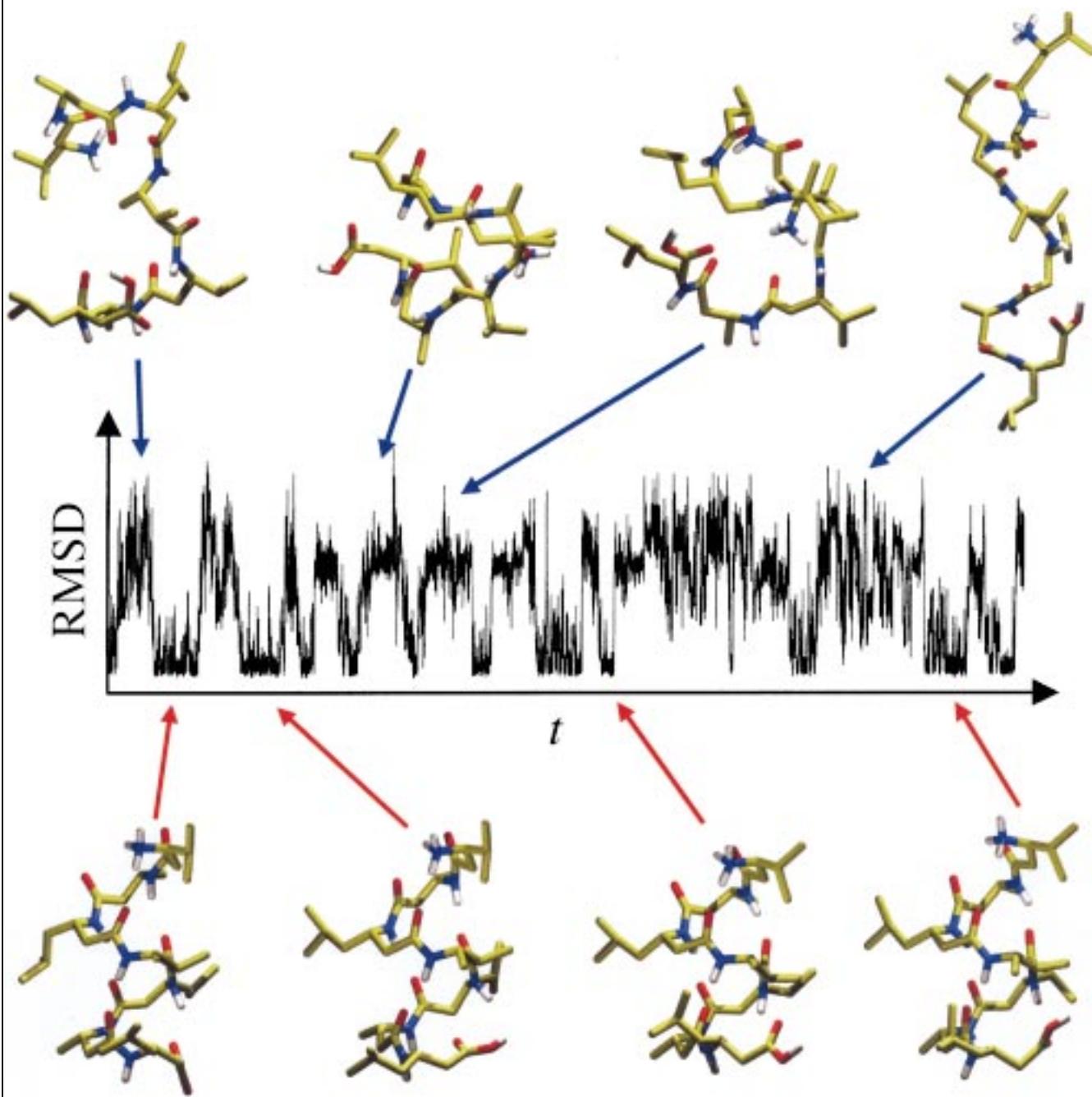


Eine 200 ns lange Simulation der reversiblen Faltung eines β -Aminosäureheptapeptids



Die obere Reihe mit Strukturen zeigt „Schnappschüsse“ verschiedener entfalteter Konformationen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Simulation, die durch (blaue) Pfeile gekennzeichnet sind; die untere Reihe zeigt den gefalteten Zustand (rote Pfeile).

Dessen helicale Konformation wird wiederholt eingenommen, was sich auch am Verlauf der mittleren quadratischen Abweichung („root-mean-square deviation“, RMSD) der Positionen der Hauptkettenatome von der auf NMR-Experimenten basierenden Modellstruktur der gesamten Simulation erkennen lässt.

