.* **48** (1974) 217-228.
- <sup>171</sup> P. Kollman, *Chem. Rev.* **93** (1993) 2395-2417.
- <sup>172</sup> H. M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shidyalov, P.E. Bourne, *Nucl. Acids Res.* **28** (2000) 235-242.
- Proteindatenbank unter:  
<http://www.rcsb.org/pdb/>
- <sup>173</sup> D. Marion, K. Wüthrich, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **113** (1983) 967-974.
- <sup>174</sup> J. E. Heidlas, J. L. Watson, G. M. Whitesides *J. Org. Chem.* **57** (1992) 152-157.
- <sup>175</sup> Y. Nishida, H. Hori, H. Ohrai, H. Meguro, *J. Carbohydr. Chem.* **7** (1988) 239-250.
- <sup>176</sup> Y. Nishida, H. Hori, H. Ohrai, H. Meguro, *J. Carbohydr. Chem.* **7** (1988) 239-250.
- <sup>177</sup> P.-M. L. Robitaille, P. A. Robitaille, G. G. Brown, Jr., G. G. Brown *J. Magn. Reson.* **92** (1991) 73-84.
- <sup>178</sup> P. Vagedes, Diplomarbeit, Universität Oldenburg (1997).
- <sup>179</sup> Gaussian 94: M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, P. M. W. Gill, B. G. Johnson, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, T. A. Keith, G. A. Petersson, J. A. Montgomery, K. Raghavachari, M. A. Al-Laham, V. G. Zakrzewski, J. V. Ortiz, J. B. Foresman, C. Y. Peng, P. Y. Ayala, M. W. Wong, J. L. Andres, E. S. Replogle, R. Gomperts, R. L. Martin, D. J. Fox, J. S. Binkley, D. J. Defrees, J. Baker, J. P. Stewart, M. Head-Gordon, C. Gonzalez, J. A. Pople, Gaussian Inc., Pittsburgh PAs (1995).

- <sup>180</sup> Gaussian 98: M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, V. G. Zakrzewski, J. A. Montgomery, R. E. Stratmann, J. C. Burant, S. Dapprich, J. M. Millam, A. D. Daniels, K. N. Kudin, M. C. Strain, O. Farkas, J. Tomasi, V. Barone, M. Cossi, R. Cammi, B. Mennucci, C. Pomelli, C. Adamo, S. Clifford, J. Ochterski, G. A. Petersson, P. Y. Ayala, Q. Cui, K. Morokuma, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. Cioslowski, J. V. Ortiz, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. Gomperts, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, C. Gonzalez, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. G. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, J. L. Andres, M. Head-Gordon, E. S. Replogle, J. A. Pople, Gaussian, Inc., Pittsburgh, PA (1998).
- <sup>181</sup> C. Peng, P. Y. Ayala, H. B. Schlegel, M. J. Frisch, *J. Comp. Chem.* **17** (1996) 49-56.
- <sup>182</sup> MOPAC 6.0: J. J. P. Stewart, QCPE 445 (1990).
- <sup>183</sup> a) AMBER 5.0: D. A. Case, D. A. Pearlman, J. W. Caldwell, T. E. Cheatham III, W. S. Ross, C. L. Simmerling, T. A. Darden, K. M. Merz, R. V. Stanton, A. L. Cheng, J. J. Vincent, M. Crowley, D. M. Ferguson, R. J. Radmer, G. L. Seibel, U. C. Singh, P. K. Weiner, P. A. Kollman (1997), University of California, San Francisco.  
b) D. A. Pearlman, D. A. Case, J. W. Caldwell, W. S. Ross, T. E. Cheatham III, S. DeBolt, D. Ferguson, G. Seibel, P. Kollman, *Comp. Phys. Commun.* **91** (1995) 1-41.
- <sup>184</sup> a) D. F. Shanno, K. H. Phua, *ACM Trans. On Mathematical Software.* **6** (1980) 618-622.  
b) S. J. Watowich, E. S. Meyer, R. Hagstrom, R. Josephs, *J. Comp. Chem.* **9** (1988) 650-661.
- <sup>185</sup> ROAR 1.0: A. Cheng, R. S. Stanton, J. J. Vincent, K. V. Damodaran, S. L. Dixon, D. S. Hartsough, M. Mori, S. A. Best, K. M. Merz Jr., The Pennsylvania State University (1997).
- <sup>186</sup> MOPAC 7.0: J. J. P. Stewart QCPE 445 (1993).
- <sup>187</sup> R. Stuike-Prill, B. Meyer, *Eur. J. Biochem.* **194** (1990) 903-919.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

