

einer weiteren Modifikation von **1**. Darüber hinaus wandelt sich die rote Phase bei tiefer Temperatur langsam in eine gelbe um. Untersuchungen zu den Phasenverhältnissen sind deshalb ebenso im Gang wie Bemühungen, den Verlauf der Bildungsreaktion von **1** aufzuklären.

Experimentelles

catena-Poly{[tetrakis(μ-trifluoracetato-κO,κO')dibismut(Bi-Bi)]-μ-η⁶-hexamethylbenzol} **1:** Ein Gemisch aus 0.010 g (0.18 mmol) Bi(O₂CCF₃)₃^[3b] und 0.020 g (0.12 mmol) frisch sublimiertem Hexamethylbenzol wird in einer Duran-Glasampulle in einem Aluminiumblockofen auf 100 °C erhitzt. Zunächst in Form hellgelber Plättchen an der Glaswand wachsendes Bi(O₂CCF₃)₃·0.5C₁₂H₁₈ verschwindet in mehreren Wochen, während dunkelrote, nadelige Kristalle von **1** wachsen (isoliert 0.019 g, 20.5%; es verbleibt ein gelblichgrauer Rückstand). Elementaranalyse ($M_r = 1032.30$): ber. (gef.): C 23.1 (22.1), H 1.7 (1.8)%; MS (EI, 70 eV, 1.0 mA, T(Ionenquelle)=220 °C): m/z (%): 870 (9) [$(\text{I}-\text{C}_{12}\text{H}_{18})^+$], 757 (24) [$(\text{Bi}_2(\text{O}_2\text{CCF}_3)_3)^+$], 644 (7) [$(\text{Bi}_2(\text{O}_2\text{CCF}_3)_2)^+$], 531 (6) [$(\text{Bi}_2(\text{O}_2\text{CCF}_3)_1)^+$], 435 (8) [$(\text{Bi}(\text{O}_2\text{CCF}_3)_2)^+$], 418 (6) [Bi_2^+], 322 (19) [$(\text{BiO}_2\text{CCF}_3)^+$], 209 (50) [Bi⁺], 162 (57) [C₁₂H₁₈⁺], 147 (100) [C₁₁H₁₅⁺].

Eingegangen am 22. Juni 1998 [Z12017]

Stichwörter: Arenkomplexe · Bismut · Carboxylatkomplexe · Metall-Metall-Wechselwirkungen · Stapelwechselwirkungen

- [1] a) F. A. Cotton, R. A. Walton, *Multiple Bonds Between Metal Atoms*, 2. Aufl., University Press, Oxford, 1992; b) F. A. Cotton, R. A. Walton, *Struct. Bonding* **1985**, 62, 1; c) F. A. Cotton, M. H. Chisholm, *Chem. Eng. News* **1982**, 60, 40; d) F. A. Cotton, *Chem. Soc. Rev.* **1983**, 12, 35; e) M. H. Chisholm, I. P. Rothwell, *Progr. Inorg. Chem.* **1982**, 29, 1.
- [2] a) H. Binder, B. Breollochs, B. Frei, A. Simon, B. Hettich, *Chem. Ber.* **1989**, 122, 1049; b) W. Uhl, I. Hahn, H. Reuter, *Chem. Ber.* **1996**, 129, 1425; c) S. Adams, M. Dräger, B. Mathiasch, *J. Organomet. Chem.* **1987**, 326, 186.
- [3] a) P. V. Radheshwar, R. Dev, G. H. Cady, *J. Inorg. Nucl. Chem.* **1972**, 34, 3913. b) G. J. Reiß, W. Frank, J. Schneider, *Main Group Metal Chem.* **1995**, 18, 287.
- [4] C₂₀H₁₈Bi₂F₁₂O₈, $M_r = 1032.30$; Kristallabmessungen: 0.02 × 0.02 × 0.1 mm³, monoklin, Raumgruppe C2/m, $a = 19.963(4)$, $b = 9.053(2)$, $c = 9.040(2)$ Å, $\beta = 109.22(3)$ °, $Z = 2$, $V = 1542.7(6)$ Å³, $\rho_{\text{ber.}} = 2.222$ Mg m⁻³, $T = -10 \pm 1$ °C, $2\theta_{\text{max}} = 52.1$ °, STOE-IPDS, Mo_{Kα}-Strahlung ($\lambda = 0.71073$ Å), 5558 gemessene, 1397 unabhängige und 1321 beobachtete Reflexe mit $I > 2\sigma(I)$, LP-Korrektur ($\mu = 11.50$ mm⁻¹), Patterson-Methode und ΔF -Synthese, Minimierung von $\Sigma w(F_o^2 - F_c^2)$ mit $w = 1/[\sigma^2(F_o^2) + (0.0599 P)^2]$, $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$, 114 verfeinerte Parameter, $R_1 = 0.0367$, $wR_2 = 0.0850$; max./min. Restelektronendichte +1.18/-1.37 e Å⁻³. Die kristallographischen Daten (ohne Struktur faktoren) der in dieser Veröffentlichung beschriebenen Struktur wurden als „supplementary publication no. CCDC-102011“ beim Cambridge Crystallographic Data Centre hinterlegt. Kopien der Daten können kostenlos bei folgender Adresse in Großbritannien angefordert werden: CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ (Fax: (+44) 1223-336-033; E-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk)
- [5] Die Abbildungen in dieser Arbeit wurden auf Basis von ORTEX-Bildern (P. McArdle, *J. Appl. Cryst.* **1995**, 28, 65) mit den Programmen RASTEP und RENDER (E. A. Merrit, D. J. Bacon, *Meth. Enzymol.* **1997**, 277, 505) erstellt.
- [6] a) A. Schier, J. M. Wallis, G. Müller, H. Schmidbaur, *Angew. Chem. 1986*, 98, 742; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1986**, 25, 757; b) W. Frank, J. Weber, E. Fuchs, *Angew. Chem.* **1987**, 99, 68; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1987**, 26, 74.
- [7] a) O. Mundt, G. Becker, M. Rössler, C. Witthauer, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **1983**, 506, 42; b) A. J. Ashe, III, J. W. Kampf, D. B. Puranik, A. M. Al-Tawee, *Organometallics* **1992**, 11, 2743; c) F. Calderazzo, A. Morillo, G. Pelizzi, R. Poli, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1983**, 507;

- d) F. Calderazzo, R. Poli, G. Pelizzi, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1984**, 2365; e) K. H. Whitmire, J. M. Cassidy, *Acta Crystallogr. Sect. C* **1992**, 48, 917.
- [8] N. Tokitoh, Y. Arai, R. Okazaki, *Science* **1997**, 277, 78.
- [9] W. Frank, G. J. Reiß, J. Schneider, *Angew. Chem.* **1995**, 107, 2572; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 2416.

