

Multiskalenmodellierung biologischer Funktionen: Von Enzymen zu molekularen Maschinen (Nobel-Aufsatz)**

Arieh Warshel*

Biomoleküle · Computerchemie · Freie-Energie-Rechnungen · Molecular Modeling · Multiskalenmodelle

Ein detailliertes Verständnis der Wirkung biologischer Moleküle ist eine Voraussetzung für sinnvolle Fortschritte in der Medizin und verwandten Bereichen. Die Herausforderung besteht darin, aus vorhandenen Strukturinformationen zu einem klaren Verständnis der zugrundeliegenden Funktion des Systems zu gelangen. In Anbetracht der Komplexität von Makromolekülen sind Computersimulationen unentbehrlich, um den Zusammenhang zwischen den molekularen Kräften und einer bestimmten Funktion zu beschreiben. Allerdings ist es praktisch unmöglich, eine vollständige und zuverlässige quantenmechanische Beschreibung großer molekularer Systeme zu verwenden.^[1] Die Lösung für dieses Problem entstand aus der Erkenntnis heraus, dass große Systeme räumlich aufgeteilt werden können, und zwar in einen Teil, der quantenmechanisch beschrieben werden muss (z. B. ein Bereich, in dem Bindungen gebrochen werden), während der Rest des Systems auf einer einfacheren Ebene durch empirische Kraftfelder beschrieben wird. Diese Idee war besonders wirkungsvoll bei der Entwicklung von kombinierten Quantenmechanik/Molekülmechanik (QM/MM)-Modellen.^[2] Hierbei zeigte sich, dass das Zusammenspiel zwischen den elektrostatischen Effekten der klassischen und Quantensysteme der Schlüssel für die Beschreibung der Funktionen von Enzymen und anderen Biomolekülen ist. Die Idee der Darstellung komplexer Systeme in unterschiedlichen Auflösungen sowohl auf der Zeit- als auch auf der Längenskala hat sich als sehr nützlich bei der Modellierung komplexer Systeme erwiesen. Ausgehend von grobkörnigen (coarse grained, CG) Darstellungen, die sich ursprünglich als sehr wirkungsvoll bei der Simulation der Proteinfaltung erwiesen haben – und die um die Beiträge elektrostatischer Energien erweitert wurden –, gelangte man zu Modellen, die besonders nützlich für die Erforschung der Wirkungsweise molekularer Maschinen sind. Dieser Ansatz der Verwendung mehrerer Skalen („multiscale modeling“) wird wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der Modellierung noch komplexerer Systeme spielen, einschließlich Zellen und Zellenansammlungen.

Einleitung

Die Fähigkeit, komplexe molekulare Systeme zu modellieren, ist entscheidend für ein besseres Verständnis biologischer Systeme, für Fortschritte in der molekularen Medizin und für den rationalen Entwurf neuer Materialien und Funktionseinheiten. Entwicklungen in diese Richtung waren stets dadurch gebremst, dass die sorgfältige Modellierung komplexer Systeme enorme Rechenleistung benötigt. Eine zuverlässige quantenmechanische Beschreibung von mehr als

ein paar Atomen war lange Zeit praktisch unmöglich. Selbst heute noch sind hochqualitative quantenmechanische Methoden zur Berechnung einer konvergierenden Auswahl an Konfigurationen, wie sie zur zuverlässigen Beschreibung der freien Energien mittelgroßer Systeme benötigt werden, zu rechenintensiv. Die Lösung dieses Problems entstand aus der Erkenntnis heraus, dass es zur Beschreibung der Eigenschaften komplexer Systeme nicht nötig ist, alle Teile des Systems auf dem gleichen Detailniveau zu beschreiben. Zum Beispiel können die Wechselwirkungen eines Wassermoleküls mit einem

Ladungszentrum, welches 10 Å entfernt ist, klassisch statt quantenmechanisch behandelt werden. Ebenso kann eine Atombindung, die nicht an einer chemischen Reaktion teil-

[*] Prof. A. Warshel
Department of Chemistry, University of Southern California
Los Angeles, CA (USA)