Mehr dazu auf den folgenden Seiten.

Der Schlüssel zum Verständnis des Proteinfaltungsproblems liegt in der richtigen Beschreibung des denaturierten Zustandes**

Wilfred F. van Gunsteren,* Roland Bürgi,
Christine Peter und Xavier Daura

Die Vorhersage des Faltungsprozesses eines Proteins, d. h. seines stabilsten Konformers, der relativen Stabilität der verschiedenen möglichen Konformationen und der Faltungs-kinetik als Funktion von Temperatur und Lösungsmittelzusammensetzung, ist eine der grundlegenden, langjährigen Herausforderungen der Molekularbiologie.^[1, 2] Wegen der riesigen Ausdehnung des Konformationsraumes eines Proteins einerseits und der vergleichsweise kleinen Energieunterschiede zwischen nativen und denaturierten Konformationen andererseits ist dies immer noch ein ungelöstes Problem.^[3] Nimmt man drei mögliche unterschiedliche Konformationen pro Hauptketten- ϕ - oder - ψ -Winkel pro Aminosäurerest an, dann hat ein Peptid aus zehn Aminosäureresten bereits $3^{20} \cong 10^9$ mögliche Konformationen, ein Protein mit 100 Aminosäureresten ungefähr 10^{90} . Der Konformationsraum, der einem Polypeptid zugänglich ist, wächst exponentiell mit dessen Länge, was keinerlei Hoffnung darauf zulässt, jemals alle möglichen Konformationen durchzutesten. Die Natur probiert jedoch während des Faltungsprozesses auch nicht alle Konformationen aus, sondern beschränkt sich auf eine gewisse Teilmenge, die einen Faltungsweg bildet. Es ist sehr schwierig, wenn nicht sogar unmöglich, diese Faltungswägen experimentell mit atomarer Präzision aufzuklären.^[2, 4] Mit Hilfe der immer größer werdenden Rechenleistung von Computern wurde es jedoch möglich, die reversible Faltung kleiner Peptide zu simulieren.^[5-7] Die Analyse thermodynamischer Gleichgewichte zwischen gefaltetem und ungefaltetem Zustand ergibt, dass der entfaltete oder denaturierte Zustand aus einer vergleichsweise kleinen Zahl von Konformationen besteht,^[8] die nicht exponentiell mit der Länge des Peptides anwächst. Die Simulation solcher Gleichgewichte erfordert nicht nur eine genaue Beschreibung des gefalteten, sondern auch, und zwar ganz wesentlich, des entfalteten Zustandes, um die richtigen Besetzungszahlen von und die Übergangswahrscheinlichkeiten zwischen gefalteten und entfalteten Konformationen zu erhalten.

Die stabilste Struktur eines Proteins hängt von seiner Aminosäuresequenz, dem Lösungsmittel (Zusammensetzung, pH) und einigen thermodynamischen UmgebungsvARIABLEN (Temperatur, Druck) ab. Atomare Wechselwirkungen bestimmen das Gleichgewicht zwischen gefalteten und entfalteten Konformeren. Mit Computersimulationen des statistisch-mechanischen Ensembles kann dieses Gleichgewicht berech-

net werden, Moleküldynamik(MD)-Simulationen können die dazugehörige Faltungskinetik liefern. Angesichts der riesigen Zahl von Konformationen, die im Prinzip den entfalteten Zustand beschreiben, hielt man jedoch eine MD-Simulation des Faltungs-/Entfaltungsgleichgewichtes in atomarer Auflösung für unmöglich.^[9] In Faltungsstudien wurden vereinfachte Modelle verwendet, bei denen z. B. jeder Aminosäurerest als ein einziges wechselwirkendes Objekt betrachtet wurde,^[9, 10] die Freiheitsgrade des Lösungsmittels ganz vernachlässigt^[9-12] oder nur näherungsweise durch ihre mittlere Wechselwirkung („mean-field“)^[13] berücksichtigt wurden oder Bewegungen auf Gitterpunkte beschränkt wurden.^[14] Oft wurden Kraftfeldparameter so abgestimmt, dass sie eine bestimmte gefaltete Konformation bevorzugten,^[10, 11] oder es wurde ein spezieller Faltungsweg vorausgesetzt.^[15]

Diese Studien ermöglichen Erkenntnisse über potentielle Faltungmechanismen, konnten aber nicht klären, welche der Realität entsprechen,^[16] weil die Modelle vereinfacht waren oder bestimmte Lösungen bevorzugten. Andererseits konzentrieren sich Studien zur Vorhersage der Struktur von Proteinen^[17] darauf, den richtigen gefalteten Zustand vorherzusagen, ohne das Faltungs-/Entfaltungsgleichgewicht oder die -kinetik zu betrachten und ohne die Abhängigkeit der Struktur von Temperatur oder Lösungsmittel zu berücksichtigen.