Kooperative Wasserstoffbrückenbindungen und Enzymkatalyse**

Hong Guo* und Dennis R. Salahub*

Das Verständnis der strukturellen Grundlagen für die Stabilisierung von Übergangszuständen in enzymkatalysierten Reaktionen ist von großer Bedeutung, denn es würde bei der Verbesserung von bekannten und der Entwicklung von neuen Enzymen helfen.^[1, 2] Wichtige Merkmale der aktiven Zentren von Enzymen wurden durch hochauflösende Röntgenstrukturanalysen bestimmt.^[3, 4] Die Identifizierung der für die Katalyse entscheidenden Faktoren erwies sich wegen der Komplexität der Wechselwirkungen, die die zugrundeliegenden Mechanismen verschleiern, als schwierig.^[5, 6] Dies ist z.B. der Fall bei der Stabilisierung eines Übergangszustands unter Beteiligung von α -Helices. Obwohl die Fähigkeit der Helices, negativ geladene Zwischenprodukte und Übergangszustände zu stabilisieren, bekannt ist,^[2, 3, 7] ist die Ursache für diese Ladungsstabilisierung noch ungeklärt.^[3, 5]

Wir berichten hier über Ergebnisse von Dichtefunktionalrechnungen, nach denen ein starker kooperativer Effekt durch die Wechselwirkung eines Anions mit einem Netz aus Peptid-Wasserstoffbrückenbindungen direkt oder über einen Imidazolyl(Im)-Rest induziert wird. Den Hauptbeitrag zu dieser Kooperativität liefern nichtadditive Mehrkörpereffekte, die sich nicht durch die Paarwechselwirkungen des geladenen Liganden mit den beteiligten Peptideinheiten beschreiben lassen und die im engen Zusammenhang mit dem Netz aus Wasserstoffbrückenbindungen stehen. Die Zunahme dieses kooperativen Effekts beim Übergang vom neutralen zum negativ geladenen Liganden ist groß genug, um einen wichtigen Beitrag zur Katalyse leisten zu können, indem die Bildung der Ladung während der enzymkatalysierten Reaktion stabilisiert wird. Der hier vorgeschlagene Mechanismus beruht auf dieser Verstärkung kooperativer Wasserstoffbrückenbindungen und liefert eine plausible Interpretation sowohl für das häufige Auftreten von Helices in den aktiven Zentren von Enzymen^[3] und Phosphat- sowie

[*] Dr. H. Guo, Prof. D. R. Salahub
Centre de Recherche en Calcul Appliqué
5160, boul. Décarie, bureau 400, Montréal, Québec, H3X 2H9 (Kanada)
und
Département de chimie, Université de Montréal
C.P. 6128 Succursale centre-ville, Montréal, Québec, H3C 3J7 (Kanada)
Fax: (+1) 514-343-2468
E-mail: Dennis.Salahub@Umontreal.ca

[**] Diese Arbeit wurde von Biosym Technologies und vom Astra Research Centre, Montreal, unterstützt.

Sulfatbindungsstellen^[7] als auch für das Fehlen von Helices in einigen Fällen.^[8–11]

Obwohl ein kooperativer Effekt bei Peptid-Imidazol-Wasserstoffbrückenbindungen bekannt ist^[12] und differentielle Kooperativitäten zur Interpretation anderer Phänomene vorgeschlagen worden sind,^[12b] sind eine so große π -Kooperativität und Mehrkörpereffekte sowie ihre Rolle in der Enzymkatalyse bisher noch nicht diskutiert worden. Die Ergebnisse quantenmechanischer Rechnungen sprechen außerdem dafür, daß Helices mit einer Verzerrung^[13] vom α_N -Typ am N-Terminus sogar noch wirksamer bei der Ladungsstabilisierung sein können. Der Zusammenhang zwischen kooperativer Wasserstoffbrückenbindung und starken Wasserstoffbrückenbindungen^[4] in der Enzymkatalyse wurde ebenfalls diskutiert. Als „stark“ bezeichnen wir hier Wasserstoffbrückenbindungen mit einer Bindungsenergie von 12–24 kcal mol⁻¹, die sich durch ein Doppelminimumpotential mit niedriger Barriere auszeichnen (low-barrier hydrogen bonds).

In Abbildung 1 a sind die hier verwendeten Modellsysteme für Peptid-Wasserstoffbrückennetze gezeigt. Dazu gehören über Wasserstoffbrückenbindungen zusammengehaltene *N*-Methylformamidoligomere ($\text{NMF} \cdots (\text{NMF})_n$, $n = 1–4$) und $\text{NMF}\cdots\text{GDA}$ -Komplexe ($\text{NMF} \cdots (\text{GDA})_n$, $n = 2, 3$), wobei GDA für ein Glycindipeptidanalogon steht.^[14] Wir verwenden ebenfalls $\text{Im} \cdots (\text{NMF})_n$ -Komplexe, bei denen das „N-terminale“ NMF in $\text{NMF} \cdots (\text{NMF})_n$ durch Imidazol ersetzt worden ist.

Betrachten wir den in Abbildung 1 b dargestellten Austauschprozeß, bei dem ein neutraler oder anionischer Ligand (L) von der NMF - oder Im -Bindungsstelle zur Bindungsstelle in einem entsprechenden System mit einem oder mehreren Peptid-Wasserstoffbrückennetz(en) wandert. Die Energieänderungen für diese Prozesse werden als die kooperativen Effekte ($\Delta\Delta E_n$)^[15] bezeichnet, die durch die Ligandenbindung an Systeme mit einem Wasserstoffbrückennetz induziert werden. Die Wirksamkeit der Peptid-Wasserstoffbrückennetze, kooperative Effekte hervorzurufen, wird mit denen verglichen, die durch zwei stabile Wasserhexamere oder -oktamere induziert werden ($\text{NMF} \cdots 2(\text{H}_2\text{O})_6$ und $\text{NMF} \cdots 2(\text{H}_2\text{O})_8$; siehe Abb. 2 c).

Die Kugel-Stab-Darstellungen einiger Systeme sind in Abbildung 2 gezeigt. Unterschiedliche Verfahren können für die Bewertung des kooperativen Effekts verwendet werden: Die Strukturen aller an dem Prozeß beteiligten Systeme können optimiert werden und die Energien bei diesen optimierten Geometrien können dann zur Bestimmung des $\Delta\Delta E$ -Werts verwendet werden. Alternativ kann man einige Systemen bestimmte strukturelle Zwänge auferlegen. In dieser Arbeit werden zwei Typen solcher Einschränkungen zusätzlich zu den Geometrieeoptimierungen betrachtet. Beim Typ A werden die Einschränkungen nur für Systeme mit einem Liganden angewendet (z. B. L $\cdots \text{NMF}$ und L $\cdots \text{NMF} \cdots (\text{GDA})_n$). Dabei wird die Geometrieeoptimierung für den Liganden und die mit dem Liganden wechselwirkende N-H-Bindung durchgeführt, während die restlichen Strukturparameter auf die Werte festgelegt werden, die bei entsprechenden Systemen ohne den Liganden ermittelt wurden (z. B. NMF und $\text{NMF} \cdots (\text{GDA})_n$). Beim Typ B werden die Einschränkungen auf Systeme ohne einen Liganden (z. B. NMF und $\text{NMF} \cdots (\text{GDA})_n$) angewendet, für die nur Einzelpunkt-