[**] Copyright© The Nobel Foundation 2013. Wir danken der Nobelstiftung, Stockholm, für die Genehmigung zum Abdruck einer deutschen Fassung dieses Vortrages.

nimmt, wie eine klassische Feder beschrieben werden. Somit ist es möglich, das System in verschiedene Teile zu zerlegen: Zum einen in Regionen, in denen die quantenmechanische Beschreibung notwendig ist (z.B. Bereiche, in denen Bindungen gebrochen werden), und zum anderen in Regionen, die auf einer einfacheren Ebene mit empirischen Kraftfeldern dargestellt werden können. Diese Idee, die im Rückblick naheliegend scheint, führte zu der Entwicklung des kombinierten Quantenmechanik/Molekülmechanik(QM/MM)-Modells. Hier hat sich die Kopplung zwischen den elektrostatischen Effekten der Quanten- und klassischen Teilsysteme letztlich als ein Schlüssel zur funktionellen Beschreibung von Enzymen und anderen biologischen Molekülen erwiesen.

Die Entwicklung des QM/MM-Ansatzes ermöglichte es, erstmalig auf eine wohldefinierte und logische Weise der Frage nachzugehen, was tatsächlich der Ursprung der katalytischen Wirkung von Enzymen sei. Obwohl in einer Vielzahl von Arbeiten (siehe Diskussion in Lit. [3–5]) zahlreiche Möglichkeiten vorgeschlagen wurden, wie Enzyme Reaktionen beschleunigen können, gelang es in keiner davon, die Struktur eines Enzyms direkt mit seiner katalytischen Wirkung in Verbindung bringen, noch konnte irgendein Ansatz gefunden werden, um die Geschwindigkeitskonstanten von enzymatischen Reaktionen zuverlässig vorherzusagen. Hier liefert der QM/MM-Ansatz (und insbesondere seine Version der empirischen Valenzbindung (EVB)) die wahrscheinlich beste Lösung für dieses grundlegende Rätsel. Die Idee, komplexe Systeme so zu beschreiben, dass verschiedene Teile des Systems auf unterschiedlichen Skalen behandelt werden, ist sehr allgemein und fand Anwendung in vielen Gebieten, insbesondere in Studien komplexer biologischer Systeme. Ein frühes Beispiel dafür ist unsere vereinfachte grobkörniges (coarse-grained, CG) Modell für die Proteinfaltung. Der Fokus auf elektrostatische Modelle führte zu CG-Modellen, die besonders wirkungsvoll bei der Erforschung der Aktivität molekularer Maschinen sind.

Insgesamt ist aus unseren Studien die Anschauung hervorgegangen, dass zur Beschreibung von komplexen molekularen Systemen Computer benötigt werden, um eine Brücke zwischen struktureller und funktioneller Information schlagen zu können. Bei der Wahl des optimalen Modells zur Beschreibung eines simulierten Systems sollten Computerwissenschaftler sorgfältig die vorhandenen Rechenressourcen prüfen. Hierfür stellen Multiskalen-Strategien nahezu immer einen leistungstarken Weg dar, um verschiedene Systeme mit unterschiedlichen Zeit- und Längenskalen zu erforschen. Um

die Entstehung der Multiskalen-Modellierung zu schildern, will ich mit einigen Erinnerungen an die frühen Entwicklungen auf dem Gebiet beginnen. Anschließend stelle ich einige spezifische Beispiele vor, von Enzymreaktionen bis hin zu Reaktionen molekularer Maschinen.