Wir wollen uns hier dem Problem der Proteinfaltung unter einem anderen Gesichtspunkt nähern. Durch die Analyse dynamischer Simulationen der reversiblen Faltung von Peptiden unterschiedlicher Zusammensetzung, in verschiedenen Lösungsmitteln und bei verschiedenen Temperaturen in verschiedene Sekundärstrukturen wird gezeigt, dass der denaturierte Zustand dieser Peptide bei weitem weniger Konformationen umfasst, als man auf Grund der Konformationsfreiheitsgrade annehmen würde. Bei einem Peptid mit ungefähr 20 Bindungen, um die freie Rotation möglich ist,

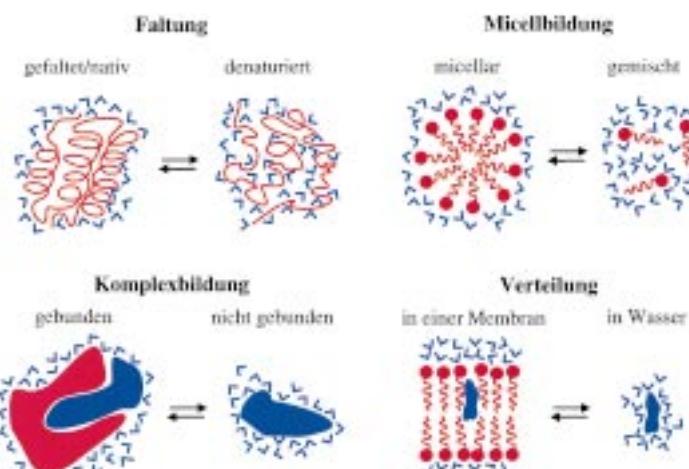


Abbildung 1. Thermodynamische Gleichgewichte, die Schlüsselprozesse der Molekularbiologie darstellen. Um auf einem Computer die korrekte Verteilung und die Kinetik der Umwandlung zwischen den gezeigten Konformationen zu simulieren, wurde das für Biomoleküle allgemein gültige Kraftfeld, das die interatomaren Wechselwirkungen beschreibt,^[19] anhand physikalisch-chemischer Zustandsdaten kleiner polarer und apolarer Moleküle in kondensierter Phase abgestimmt. Rot: Protein- oder Lipidmoleküle; blau: Wassermoleküle oder Liganden (größere Fläche), die an ein Protein binden oder eine Lipidmembran durchdringen.

[*] Prof. Dr. W. F. van Gunsteren, R. Bürgi, C. Peter, Dr. X. Daura
Laboratorium für Physikalische Chemie
Eidgenössische Technische Hochschule Zürich
ETH-Zentrum, 8092 Zürich (Schweiz)
Fax: (+41) 1-632-1039
E-mail: wfvgn@igc.phys.chem.ethz.ch

[**] Finanzielle Unterstützung wurde durch den Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung gewährt (Projekt-Nr. 21-50929.97).

machen etwa 10^2 – 10^3 Konformationen den denaturierten Zustand aus. Dieses geringe Ausmaß des denaturierten Zustandes erklärt, warum sich diese Peptide innerhalb einer Zeitspanne von Nanosekunden falten.

Dehnt man diese Argumentation auf Proteine aus, die sich in einem Zeitraum von Millisekunden falten, so erstreckt sich ihr denaturierter Zustand auf größtenteils 10^9 Konformationen – ein Vielfaches weniger als die oben angeführten 10^{90} . Dies macht die Simulation der Faltung eines Proteins auf atomarer Ebene in naher Zukunft möglich, vorausgesetzt, ein Kraftfeld ist vorhanden, das den entfalteten Zustand mit ausreichender Genauigkeit charakterisiert. Wenn der denaturierte Zustand falsch wiedergegeben wird, besteht keine Hoffnung, das korrekte Gleichgewicht zu simulieren. Daher ist es sinnlos, das Kraftfeld basierend auf einer statistischen Analyse gefalteter Strukturen aufzubauen: Eine korrekte Beschreibung der denaturierten Strukturen ist ebenfalls erforderlich.