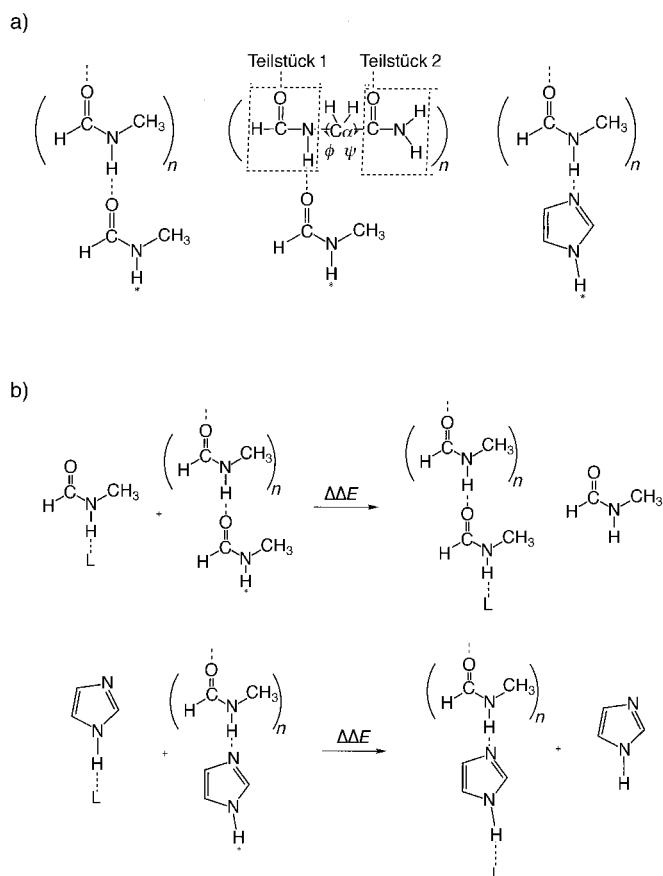


Abb. 1. a) Modellsysteme für die hier beschriebenen Peptid-Wasserstoffbrückennetze. Der Stern bezeichnet die Bindungsstelle. Von links nach rechts: $\text{NMF} \cdots (\text{NMF})_n$, $\text{NMF} \cdots (\text{GDA})_n$ und $\text{Im} \cdots (\text{NMF})_n$. ($\text{GDA})_n$ enthält zwei wasserstoffgebundene Peptidfragmente, Teilstück 1 und 2, die durch die C_α -Kohlenstoffatome getrennt sind. Die Ausgangsstrukturen von $\text{NMF} \cdots (\text{GDA})_n$ für Geometrieeoptimierungen wurden aus GDAs mit $(\varphi, \psi) = (-60, -50^\circ)$ aufgebaut. Die endgültigen Winkel φ und ψ für $\text{NMF} \cdots (\text{GDA})_n$ sind (ausgehend von dem dem NMF am nächsten liegenden GDA): für $n=2$ $(\varphi_1, \psi_1)=(-83, -20^\circ)$ und $(\varphi_2, \psi_2)=(-120, 14^\circ)$; für $n=3$ $(\varphi_1, \psi_1)=(-80, -24^\circ)$, $(\varphi_2, \psi_2)=(-80, -24^\circ)$ und $(\varphi_3, \psi_3)=(-115, 10^\circ)$. Die Winkel φ und ψ für $\text{NMF} \cdots (\text{GDA}-2\text{H}_2\text{O}) \cdots \text{GDA}$ (siehe Text) sind: $(\varphi_1, \psi_1)=(-86, -16^\circ)$ und $(\varphi_2, \psi_2)=(-117, 15^\circ)$. Die Geometrieeoptimierungen von $\text{NMF} \cdots (\text{GDA})_n$ führen zu stabilen Konformationen, in denen die Carbonylgruppe der NMF -Einheit nur eine Wasserstoffbrückenbindung zur terminalen NH-Gruppe von Teilstück 1 von $(\text{GDA})_n$ bildet. b) Die zur Bestimmung der kooperativen Effekte verwendeten Prozesse ($\Delta\Delta E_n$). In der Literatur werden verschiedene Definitionen für Kooperativität verwendet; der hier definierte kooperative Effekt enthält zusätzlich zu den Mehrkörperbeiträgen die Wechselwirkungen zweier nicht benachbarter Einheiten. Oben: $\text{NMF} \cdots (\text{NMF})_n$ ist beteiligt. Unten: $\text{Im} \cdots (\text{NMF})_n$ ist beteiligt. Der Prozeß mit beteiligtem $\text{NMF} \cdots (\text{GDA})_n$, $\text{NMF} \cdots 2(\text{H}_2\text{O})_6$ und $\text{NMF} \cdots 2(\text{H}_2\text{O})_8$ (nicht dargestellt) ist ähnlich.

Berechnungen mit Strukturen, die bei entsprechenden Systemen mit den Liganden ermittelt wurden (z. B. L $\cdots \text{NMF}$ und L $\cdots \text{NMF} \cdots (\text{GDA})_n$), durchgeführt wurden.

Die $\Delta\Delta E_n$ -Werte sind Tabelle 1 zu entnehmen. Die Dichte-funktionalrechnungen^[16] wurden auf drei Niveaus durchgeführt (BP/DZVP, BP/6-311G** und BP/6-311G**/BP/DZVP). Aufgeführt sind hier aber nur die BP/DZVP-Werte, weil die berechneten $\Delta\Delta E_n$ -Werte nicht sehr vom verwendeten Basissatz abhängen. Wie aus Tabelle 1 ersichtlich, beträgt $\Delta\Delta E_n$ für neutrale Liganden nur etwa –1 bis –2 kcal mol⁻¹,

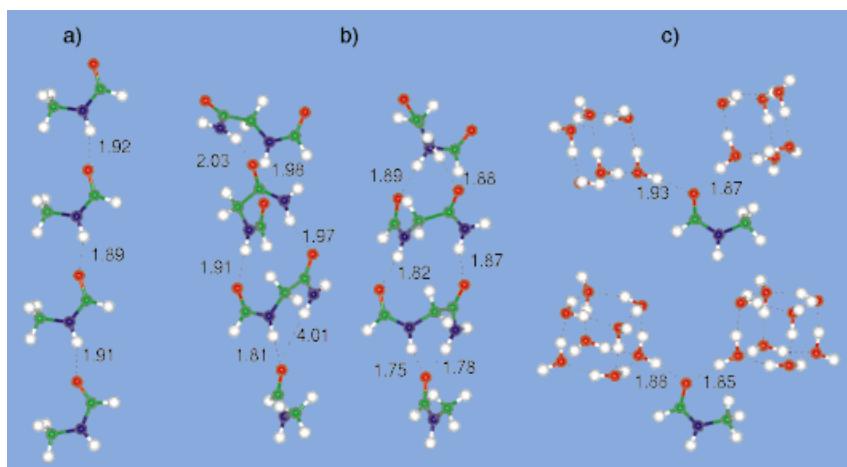


Abb. 2. Kugel-Stab-Modelle für einige der Systeme. Wasserstoffbrückenbindungen sind durch gestrichelte Linien dargestellt. a) NMF ··· (NMF)₃; b) NMF ··· (GDA)₃. Links: vollständig optimierte Struktur. Rechts: Struktur mit den Typ-B-Einschränkungen. c) NMF ··· 2(H₂O)_{2n}. Oben: NMF ··· 2(H₂O)₆. Unten: NMF ··· 2(H₂O)₈.