Die Frühphase der Multiskalenmodellierung

Ich wuchs in einem Kibbutz in Israel auf und hatte wenig Erfahrung mit der Wissenschaft, aber ich experimentierte gerne mit Heißluftballons, bastelte Handfeuerwaffen und beschäftigte mich mit vielen anderen Dingen, die nichts mit Chemie zu tun hatten. Später begann ich am Technion (Israel Institute of Technology) zu studieren und entschied mich eher zufällig für die Chemie. Irgendwann zwischen 1964 und 1965, während meines dritten Studienjahres, begann ich mich dafür zu interessieren, wie es Enzyme bewerkstelligen, chemische Reaktionen teilweise um bis zu zwanzig Größenordnungen zu beschleunigen. Ich begann ein experimentelles Projekt, das die vielleicht erste NMR-Messung eines sehr schnellen Reaktionsschrittes in der katalytischen Reaktion von Chymotrypsin hervorgebracht hat. Das Experiment lieferte aber keinen vernünftigen Hinweis über die Herkunft der katalytischen Wirkung. Obwohl ich vermutete, dass elektrostatische Effekte die Reaktion beschleunigen, zeigten meine Versuche, dass eine Änderung der Ionenstärke die Katalyse kaum beeinflusste.^[7] Dieses Ergebnis deutete (fälschlicherweise) darauf hin, dass elektrostatische Effekte nicht wesentlich zur Katalyse beitragen.

Nach meiner Zeit am Technion wechselte ich in die Arbeitsgruppe von Shneior Lifson, damals Direktor am Weizmann Institute, und änderte mein Forschungsthema von der statistischen Mechanik des Helix-Knäuel-Übergangs hin zur Modellierung von Molekülen mithilfe digitaler Computer. Im Herbst 1966 begann ich meine Doktorarbeit, in der ich mich an den ersten Ansätzen zur Entwicklung des späteren „konsistenten Kraftfelds“ (consistent force field, CFF) versuchte.^[8,9] Mein allgemeiner Ansatz war, Moleküle als Kugeln und Federn darzustellen (was als Molekülmechanik (MM) oder Kraftfeld-Ansatz bekannt wurde), um so Energien, Strukturen und vielleicht sogar Schwingungen wiederzugeben. Die Überlegung war, die MM-Parameter so zu verfeinern, dass die berechneten den beobachteten Eigenschaften möglichst nahekämen. Allerdings hatten wir keine Ahnung, wie wir dies tun sollten. Ich versuchte zunächst, eine Parametrisierung der Potentialfunktionen von Aminosäuren über die Betrachtung cyclischer Amide zu erreichen und erweiterte hierzu einen von Mordechai Bixon, einem früheren Schüler Lifsons, entwickelten Ansatz mit internen Koordinaten.^[10] Leider ist es im Grunde unmöglich, diesen Ansatz zu formulieren und zu implementieren, da er analytische Ableitungen von komplexen, gegenseitig abhängigen Transformationsmatrizen beinhaltet. Zu dieser Zeit war der Einsatz von internen Koordinaten der Schlüssel für praktikable Programme zur Konformationsanalyse (z.B. Lit. [11,12]). Diese ermöglichten jedoch keine konvergierende Optimierung, weil hierzu die erste und zweite Ableitung benötigt wurde. In meiner Verzweiflung versuchte ich, die allgemeine Beschreibung von



Arieh Warshel wurde 1940 in Kibbutz Sde-Nahum, Israel, geboren. Er promovierte 1969 am Weizmann Institute of Science, Rehovot, und ist derzeit Distinguished Professor und Dana und David Dornsife Chair an der University of Southern California, Los Angeles. Photo: Max S. Gerber.

Molekülen mittels Bindungslängen und -winkeln aufzugeben und stattdessen ein kartesisches Koordinatensystem zu verwenden, das nun tatsächlich alle Probleme mit den analytischen Ableitungen verschwinden ließ. In kartesischen Koordinaten war es z. B. trivial, die analytischen ersten und zweiten Ableitungen zu erhalten, welche für eine konvergierende Energieminimierung eines cyclischen Moleküls nötig sind. Dies war in internen Koordinaten nahezu unmöglich, da jede interne Koordinate von allen übrigen abhängt. Liegt die zweite Ableitung der kartesischen Koordinaten vor, ist für die Berechnung von Schwingungsmoden nur eine einfache Gleichung erforderlich. Zuvor verbrachte ich allerdings ein halbes Jahr mit dem Lesen von Bright Wilsons Buch über molekulare Schwingungen^[13] und diversen Programmerversuchen, die praktisch hoffnungslos waren (zumindest für cyclische Moleküle).