Angesichts des Mangels an experimentellen Daten über den denaturierten Zustand ist die richtige Vorgehensweise die, das Kraftfeld auf physikalischen Prinzipien aufzubauen: auf den Wechselwirkungen zwischen Atomen und Molekülen in der kondensierten Phase. Wir zeigen hier, dass ein atomares Kraftfeld für Biomoleküle aller Art, dessen Parameter anhand experimenteller Zustandsdaten hydrophil/hydrophober Wechselwirkungen kleiner Moleküle in kondensierter Phase bestimmt wurden, geeignet ist, zuverlässig und reversibel mehrere Peptide in eine Vielzahl nativer Strukturen zu falten, und dies unabhängig von den Anfangsstrukturen der Simulationen.

Abbildung 1 veranschaulicht die thermodynamischen Gleichgewichte, die man gern mit Hilfe eines einzigen, allgemeinen Kraftfeldes für Biomoleküle simulieren würde.^[18] Einer der Schlüsselelemente in diesen Gleichgewichten ist die relative Stärke von polar-polaren, polar-apolaren und apolar-apolaren Wechselwirkungen. Bei dem hier verwendeten, in GROMOS96 implementierten Kraftfeld^[19] wurden die nicht bindenden Wechselwirkungen anhand von Zustandsdaten für Lösungen kalibriert. Die sechs untersuchten Peptide