Tabelle 1. Kooperative Effekte [kcal mol⁻¹], induziert durch Wechselwirkungen von Liganden mit Wasserstoffbrückennetzen.^[a]

Wasserstoffbrücken-bindungsnetz	Ligand (L)	$\Delta\Delta E_n$			
		$n=1$	$n=2$	$n=3$	$n=4$
NMF ··· (NMF) _n	H ₂ O	-1.1	-1.7	-1.8	-1.9
	HCO ₂ H	-1.3			
	Im	-1.8			
	HCO ₂ ⁻	-9.9	-13.8	-15.9	-17.2
	Im ⁻	-9.2			
	CH ₃ S ⁻	-9.0			
	H ₂ PO ₄ ⁻	-8.2			
	2H ₂ O ··· HCO ₂ ⁻	-7.6	-10.7	-12.4	
	H ₂ O ··· H ₂ O ···	-6.8		-12.1	
	HCO ₂ ⁻				
NMF ··· (NMF) _n ^[b]	HCO ₂ ⁻	-8.6	-12.7	-14.4	
NMF ··· (NMF) _n ^[c]	HCO ₂ ⁻	-11.7	-16.9	-19.1	
NMF ··· (GDA) _n	HCO ₂ ⁻		-22.4	-26.4	
NMF ··· (GDA) _n ^[b]	HCO ₂ ⁻		-16.4	-20.3	
NMF ··· (GDA) _n ^[c]	HCO ₂ ⁻		-29.2	-35.1	
NMF ··· (GDA) 2H ₂ O ··· GDA ^[b]	HCO ₂ ⁻		-16.4		
Im ··· (NMF) _n	H ₂ O	-1.1	-1.6		
	HCO ₂ ⁻	-10.1	-15.0		
	2H ₂ O ··· HCO ₂ ⁻	-7.7	-11.7		
NMF ··· 2(H ₂ O) _{2n}	HCO ₂ ⁻		-16.3	-15.1	

[a] BP/DZVP-Werte. Wenn nicht anders angegeben, wurden vollständige Geometrieeoptimierungen durchgeführt. In den meisten Fällen mit beteiligtem Formiat wechselwirkt eines der *anti* zur C-H-Bindung gelegenen Orbitale mit NMF oder Im; die einzige Ausnahme ist der Fall mit beteiligtem H₂O ··· H₂O ··· HCO₂⁻, bei dem eines der die C-H-Bindung übergreifenden Orbitale verwendet wurde. Bei 2H₂O ··· HCO₂⁻ wechselwirken je zwei Wassermoleküle mit den beiden die C-H-Bindung übergreifenden Orbitalen des Formiations. Bei H₂O ··· H₂O ··· HCO₂⁻ liefert ein Wassermolekül zwei Wasserstoffbrückenbindungen zu den beiden *anti* zur C-H-Bindung stehenden Orbitalen, und ein weiteres Wassermolekül liefert eine Wasserstoffbrückenbindung zu einem der Orbitale, die die C-H-Bindung überragen.

[b] Typ-A-Einschränkungen (siehe Text). [c] Typ-B-Einschränkungen.

im Einklang mit früheren theoretischen und experimentellen Ergebnissen.^[12] Im Unterschied dazu sind die kooperativen Effekte sehr viel größer (-7 bis -35 kcal mol⁻¹), wenn negativ geladene Gruppen beteiligt sind, und hängen kaum von der Art des beteiligten Anions ab. Es besteht also eine große Zunahme von $\Delta\Delta E_n$ beim Übergang von neutralen zu

anionischen Liganden. Lösungsmittelmoleküle am Formiation verringern den $\Delta\Delta E_n$ -Wert nur um ungefähr $2-4$ kcal mol⁻¹. $\Delta\Delta E_n$ nimmt mit steigender Größe des Systems (n) zu. Ersetzt man das mit den Anionen wechselwirkende NMF durch Im, so erhält man ähnliche Ergebnisse. Einen starken kooperativen Effekt gibt es auch, wenn NMF durch CH₃OH ersetzt wird. Wir werden solche Wasserstoffbrückennetze mit der Im- und/oder Hydroxy-Erweiterung erweiterte Peptid-Wasserstoffbrückennetze nennen. $\Delta\Delta E$ wird kaum beeinflusst, wenn zwei Wassermoleküle an den beiden Carbonylgruppen der ersten GDA-Einheit (NMF ··· (GDA)-2w ··· GDA) eingeführt werden.

Die $\Delta\Delta E_n$ -Werte, die mit Einschränkungen vom Typ B erhalten werden, sind größer als die mit den Einschränkungen vom Typ A oder mit vollständigen Geometrieeoptimierungen erhaltenen, weil die Systeme der Wasserstoffbrückennetze für das Anion besser angepaßt sind. Vor allem ist dies bei Prozessen mit beteiligtem NMF ··· (GDA)_n der Fall, bei denen die mit Einschränkungen vom Typ B erhaltenen kooperativen Effekte etwa $7-15$ kcal mol⁻¹ ausmachen (nur $2-5$ kcal mol⁻¹ bei beteiligtem NMF ··· (NMF)_n), also beträchtlich größer sind.

Wie aus Abbildung 2b ersichtlich ist, besteht der wesentliche strukturelle Unterschied für NMF ··· (GDA)_n darin, daß mit den Einschränkungen vom Typ B das NMF-Molekül mit den NH-Gruppen des nächstgelegenen GDA wechselwirkt, während es in der optimierten Struktur lediglich eine Wasserstoffbrückenbindung zur NH-Gruppe vom Teilstück 1 bildet. Demnach haben die Anwesenheit von HCO₂⁻ und die Geometrieeoptimierung zur Folge, daß das NMF-Molekül mit der zweiten NH-Gruppe vom Teilstück 2 wechselwirkt. Um die Bildung der zweiten Wasserstoffbrückenbindung mit NMF vorwegzunehmen, finden bei (GDA)_n deutliche Strukturveränderungen statt. Derartige Änderungen sind unter energetischen Aspekten nicht wünschenswert, da die Energien von NMF ··· (GDA)_n sogar dann zunehmen, wenn man die ausgleichende Wirkung berücksichtigt, die sich aus der Bildung einer zweiten Wasserstoffbrückenbindung mit dem Teilstück 2 ergibt. Somit sind die höheren $\Delta\Delta E$ -Werte auf geometrische Relaxation zurückzuführen. Diese ermöglicht die Bildung von zwei Peptid-Wasserstoffbrückennetzen, die mit NMF verbunden sind, wobei beide in der Lage sind, den kooperativen Effekt zu induzieren. Die Bedeutung dieser Feststellung für die Helix-Ladungs-Wechselwirkungen wird weiter unten diskutiert. Wie aus Tabelle 1 ersichtlich ist, sind die beiden Peptid-Wasserstoffbrückennetze von (GDA)_n sehr viel wirksamer bei der Induzierung des kooperativen Effekts als die beiden Wassercluster; die $\Delta\Delta E$ -Werte sind um $6-10$ kcal mol⁻¹ größer als die mit zwei (H₂O)₆ oder (H₂O)₈ erhaltenen.