Glücklicherweise hatte das Weizmann Institute einen spezialisierten Computer namens Golem (benannt nach dem „Roboter“ aus der jüdischen Mythologie, der dem Prager Rabbiner hilft), der bemerkenswerterweise doppelte Genauigkeit („double precision“) beherrschte. Hierdurch war ich in der Lage, sehr genaue erste und zweite numerische Ableitungen zu ermitteln, mit denen ich exakte Minima und molekulare Schwingungen in einem allgemeinen Molekül berechnen konnte. An diesem Punkt begann ich, ein Programm zu schreiben, das analytische kartesische Ableitungen und eine Kraftfeldverfeinerung mittels kleinster Fehlerquadrate enthielt. Während des Sechstagekrieges ruhten die Arbeiten, und nach meiner Rückkehr an das Weizmann Institute sollte ich auf Michael Levitt treffen. Shneior war eine große Inspiration aufgrund seiner Erfahrung in der Berechnung konsistenter Kraftfeldparameter und aufgrund seiner beharrlichen Meinung, dass diese Parameter die Realität beschreiben können, gleichgültig ob sie aus dem Experiment oder der Theorie abgeleitet wurden. So entwickelten wir das allgemeine CFF-Programm,^[8,14] das es uns erlaubte, mithilfe von MM-Methoden genaue lokale Minima und Schwingungen mittelgroßer Moleküle zu bestimmen. Das Programm ermöglichte auch eine vollkonsistente Verfeinerung der MM-Parameter durch Anpassung der berechneten Eigenschaften an die beobachteten Eigenschaften von Molekülen und Molekulkristallen. Unser CFF-Programm wurde später zur Grundlage aller modernen MM-Simulationsprogramme.^[14] Die Verfeinerung der CFF-Parameter stellte sich als anspruchsvolle Aufgabe heraus, weil eine automatische Anpassung an viele unabhängige Eigenschaften nötig war. Es musste sowohl eine automatische Zuweisung von Schwingungen entwickelt werden, als auch eine allgemeine Methode zur Verfeinerung der Parameter, sodass bekannte Abmessungen der Elementarzellen von Molekulkristallen reproduziert werden konnten.^[9] Im Jahr 1968 begann ich, mit der Kombination meiner neu entwickelten CFF-Methode (mit der Beschreibung von Bindungen als Federn mit lokalisierten Elektronen) und einem Valenzbindungs(VB)-Quantenmodell zu experimentieren.^[15] Das QM(VB) + MM-Modell konnte dazu beitragen, den extrem großen Isotopeneffekt der chemischen Reaktion von Sauerstoff mit einem mittelgroßen organischen Molekül zu beschreiben.

Mit Enzymen im Hinterkopf, begann ich Anfang 1970 ein Postdoktorat in Harvard bei Martin Karplus. Mein Ziel war es, das QM + MM-Modell allgemeingültiger zu entwickeln. Karplus und sein Postdoktorand Barry Honig erzielten damals wichtige Fortschritte bei der Untersuchung von Retinal (dem Chromophor des Sehpigments),^[16] das ein 12π -Elektronensystem aufweist und daher einen guten Grund lieferte, ein CFF für π -Elektronensysteme zu entwickeln. Tatsächlich gelang es mir, eine Molekülorbital(MO)-Beschreibung von Atomen mit π -Elektronen mit einer MM-Beschreibung von σ -Bindungen mit lokalisierten Elektronen zu vereinen.^[17] Anschließend konnte ich die entsprechenden Parameter für eine vereinheitlichte CFF-Methode konsistent verfeinern. Dieses QM(MO) + MM-Modell enthielt nur die Bindungen zwischen der QM- und der MM-Region und ignorierte damit alle wichtigen (z. B. elektrostatischen) Kopplungen zwischen diesen Bereichen. Dennoch lieferte das Modell einen sehr leistungsfähigen und allgemeinen Weg, um große konjugierte Moleküle zu berechnen. Zudem fand ich in diesem Projekt heraus, wie man die exakten analytischen Kräfte aus dem QM-Verfahren durch die Fixierung der Molekülorbitale und eine Ableitung der Integrale erhält. Wie üblich habe ich diese fundamentale Entdeckung zunächst erraten. Danach habe ich meine Idee durch numerische Ableitungen bestätigt und anschließend den genauen mathematischen Beweis gefunden.^[18] Auch hier zeigte sich, dass die Kombination von Intuition und numerischer Validierung ein mächtiges Werkzeug darstellt.