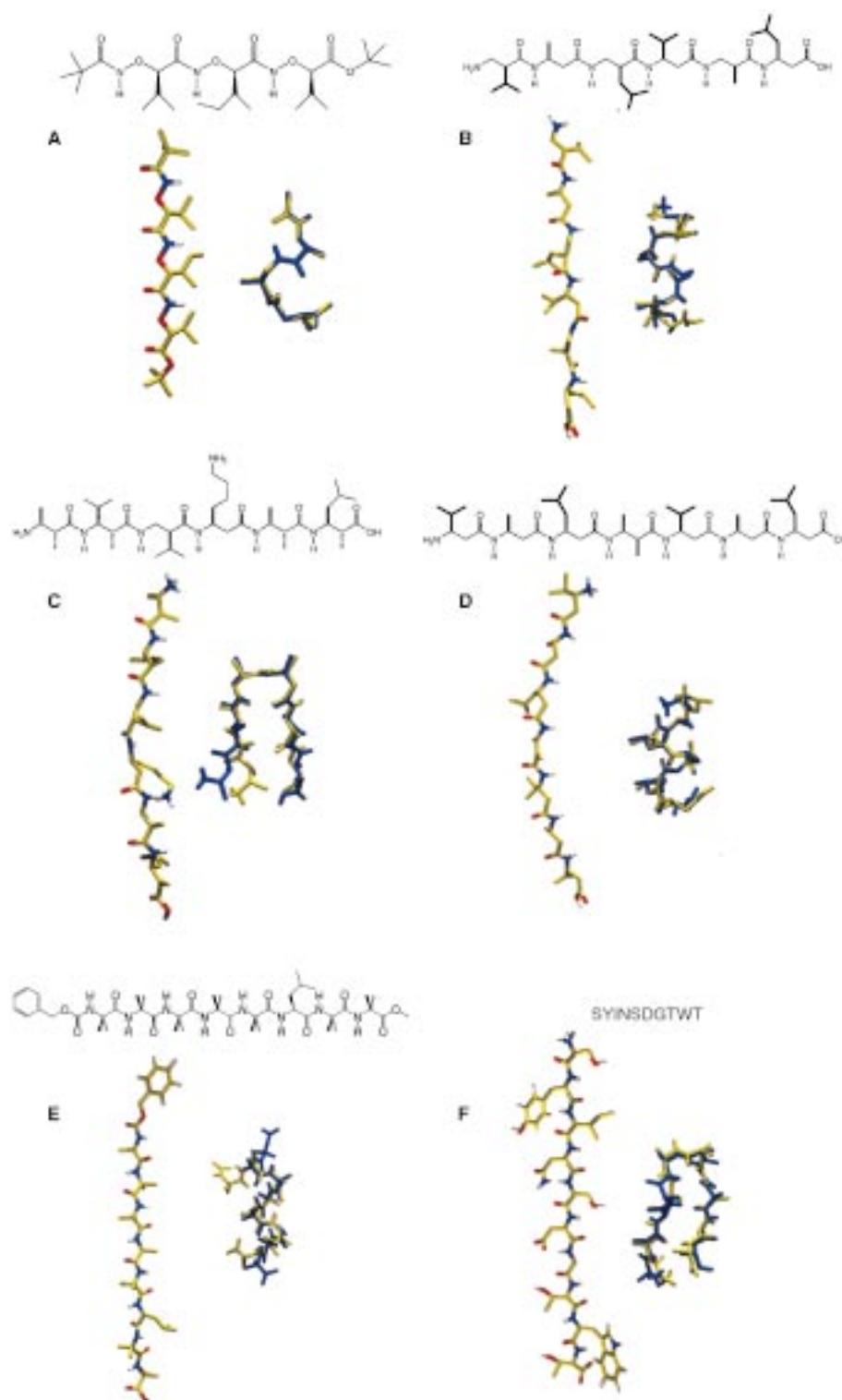


Abbildung 2. Faltung von Peptiden in verschiedene Sekundärstrukturen. Für jedes der sechs Peptide (siehe Tabelle 1) ist folgendes dargestellt: die chemische Formel, eine ausgestreckte Struktur, die als Ausgangskonformation der MD-Simulationen diente, eine gefaltete Struktur (gelb), die anhand von NMR-Experimenten modelliert wurde, und, darüber gelegt, eine gefaltete Struktur (blau) aus den MD-Simulationen des Faltungs-/Entfaltungsgleichgewichts. Im Falle des aus acht Resten bestehenden α -Aminosäurepeptids E deuten sowohl das Experiment als auch die Simulation auf das Vorliegen ungefähr gleich stark besetzter Konformationen (M - und P -, α - und β -Helices) hin, von denen nur eine abgebildet ist.

sind in Abbildung 2 zusammen mit der experimentell bestimmten stabilsten Struktur dargestellt. Die wichtigsten Parameter, die die sechs Systeme und die Simulationen charakterisieren, sind in Tabelle 1 aufgeführt. Eine erfolgreiche Studie über Peptidfaltung mit Hilfe von Simulationen sollte die folgenden Ergebnisse liefern:

1. Die gefaltete Struktur sollte im Rahmen einer gegebenen Abweichung der experimentellen Modellstruktur entsprechen.
2. Der Faltungsvorgang sollte reversibel sein, sollte also wiederholt beobachtet werden.
3. Die Verteilung zwischen gefalteten und entfalteten Konformationen im gesamten Ensemble sollte korrekt sein, z.B. sollten die Gibbs-Energie der Faltung, ΔG_{fold} , und der Schmelzpunkt, T_m , korrekt sein.
4. Die Faltungskinetik sollte korrekt sein.
5. All dies sollte unter Verwendung eines einzigen, allgemein gültigen Kraftfeldes für eine Vielzahl von Peptiden, Lösungsmitteln und Strukturen erreicht werden.

Die Abbildungen 2 und 3 sowie Tabelle 1 zeigen, dass sich die sechs Peptide reversibel zur richtigen Struktur falten; die mittleren quadratischen Abweichungen („root mean square“, RMS) der Positionen der Hauptkettenatome von der auf NMR-Experimenten basierenden Modellstruktur betragen weniger als 0.06 nm. Es liegen weder zuverlässige experimentelle Vergleichsdaten zu ΔG_{fold} als Funktion der Temperatur noch zu T_m vor.

Tabelle 1. Reversible Faltung von sechs Peptiden.^[a]

System	A	B	C	D	E	F
Peptidtyp	α -Aminoxy		β -Amino			α -Amino
stabile Struktur (Exp.)	Helix	Helix	Schleife	Helix	Helix	β -Schleife
Strukturtyp	P-1.8 ₈	P-12/10	10-gliedrige Schleife	M-3 ₁₄	M,P, α ,3 ₁₀	3:5
Lösungsmittel	CHCl ₃	MeOH	MeOH	MeOH	DMSO	H ₂ O
Simulationsparameter						
Zahl der Aminosäurereste	3	6	6	7	8	10
Zahl der Peptidatome	39	56	64	64	75	110
Lösungsmittelmoleküle	672	1435	1453	962	1119	4585
Atome im System	3399	4361	4423	2950	4551	13865
Rotationsfreiheitsgrade in der Hauptkette	9	18	18	21	16	20
Temperatur T [K]	340	340	340	340	340	353
Länge der Simulation [ns]	72	50	100	200	150	32
Simulation der Faltung						
gefaltete Struktur (Sim.)	Helix	Helix	Schleife	Helix	Helix	β -Schleife
	P-1.8 ₈	P-12/10	10-gliedrige Schleife	M-3 ₁₄	M,P, α ,3 ₁₀	3:5
RMS-Abweichung zwischen gefalteter Struktur und exp. Modell [nm]	0.01	0.01	0.03	0.01	0.03	0.06
RMS-Abweichung zwischen ausgestreckten Konf. und Exp. [nm]	0.20	0.36	0.40	0.52	0.32	0.70
RMSD-Kriterium gefaltet/entfaltet [nm]	0.07	0.08	0.08	0.10	0.10	0.12
Zahl ungefalteter Konformationen	148	129	286	360	344	57
Zahl der Faltungsvorgänge	40	6	15	23	9	2
geschätzte Gibbs-Energie der Faltung ΔG_{fold} [kJ mol ⁻¹]	5	5	6	2	11	14
geschätzte Schmelztemperatur T_m [K]	330 ± 20	–	–	330 ± 10	320 ± 10	–