Die Energien für die Paarwechselwirkung von HCO_3^- mit dem nicht benachbarten GDA oder mit Peptideinheiten in einigen Komplexen sind in Tabelle 2 aufgeführt; die Beiträge der Teilstücke werden auch für Prozesse mit beteiligten $\text{NMF} \cdots (\text{GDA})_2$ unter Verwendung von Einschränkungen vom Typ A, z. B. ohne anioneninduzierte strukturelle Relaxation, aufgeführt. Die $\Delta\Delta E$ -Werte der Teilstücke verhalten sich additiv; der mit $(\text{GDA})_2$ erhaltene kooperative Effekt entspricht also nahezu der Summe der Werte für die beiden Teilstücke. Teilstück 1 von $(\text{GDA})_2$ trägt den Hauptanteil ($-12 \text{ kcal mol}^{-1}$) zum gesamten $\Delta\Delta E$ -Wert ($-16.4 \text{ kcal mol}^{-1}$) bei, während der Beitrag vom Teilstück 2 sehr viel geringer ist ($-4.5 \text{ kcal mol}^{-1}$). Tabelle 2 zeigt, daß in fast allen Fällen die Summen der Nichtnachbar-Paarwechselwirkungsenergien sehr viel kleiner als die entsprechenden $\Delta\Delta E$ -Werte sind, mit einer Ausnahme für $\text{NMF} \cdots [(\text{GDA})_2]^{Ts,2}$ (d.h. ohne ein an das Anion gebundenes Peptid-Wasserstoffbrückennetz). Diese Analysen sprechen dafür, daß die nichtadditiven Mehrkörperfekte den Hauptbeitrag zur starken Kooperativität liefern und daß die Existenz von Peptid-Wasserstoffbrückennetzen für einen starken energetischen Effekt sehr wichtig ist.

Unseren Ergebnissen zufolge sollten Peptid- oder erweiterte Peptid-Wasserstoffbrückennetze durch kooperative Wechselwirkungen einen wichtigen Beitrag zur Ladungsstabilisierung liefern. Die großen $\Delta\Delta E$ -Werte werden in der realen Umgebung des Proteins zweifelsohne gedämpft, und sie hängen gewiß vom Mechanismus der enzymkatalysierten Reaktion ab, so daß der exakte Beitrag der Wasserstoffbrückennetze zur Katalyse entsprechend modifiziert werden muß. Die Identifizierung von starken Wechselwirkungen zwischen Anionen und Wasserstoffbrückennetzen als wichtiger Faktor für Enzymstruktur und -funktion ermöglicht uns aber einen detaillierten Einblick in einige Strukturmerkmale in der

Tabelle 2. Paarwechselwirkungsenergien von HCO_3^- mit seinen nicht benachbarten Einheiten sowie Beiträge der Teilstücke von $(\text{GDA})_2$ [$\text{kcal mol}^{-1}[a]$

System	1,3	1,4	1,5	Gesamt	$\Delta\Delta E_n$
$\text{HCO}_3^- \cdots \text{NMF} \cdots (\text{GDA})_2^{[b]}$	-7.6	-2.6	-	-10.2	-22.4
$\text{HCO}_3^- \cdots \text{NMF} \cdots (\text{GDA})_2$	-5.5	-2.1	-	-7.6	-16.4
$\text{HCO}_3^- \cdots \text{NMF} \cdots [(\text{GDA})_2]^{Ts,1}$	-3.7	-1.3	-	-5.0	-12.0
$\text{HCO}_3^- \cdots \text{NMF} \cdots [(\text{GDA})_2]^{Ts,2}$	-2.0	-1.0	-	-3.0	-4.5
$\text{HCO}_3^- \cdots \text{NMF} \cdots (\text{NMF})_2$	-3.9	-1.5	-	-5.4	-12.7
$\text{HCO}_3^- \cdots \text{NMF} \cdots (\text{NMF})_3^{[b]}$	-4.2	-1.6	-0.8	-6.6	-15.9
$\text{HCO}_3^- \cdots \text{NMF} \cdots (\text{NMF})_3$	-3.9	-1.5	-0.8	-6.2	-14.4
$\text{H}_2\text{O} \cdots \text{H}_2\text{O} \cdots \text{HCO}_3^- \cdots \text{NMF} \cdots (\text{NMF})_3^{[b]}$	-2.1	-1.4	-0.7	-4.2	-12.1

[a] Einschränkungen vom Typ A, sofern nicht anders angegeben. $[(\text{GDA})_2]^{Ts,1}$ bedeutet, daß Teilstück 2 des Systems von $\text{NMF} \cdots (\text{GDA})_2$ entfernt wurde (Abb. 1a), wobei die C_6H_5 -Gruppen durch Wasserstoffatome ersetzt wurden. Die Positionen der Wasserstoffatome wurden auf der Grundlage von Energie minimierungen optimiert, während die übrigen Strukturparameter unverändert gelassen wurden. „Standard-energy-decomposition“-Methoden wurden verwendet, um die Through-space-Paarwechselwirkungen des Anions mit den nicht beachbaren GDAs und Peptideinheiten abzuschätzen. Bei dieser Näherung wurden die Energien des Liganden (L) und jeder seiner nicht benachbarten Einheiten in ihren relaxierten Strukturen bestimmt, wie man sie in $\text{HCO}_3^- \cdots \text{NMF} \cdots (\text{NMF})_n$, $\text{HCO}_3^- \cdots \text{NMF} \cdots (\text{GDA})_2$ oder $\text{HCO}_3^- \cdots \text{NMF} \cdots [(\text{GDA})_2]^{Ts,1/Ts,2}$ vorfindet. Diese Energien wurden als Bezugsgenerien für die Wechselwirkungen verwendet. Die Wechselwirkungsenergien wurden für jedes Paar von L und seinen nicht benachbarten Einheiten für feste Positionen erhalten, wie man sie in den Komplexen vorfindet. [b] Für diesen Komplex wurde eine vollständige Geometrieeoptimierung durchgeführt. $\text{H}_2\text{O} \cdots \text{H}_2\text{O} \cdots \text{HCO}_3^-$ wurde als eine einzelne Einheit betrachtet.