|              |                  |
|--------------|------------------|
| Name         | Andreas Willecke |
| Geburtsdatum | 9. Mai 1969      |
| Nationalität | deutsch          |

## Schulbildung

|                 |                                          |
|-----------------|------------------------------------------|
| 8/1975 – 6/1979 | Grundschule Delmenhorst                  |
| 8/1979 – 6/1981 | Orientierungsstufe Delmenhorst           |
| 8/1981 – 6/1988 | Gymnasium Delmenhorst, Abschluss: Abitur |

## Wehrdienst

|                 |                                                        |
|-----------------|--------------------------------------------------------|
| 7/1988 – 9/1989 | Allgemeiner Grundwehrdienst in Faßberg und Delmenhorst |
|-----------------|--------------------------------------------------------|

## Studium

|                  |                                                                                   |
|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| 10/1989 – 9/1997 | Studium der Chemie, Universität Oldenburg                                         |
| 10.2.1994        | Vordiplom                                                                         |
| 16.9.1997        | Hauptdiplom                                                                       |
| 9/1997 – 12/2002 | Promotionsstudium, Universität Oldenburg,<br>Arbeitskreis Prof. Dr. Sabine Köpper |

## Beschäftigung

|                 |                                                                                              |
|-----------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|
| 7/1997 – 6/1998 | Wissenschaftliche Hilfskraft, Universität Oldenburg,<br>Arbeitskreis Prof. Dr. Sabine Köpper |
| 7/2000 – 3/2001 | Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Universität Oldenburg,<br>Arbeitskreis Prof. Dr. Erich Zeeck |

## Stipendien

|                 |                                                                             |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| 6/1997 – 6/1999 | Stipendium des Landes Niedersachsen nach dem<br>Graduiertenförderungsgesetz |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------|

Oldenburg, Oktober 2002



## Veröffentlichungen und Präsentationen

- "Synthesis and Conformational Analysis of Modified Sugar Nucleotides and Nucleosides" A. Braams, S. Hüsken, A. Willecke, S. Köpper, 1<sup>st</sup> German-East European Carbohydrate Workshop (1997), Vortrag.
- "Conformational Analysis of Nucleotide Sugars" A. Willecke, S. Köpper, 20th International Carbohydrate Symposium (2000), Poster.
- "Highly Diastereoselective Hydrophosphonylation of Cyclic Imines using BINOL as Source of Chirality" I. Schlemminger, A. Lützen, A. Willecke, W. Maison, R. Koch, W. Saak, J. Martens, *Tetrahedron* **41** (2000) 7285-7288.
- "Diastereoselective Lewis acid mediated hydrophosphonylation of heterocyclic imines: a stereo selective approach towards  $\alpha$ -amino phosphonates" I. Schlemminger, A. Willecke, W. Maison, R. Koch, A. Lützen, J. Martens, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* (2001) 2804-2816.
- "Conformational Analysis of UDP-Glc and UDP-Gal Applying NMR Spectroscopical Methods Combined with Restraint MD Simulations " A. Willecke, S. Köpper, *J. Comp. Chem.*, in Vorbereitung.
- "The Ensemble of Conformational States of 2'-Deoxy Uridine, 3'-Deoxy Uridine, and 2',3'-Dideoxy Uridine as Determined by NMR and Molecular Dynamics Simulations" A. Willecke, A. Braams, B. Meyer, S. Köpper, *J. Comp. Chem.*, in Vorbereitung



**Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Andreas Willecke

Oldenburg, 17.10.2002