[a] Der obere Teil der Tabelle zeigt den Typ des Peptids, die stabilste Konformation (bestimmt mittels NMR-Experimenten; siehe auch Abbildung 2) und das Lösungsmittel, das sowohl im Experiment als auch in der Simulation verwendet wurde. Der mittlere Teil der Tabelle zeigt die wichtigsten Simulationsparameter, die die verschiedenen Systeme auszeichnen. Die Zahl der Konformationsfreiheitsgrade der Peptide wird durch die Zahl der „frei rotierbaren“ Torsionswinkel in der Hauptkette angegeben. Obwohl für jedes Peptid bei mehreren Temperaturen Simulationen durchgeführt wurden, sind hier nur Ergebnisse für jeweils eine Temperatur (die am nächsten der Schmelztemperatur liegende) aufgeführt. Weitere Daten zu dem α -Aminoxäurepeptid finden sich in Lit. [21], zu den Peptiden aus sechs β -Aminosäureresten in Lit. [6, 22], zu dem β -Aminosäureheptapeptid in Lit. [5], zu dem α -Aminosäureoctapeptid in Lit. [23] und zu dem α -Aminosäuredipeptid in Lit. [24]. Der untere Teil der Tabelle zeigt die Ergebnisse der Simulationen: die stabilste Konformation, deren mittlere quadratische Abweichung (RMSD) der Hauptkettenatompositionen von der NMR-Modellstruktur, den RMSD-Wert einer ausgestreckten Konformation von der NMR-Modellstruktur, den RMSD-Wert, der verwendet wurde, um zwischen gefalteten und entfalteten Konformationen zu unterscheiden, die Zahl ungefalteter Konformationen, die den denaturierten Zustand des Peptids bilden, die Zahl der (Ent-)Faltungsvorgänge (siehe auch Abbildung 3) und grobe Abschätzungen der Gibbs-Energie der Faltung, ΔG_{fold} , die über das Verhältnis von gefalteten zu ungefalteten Konformationen bestimmt wurde, und, soweit ausreichende Daten zur Verfügung standen, der Schmelztemperatur der Peptide, T_m , die durch ein 1:1-Verhältnis von gefalteten zu entfalteten Konformationen bestimmt ist.

Zwei Resultate zeichnen sich in Tabelle 1 besonders ab: Erstens ist das verwendete Kraftfeld in der Lage, zuverlässig den stabilsten Sekundärstrukturtyp abhängig von Peptidzusammensetzung und Lösungsmitteltyp vorherzusagen. Zweitens ist die Zahl verschiedener Konformere, die den denaturierten (entfalteten) Zustand ausmachen, äußerst gering. Der denaturierte Zustand von Peptiden ist demnach von wesentlich geringerem Ausmaß als erwartet, in einem Temperaturbereich zwischen 300 und 360 K wird nur ein winziger Bruchteil der möglichen Konformationen tatsächlich angenommen.

Daraus ergibt sich, dass es möglich sein sollte, das Gleichgewicht zwischen gefalteten und entfalteten Strukturen zu simulieren, vorausgesetzt, ein Kraftfeld ist vorhanden, das zuverlässig die charakteristischen Eigenschaften dieses begrenzten denaturierten Zustandes beschreibt. Die Studie von gefalteten Strukturen allein^[20] wird nicht ausreichen, um das Problem der Proteinfaltung zu lösen. Der Schlüssel zur Aufklärung des Proteinfaltungsproblems liegt eher im genauen Verständnis des denaturierten Zustandes.

Methoden

Die MD-Simulationen wurden unter Verwendung des GROMOS96-Programmpaketes^[18] und des Kraftfeldes 43A1^[19] ausgeführt. Die Wasserstoffatome der aliphatischen CH_n-Gruppen wurden sowohl in den Peptiden als auch in den Lösungsmittelmolekülen implizit repräsentiert („united