Nachbarschaft von aktiven Zentren, die während des Fallungsprozesses gebildet werden für Wechselwirkungen mit geladenen Liganden oder Intermediaten. Im folgenden fassen wir experimentelle Ergebnisse zusammen, die auf derart starke Kooperativität zurückgeführt werden können.

α -Helices bieten einen bequemen Weg, um die Peptid-Wasserstoffbrückennetze zu bilden. Mit dem hier vorgeschlagenen Mechanismus kann man erklären, daß isolierte Peptid-Wasserstoffbrückennetze sowohl an aktiven Zentren von Enzymen als auch an Phosphat- und Sulfatbindungsstellen anzutreffen sind, auch wenn keine Helix vorhanden ist. Ein bekannter Fall sind die Serinproteasen, die vermuten lassen, daß das Vorhandensein einer Helix keine notwendige Bedingung für eine Ladungsstabilisierung ist. Beim Subtilisin gibt es eine Helix am aktiven Zentrum, und (in Übereinstimmung mit einer früheren auf dem Helix-Makrodipol basierenden Interpretation^[3]) befindet sich der katalytisch aktive Serin-Rest (S221) am N-Terminus der Helix, wobei dessen Amidgruppe an den Oxyaniontaschenwechselwirkungen beteiligt ist (Abb. 3a).^[17]

Eine solche am aktiven Zentrum gelegene Helix liegt jedoch nicht in Chymotrypsin-ähnlichen Serinproteasen vor. Dieser Unterschied läßt sich verstehen, wenn man die kooperativen Effekte berücksichtigt, die an einem Wasserstoffbrückennetz beteiligt sind. Abbildung 3c zeigt das aktive Zentrum eines tetraedrischen Übergangszustandskomplexes von Chymotrypsin mit einem Peptidyltrifluormethylketon ($\text{Ac}-\text{Phe}-\text{CF}_3$).^[19] Zwei Peptid-Wasserstoffbrückennetze sind mit dem negativ geladenen Sauerstoffatom von $\text{Ac}-\text{Phe}-\text{CF}_3$ verbunden und an den Oxyaniontaschenwechselwirkungen beteiligt. Ebenso existiert ein isoliertes Peptid-Wasserstoffbrückennetz am aktiven Zentrum des 4-Chlorbenzoyl-CoA-Dehalogenase/4-HBA-CoA-Komplexes,^[8] in dem die NH-

Gruppe von F64 mit dem Benzoylrest von 4-HBA-CoA mit der Carbonylgruppe innerhalb derselben Peptid-Wasserstoffbrückenverkettung zur Hauptketten-NH-Gruppe von L27 wechselwirkt (Abb. 3b). Dieses Wasserstoffbrückennetz und dasjenige, das L143 vom Chymotrypsin-Komplex einbezieht, gehören nicht einer bestimmten Helix-, Turn- oder Faltblattstruktur an. Eine statistische Untersuchung^[13] ergab, daß diese Typen von Rückgrat-Wasserstoffbrückenbindungen lediglich 5 % der Hauptketten-zu-Hauptketten-Wasserstoffbrückenbindungen in Proteinen ausmachen. Demnach kann das Auftreten solcher Peptid-Wasserstoffbrückennetze an aktiven Zentren von Enzymen als eher ungewöhnlich betrachtet werden. Diese Daten stützen die Ergebnisse quantenmechanischer Berechnungen, denen zufolge kooperative Wasserstoffbrückennetze (im Unterschied zum Helix-Makrodipol an sich) eine wichtige Rolle bei der Ladungsstabilisierung spielen. Bei isolierten Peptid-Wasserstoffbrückennetzen hat man ebenfalls festgestellt, daß sie mit Phosphat- oder Sulfatresten in phosphat- bzw. sulfatbindenden Proteinen^[10, 11, 18] wechselwirken, und es wurde eine mögliche Beteiligung der Wasserstoffbrückennetze bei der Ladungsstabilisierung vorgeschlagen.^[11]

Triosephosphat-Isomerase (TIM)^[2, 19] ist ein interessantes Beispiel dafür, wie ein Ladungs-, „Relais“ durch