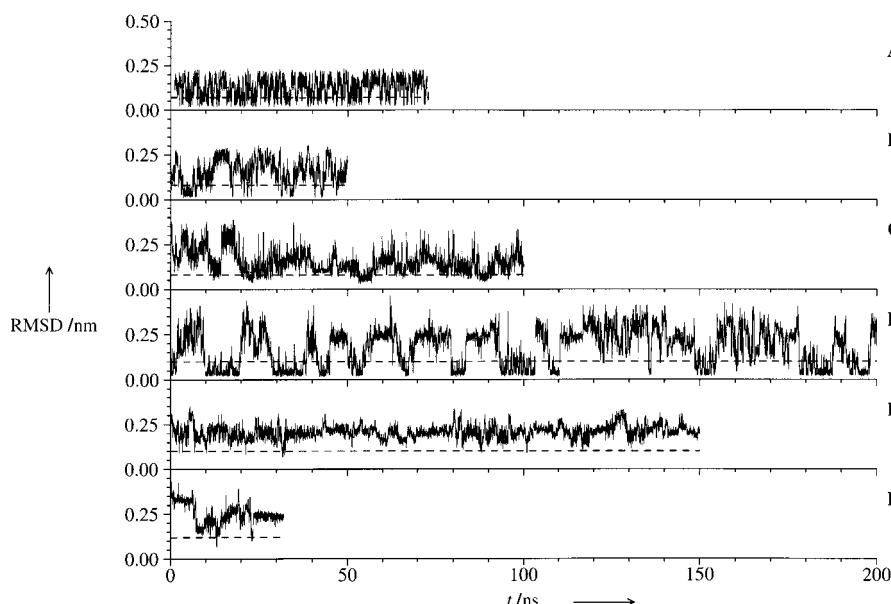


Abbildung 3. Dynamik der reversiblen Faltung von Peptiden. Für jedes der sechs Peptide (siehe Tabelle 1 und Abbildung 2) ist die mittlere quadratische Abweichung („root-mean-square deviation“, RMSD) der Positionen der Hauptkettenatome der simulierten Strukturen von der aus dem NMR-Experiment bestimmten Modellstruktur als Funktion der Zeit dargestellt. Außer im Fall des α -Aminoxysäuretripeptids A wurden die Atome der ersten und letzten Reste ausgelassen, sowohl bei der Überlagerung der Strukturen durch Translation und Rotation als auch bei der Berechnung der RMS-Abweichungen. Die gestrichelten waagerechten Linien zeigen die RMS-Abweichung an, die als Kriterium verwendet wurde, um korrekt gefaltete Strukturen zu bestimmen.

atoms“). Es wurden periodische Randbedingungen verwendet, mit Simulationszellen in Form eines Quaders oder eines Oktaeders mit gekappten Ecken. Die nicht bindenden Wechselwirkungen wurden in einem Abstand von 1.4 nm abgeschnitten, und die elektrostatischen Wechselwirkungen jenseits dieses Radius wurden in Wasser, DMSO und Chloroform durch ein Poisson-Boltzmann-Reaktionsfeld angenähert. Alle Bindungslängen (in Lösungsmittel und Peptid) wurden fixiert, ebenso die Bindungswinkel im Lösungsmittel. Die Zeitschritte bei der Integration betrugen 2 fs, und die Systeme wurden durch schwache Kopplung an Temperatur- und Druckbäder bei konstanter Temperatur und konstantem Druck (1 atm) gehalten.

Die Ergebnisse der Simulationen sind wegen der vergleichsweise langen Simulationsdauer unabhängig von den verschiedenen Ausgangsstrukturen. Die Peptidstrukturen der Trajektorie (in Intervallen von 0.1 ns) wurden wie folgt zu Konformationsgruppierungen zusammengefasst:^[8] Die Zahl nächster Nachbarn, d.h. die Zahl der Strukturen, die ein bestimmtes Ähnlichkeitskriterium erfüllen, wurde für jede Struktur der Trajektorie bestimmt, wobei als Kriterium für die Ähnlichkeit zwischen zwei Strukturen die RMS-Abweichung der Positionen ihrer Hauptkettenatome diente. Die Struktur mit der größten Zahl von Nachbarn wurde dann als Repräsentant der ersten (am stärksten besetzten) Konformation, des so genannten ersten Clusters von Strukturen, ausgewählt. Nach dem Entfernen aller Strukturen, die zu diesem ersten Cluster gehören, aus dem Ensemble aller Strukturen der Trajektorie wurde dieses Verfahren wiederholt, um den zweiten Cluster, die zweite Konformation, zu finden, usw.