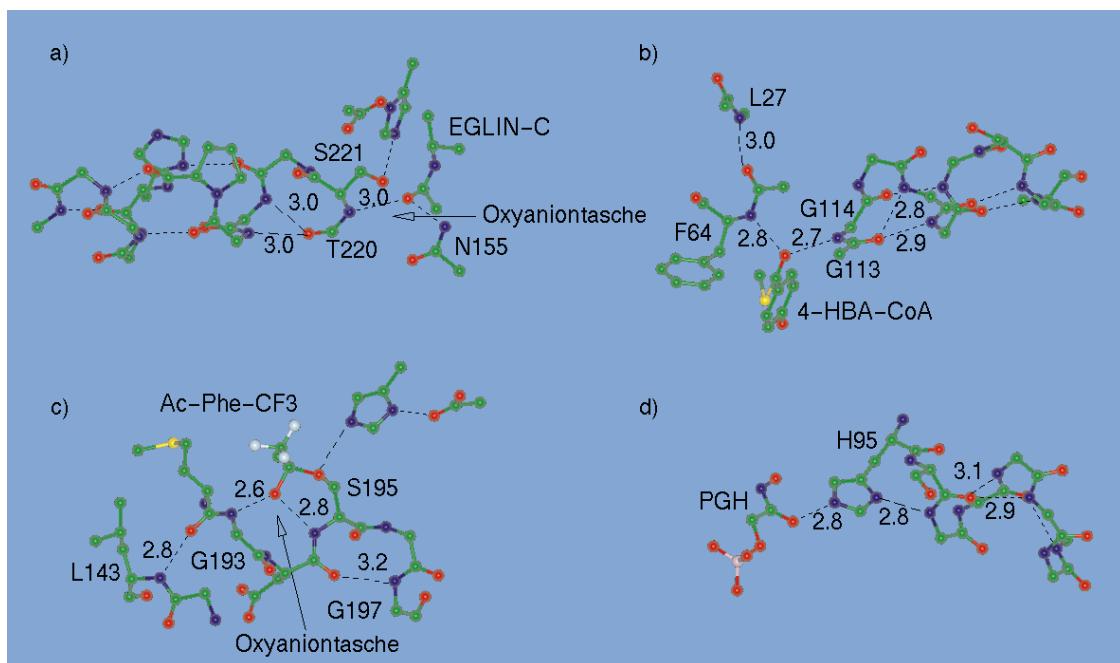


Abb. 3. Beispiele für Peptid-Wasserstoffbrückennetze in aktiven Zentren von Enzymen. Wasserstoffbrückenbindungen sind durch gestrichelte Linien dargestellt. a) Subtilisin Carlsberg, komplexiert mit EGLIN-C.^[17] Die Hauptketten-NH-Gruppe von S221 wechselwirkt mit EGLIN-C, und die Carbonylgruppe von T220 ist an einer verzweigten 1-4- und 1-5-Wasserstoffbrückenbindung in der Helix des aktiven Zentrums beteiligt. b) 4-Hydroxybenzoyl-CoA (4-HBA-CoA), gebunden an 4-Chlorobenzoyl-CoA-Dehalogenase.^[8] Ein isoliertes Peptid-Wasserstoffbrückennetz und eine Helix des aktiven Zentrums wirken bei der Stabilisierung des Übergangszustands mit. Die Hauptketten-NH-Gruppe von G114 wechselwirkt mit 4-HBA-CoA, und die Kohlenstoffgruppe von G113 ist an einer verzweigten 1-4- und 1-5-Wasserstoffbrückenbindung in der Helix beteiligt; am isolierten Peptid-Wasserstoffbrückennetz ist die Peptidbindung zwischen G63 und F64 und die zwischen A26 und L27 beteiligt. c) γ -Chymotrypsin, komplexiert mit Ac-Phe-CF₃.^[9] Zwei isolierte Peptid-Wasserstoffbrückennetze wirken bei der Stabilisierung des Übergangszustands mit. Bei dem einen sind die Peptidbindungen zwischen M192 und G193 und zwischen G142 und L143, bei dem anderen die zwischen D194 und S195 und zwischen G196 und G197 beteiligt. d) Triosephosphat-Isomerase (TIM), komplexiert mit Phosphoglycolohydroxamat (PGH).^[19] Die Hauptketten-NH-Gruppe von E97 bildet eine Wasserstoffbrückenbindung mit H95, und die Kohlenstoffgruppe von S96 ist an verzweigten 1-4- und 1-5-Wasserstoffbrückenbindungen in der Helix des aktiven Zentrums beteiligt.

den kooperativen Effekt unterstützt werden könnte. TIM verwendet statt des viel elektrophileren Imidazolrests einen neutralen Histidinrest (H95) am N-Terminus einer kurzen α -Helix (Abb. 3d), um mit dem Carbonylsauerstoffatom des Substrats zu wechselwirken. Wie schon erwähnt, kann ein neutrales Imidazol an kooperativer Wasserstoffbrückenbindung teilnehmen und so als einfache Erweiterung von einem (mehreren) Peptid-Wasserstoffbrückennetz(en) von der Helix aus fungieren. Diese Erweiterung könnte den kooperativen Effekt verstärken, wie die an den Modellsystemen erhaltenen Ergebnisse vermuten lassen. Darüber hinaus könnte, falls ein (zumindest partieller) Protonentransfer vom Histidinrest zum Zwischenprodukt oder Substrat stattfindet,^[2, 4, 19] die Ladungsbildung an H95 im Gegenzug durch einen stärkeren kooperativen Effekt stabilisiert werden, der durch die Wechselwirkung von H95 mit der Helix induziert wird. Ähnliches lässt sich für die Citralsynthase (CS) diskutieren, bei der das Atom H274 am N-Terminus einer α -Helix eine ähnliche Rolle spielt. Eine solche Strategie könnte ebenfalls bei anderen Enzymen verwendet werden, bei denen kooperative Wasserstoffbrückennetze günstig positioniert sind, um die Ladungsbildung bei einer Reaktion durch eine Verstärkung von kooperativen Wasserstoffbrückenbindungen zu stabilisieren.

Wie bereits besprochen wurde, kann ein größerer kooperativer Effekt induziert werden, wenn die mit einem Anion (NMF in unseren Modellsystemen) wechselwirkende Carbo-

nylgruppe der Peptidbindung an einer verzweigten Wasserstoffbrückenbindung mit den Amidgruppen von zwei Peptid-Einheiten oder Wasserstoffbrückennetzen beteiligt ist. Häufig trifft man am N-Terminus von α -Helices^[13a] auf eine Verzerrung des α_N -Typs, bei der das Carbonylsauerstoffatom vom Rest 1 zwischen die NH-Gruppen der Reste 4 und 5 ausgerichtet ist und somit an einer verzweigten 1-4- und 1-5-Wasserstoffbrückenbindung beteiligt ist. Eine Übersicht^[13a] über die Strukturen von zwölf Proteinen im Kristall zeigt, daß es unter 50 α -Helices 16 Beispiele für α_N -Verzerrung gibt. Den Mechanismus der kooperativen Wasserstoffbrückenbindung zugrundelegend vermuten wir: Die Helices mit der α_N -Verzerrung sind möglicherweise effektiver bei der Ladungsstabilisierung, da zwei der Peptid-Wasserstoffbrückennetze genutzt werden können, um den kooperativen Effekt hervorzurufen. Eine solche Verzerrung ist bei Helices in aktiven Zentren weit verbreitet. Dies ist auch in Abbildung 3 zu sehen; die α_N -Verzerrung ist hier in allen Helices des aktiven Zentrums vorhanden. Die hier vorgeschlagene Hypothese könnte auch das Auftreten von Phosphatgruppen am Ende von 3_{10} -Helices erklären, sogar ohne gut angeordnete Peptid-dipole.^[7a]

Es wurde vorgeschlagen, daß starke Wasserstoffbrückenbindungen eine wichtige Rolle bei der Enzymkatalyse spielen,^[4] aber die hiermit verbundenen energetischen Effekte sind noch nicht ausführlich untersucht worden.^[6] In vielen Fällen, in denen eine starke Wasserstoffbrückenbindung

vermutet wurde, sind tatsächlich kooperative Wasserstoffbrückennetze beteiligt. Dazu gehören TIM, CS und Chymotrypsin, bei denen von H95, H274 und den NH-Gruppen von G193 und S195 angenommen wird, daß sie jeweils starke Wasserstoffbrückenbindungen mit den Zwischenprodukten bilden. Es ist daher möglich, daß die energetische Stabilisierung von den kooperativen Wasserstoffbrückenbindungen stammt und nicht auf starke Wasserstoffbrückenbindungen allein zurückzuführen ist.