Eingegangen am 20. September 2000 [Z15837]

- [1] a) H. J. C. Berendsen, *Science* **1998**, *282*, 642–643; b) W. A. Eaton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 5897–5899; c) N. D. Soccia, J. N. Onuchic, P. G. Wolynes, *Proteins Struct. Funct. Genet.* **1998**, *32*, 136–158; d) C. M. Dobson, M. Karplus, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1999**, *9*, 92–101.
- [2] a) A. Fersht, *Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding*, Freeman, New York, **1999**; b) D. J. Brockwell, D. A. Smith, S. E. Radford, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2000**, *10*, 16–25.
- [3] Y. Duan, P. A. Kollman, *Science* **1998**, *282*, 740–744.
- [4] a) S. J. Hagen, W. A. Eaton, *J. Mol. Biol.* **2000**, *297*, 781–789; b) N. A. J. van Nuland, V. Forge, J. Balbach, C. M. Dobson, *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*, 773–780.
- [5] X. Daura, B. Jaun, D. Seebach, W. F. van Gunsteren, A. E. Mark, *J. Mol. Biol.* **1998**, *280*, 925–932.
- [6] X. Daura, K. Gademann, B. Jaun, D. Seebach, W. F. van Gunsteren, A. E. Mark, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 249–253; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 236–240.
- [7] M. Takano, T. Yamato, J. Higo, A. Suyama, K. Nagayama, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 605–612.
- [8] X. Daura, W. F. van Gunsteren, A. E. Mark, *Proteins Struct. Funct. Genet.* **1999**, *34*, 269–280.
- [9] B. Erman, K. Dill, *J. Chem. Phys.* **2000**, *112*, 1050–1056.
- [10] Y. Zhou, M. Karplus, *Nature* **1999**, *401*, 400–403.
- [11] M.-H. Hao, H. A. Scheraga, *J. Mol. Biol.* **1998**, *277*, 973–983.
- [12] a) E. Alm, D. Baker, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 11305–11310; b) R. L. Baldwin, G. D. Rose, *Trends Biochem. Sci.* **1999**, *24*, 26–33.
- [13] a) M. Schaefer, C. Bartels, M. Karplus, *J. Mol. Biol.* **1998**, *284*, 835–848; b) H. Wang, S.-S. Sung, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 1999–2009.
- [14] a) E. I. Shakhnovich, *Fold Design* **1998**, *3*, R108–R111; b) D. K. Klimov, D. Thirumalai, *J. Chem. Phys.* **1998**, *109*, 4119–4125.
- [15] F. B. Sheinerman, C. L. Brooks III, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 1562–1567.
- [16] G. M. Crippen, Y. Z. Ohkubo, *Proteins Struct. Funct. Genet.* **1998**, *32*, 425–437.
- [17] a) J. Moult, T. Hubbard, K. Fidelis, J. T. Pederson, *Proteins Struct. Funct. Genet.* **1999**, *37*, 2–6, Supplement: Third Meeting on the Critical Assessment of Techniques for Protein Structure Prediction; b) E. Lacroix, T. Kortemme, M. López de la Paz, L. Serrano, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1999**, *9*, 487–493.
- [18] W. R. P. Scott, P. H. Hünenberger, I. G. Tironi, A. E. Mark, S. R. Billeter, J. Fennen, A. E. Torda, T. Huber, P. Krüger, W. F. van Gunsteren, *J. Phys. Chem. A* **1999**, *103*, 3596–3607.
- [19] W. F. van Gunsteren, S. R. Billeter, A. A. Eising, P. H. Hünenberger, P. Krüger, A. E. Mark, W. R. P. Scott, I. G. Tironi, *Biomolecular Simulation: The GROMOS96 Manual and User Guide*, Vdf Hochschulverlag AG, Zürich, **1996**.
- [20] D. Baker, *Nature* **2000**, *405*, 39–42.
- [21] C. Peter, X. Daura, W. F. van Gunsteren, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 7461–7466.
- [22] X. Daura, K. Gademann, H. Schäfer, B. Jaun, D. Seebach, W. F. van Gunsteren, *J. Am. Chem. Soc.*, eingereicht.
- [23] R. Bürgi, X. Daura, A. Mark, M. Bellanda, S. Mammi, E. Peggion, W. F. van Gunsteren, *J. Peptide Res.*, im Druck.
- [24] C. Santiveri, M. A. Jiménez, M. Rico, W. F. van Gunsteren, X. Daura, unveröffentlichte Ergebnisse.

[1] a) H. J. C. Berendsen, *Science* **1998**, *282*, 642–643; b) W. A. Eaton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 5897–5899; c) N. D. Soccia, J. N. Onuchic, P. G. Wolynes, *Proteins Struct. Funct. Genet.* **1998**, *32*, 136–158; d) C. M. Dobson, M. Karplus, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1999**, *9*, 92–101.

[2] a) A. Fersht, *Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding*, Freeman, New York, **1999**; b) D. J. Brockwell, D. A. Smith, S. E. Radford, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2000**, *10*, 16–25.