Eingegangen am 24. Februar 1998 [Z11513]

Stichwörter: Dichtefunktionalrechnungen • Enzymkatalyse • Kooperative Effekte • Proteinstrukturen • Wasserstoffbrücken

- [1] A. J. Kirby, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 770–790; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 705–724.
- [2] J. R. Knowles, *Nature* **1991**, *350*, 121–125.
- [3] a) W. G. J. Hol, P. T. van Duijnen, H. J. C. Berendsen, *Nature* **1978**, *273*, 443–446; b) W. G. J. Hol, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **1984**, *45*, 149–195.
- [4] a) J. A. Gerlt, P. G. Gassman, *Biochemistry* **1993**, *32*, 11943–11952; b) W. W. Cleland, M. M. Kreevoy, *Science* **1994**, *264*, 1887–1890; c) P. A. Frey, S. A. Whitt, J. B. Tobin, *Science* **1994**, *264*, 1927–1930; d) J. A. Gerlt, M. M. Kreevoy, W. W. Cleland, P. A. Frey, *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 259–267, zit. Lit.
- [5] a) J. Aqvist, H. Luecke, F. A. Quiocio, A. Warshel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 2026–2030; b) B. Tidor, M. Karplus, *Biochemistry* **1991**, *30*, 3217–3228; c) B. Tidor, *Proteins* **1994**, *19*, 310–323.
- [6] a) J. P. Guthrie, *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 163–170, zit. Lit.; b) C. L. Perrin, J. B. Nielson, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1997**, *48*, 511–544, zit. Lit.; c) A. Warshel, A. Papazyan, P. Kollman, *Science* **1995**, *269*, 102–106.
- [7] a) R. R. Copley, G. J. Barton, *J. Mol. Biol.* **1994**, *242*, 321–329; b) P. Chakrabarti, *J. Mol. Biol.* **1993**, *234*, 463–482.
- [8] M. M. Benning, K. L. Taylor, R. Q. Liu, G. Yang, H. Xiang, G. Wessenberg, D. Dunaway-Mariano, H. M. Holden, *Biochemistry* **1996**, *35*, 8103–8109.
- [9] K. Brady, A. Wei, D. Ringe, R. H. Abeles, *Biochemistry* **1990**, *29*, 7600–7607.
- [10] H. Luecke, F. A. Quiocio, *Nature* **1990**, *347*, 402–406.
- [11] F. A. Quiocio, J. S. Sack, W. K. Vyas, *Nature* **1987**, *329*, 561–564.
- [12] a) G. A. Jeffrey, W. Saenger, *Hydrogen bonding in biological structures*, Springer, Berlin, **1991**; b) H. Guo, M. Karplus, *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 7104–7105, zit. Lit.; c) H. Guo, M. Karplus, *J. Phys. Chem.* **1992**, *96*, 7273–7287; d) B. W. Gung, Z. Zhu, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 2189–2192; e) B. W. Gung, Z. Zhu, B. Everingham, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 3436–3437; f) J. E. Del Bene, *J. Chem. Phys.* **1980**, *73*, 3423–3424.
- [13] a) E. N. Baker, R. E. Hubbard, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **1984**, *44*, 97–179; b) D. Stickle, L. G. Presta, K. A. Dill, G. D. Rose, *J. Mol. Biol.* **1992**, *226*, 1143–1159.
- [14] T. Head-Gordon, M. Head-Gordon, M. J. Frisch, C. Brooks III, J. A. Pople, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 5989–5997.
- [15] J. E. H. Koehler, W. Saenger, B. Lesyng, *J. Comput. Chem.* **1987**, *8*, 1090–1098.
- [16] J. W. Andzelm, M. E. Casida, A. Koester, E. Proynov, A. St-Amant, D. R. Salahub, H. Duarte, N. Godbout, J. Guan, C. Jamorski, M. Leboeuf, V. Malkin, O. Malkina, F. Sim, A. Vela, *deMon Software*, Universität Montreal, **1995**.
- [17] W. Bode, E. Papamokos, D. Musil, U. Seemüller, H. Fritz, *EMBO J.* **1986**, *5*, 813–818.
- [18] J. J. He, F. A. Quiocio, *Protein Sci.* **1993**, *2*, 1643–1647.
- [19] R. C. Davenport, P. A. Bash, B. A. Seaton, M. Karplus, M. G. A. Petsko, D. Ringe, *Biochemistry* **1991**, *30*, 5821–5826.

Neue Proteinmimetika: eingeschlossene Faltungseinheiten (*locked-in folds*) am Beispiel des $\beta\beta\alpha$ -Zinkfingermotivs**

Gabriele Tuchscherer,* Christian Lehmann und Marc Mathieu

Professor Murray Goodman zum 70. Geburtstag gewidmet

Als herausragendes Ziel des Neuentwurfs von Proteinen steht die Konstruktion von Mimetika im Mittelpunkt, die strukturelle und funktionelle Eigenschaften nativer Proteine aufweisen.^[1–6] Gleichzeitig ist die Komplexität des Faltungsmechanismus wohl die faszinierendste Herausforderung auf diesem rasch expandierenden Gebiet, denn der detaillierte Faltungsprozeß einer linearen Polypeptidkette in eine einzigartige dreidimensionale Struktur ist auch heute noch wenig verstanden. Um dieses bekannte Proteinfaltungsproblem^[7–9] im Design neuer Proteine zu umgehen, wurde vor einigen Jahren das Konzept der Templat-assoziierten synthetischen Proteine (TASP) entwickelt. Hier dienen topologische Templatmoleküle dazu, die Faltung kovalent fixierter Peptidblöcke in eine vorgegebene Packungsanordnung mit verzweigter Kettenarchitektur zu dirigieren.^[3, 10–12]

Durch wesentliche Fortschritte, insbesondere auf dem Gebiet der Synthesemethoden, eröffnet sich jetzt die Möglichkeit, das Potential des TASP-Konzepts auszuschöpfen. Trennt man konzeptionell Struktur- von Funktionsdomänen in nativen Proteinen, so lassen sich z. B. topologische Templatmoleküle als Strukturgerüste zur Fixierung von Rezeptor-Bindungsschleifen verwenden.^[13] Im folgenden wird die Konstruktion von proteinähnlichen Packungstopologien mit mehrfachverzweigter, oligocyclischer Kettenarchitektur („eingeschlossene Faltungseinheiten“) beschrieben, die eine Weiterentwicklung des TASP-Konzepts zum Neuentwurf von Proteinen bildet. Diese nichtnatürlichen Makromoleküle weisen besondere physikochemische Merkmale und Faltungseigenschaften auf und können als vielseitig verwendbare Gerüststrukturen zur Imitation struktureller und funktioneller Eigenschaften von Proteinen eine bedeutende Rolle spielen.

Wie in Abbildung 1 dargestellt, basiert das angestrebte Strukturmotiv auf den Prinzipien eines molekularen Baukastensystems, bei dem die einzelnen Bausteine wie α -Helices, β -Faltblätter oder Schlaufensequenzen über Templat- oder Spacermoleküle zu kovalent vernetzten, mehrfachverbrückten tertären Faltungseinheiten verknüpft werden. Auf diese Weise werden durch die Bildung kovalenter Bindungen intramolekulare Wechselwirkungen zwischen den sekundärstrukturbildenden Peptidblöcken und damit die Faltung in eine vorgegebene räumliche Struktur erzwungen. Gleichzeitig wird der Konformationsraum der entstandenen Tertiärstrukturen erheblich eingeschränkt. Darüber hinaus sollte so die

[*] Dr. G. Tuchscherer, Dr. C. Lehmann, Dr. M. Mathieu
Institut für Organische Chemie, Universität Lausanne
BCH-Dorigny, CH-1015 Lausanne (Schweiz)
Fax: (+41) 21-692-3955
E-mail: gabriele.tuchscherer@ico.unil.ch

[**] Diese Arbeit wurde vom Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung unterstützt.