Auf jeden Fall konnte mir die QM + MM-Behandlung von delokalisierten Elektronensystemen immer noch nicht dabei helfen, Enzyme zu untersuchen. Somit begann ich nach meiner Rückkehr an das Weizmann Institute 1972 mit der Entwicklung eines effektiven Hybridorbitalquantenprogramms (QCFF/ALL), das alle Atome in einem relativ kleinen Teil eines Moleküls quantenmechanisch behandelte, während der Rest klassisch dargestellt wurde. Während dieser Zeit verfestigte sich bei mir das Gefühl, dass ich meinen alten Traum von der Berechnung von Enzymen tatsächlich verwirklichen konnte. Kurz darauf kehrte Mike von seiner Promotion am Medical Research Council (MRC) an das Weizmann Institute zurück, und ich begann, eine mögliche Kombination meines quantenmechanischen Modells mit seinen MM-Rechnungen am Lysozym (siehe unten) zu untersuchen. Während ich immer noch mit der Entwicklung meines QCFF/ALL-Ansatzes zu kämpfen hatte, ergab sich eines Tages die Gelegenheit, das Problem der Proteinfaltung mit Mike zu besprechen. In diesem Gespräch entwickelten wir die wilde Idee, mechanische Molekülmodelle in einem schwerelosen Raumschiff zu untersuchen, und wir hatten die plötzliche Eingebung eines vereinfachten Proteinmodells, in dem Kugeln Aminosäuren darstellen. Unser Projekt nahm eine bemerkenswerte Entwicklung, und es schien, dass wir mithilfe der drastischen Vereinfachungen das kleine Protein BPTI mit einer überschaubaren Zahl von Minimierungsschritten falten könnten. Dieses vereinfachte CG-Modell^[6] schien das so genannte „Levinthal-Paradoxon“ lösen zu können.^[6] Letzteres beschreibt die widersprüchliche Tatsache, dass sich Proteine zu einer bestimmten Struktur falten, obwohl sie eine astronomische Zahl an möglichen Konfor-

mationen aufweisen und eigentlich niemals den richtigen Faltungsweg finden dürften. Unsere Simulationen zeigten, dass die Zahl der relevanten Koordinaten tatsächlich relativ klein ist und dass der Prozess der Proteinfaltung effektiv simuliert werden kann. Dank dieser Fortschritte beim Faltungsproblem gelang es mir, ein EMBO-Stipendium zu erhalten, sodass ich mit Mike nach seiner Rückkehr an das MRC zusammenarbeiten konnte.

Enzyme, Elektrostatik und QM/MM

Die dreidimensionalen Strukturen des Enzyms Lysozym, die Phillips und Mitarbeiter 1967 gelöst hatten,^[19] gewährten einen ersten Einblick in die Struktur des Enzym-Substrat-Komplexes. Dieser Durchbruch schürte enorme Hoffnungen, dass die Enzymkatalyse letztlich verstanden werden könnte. Phillips schlug vor, dass Enzyme sterische Spannungen aufbringen, die das Substrat in eine Struktur zwingen, die sich näher am so genannten „Übergangszustand“ befindet. In dieser Konfiguration ist die entscheidende Bindung zwischen dem Kohlenstoff- und dem Sauerstoffatom des Zuckersubstrats gebrochen. Dieser Gedanke beruhte teilweise auf der Beobachtung eines verzerrt aussehenden Zuckerrings und der Annahme, dass das Protein signifikante Spannungen induzieren kann. Es wurde argumentiert, dass die Spannung die Barriere für den Bindungsbruch und somit auch die Aktivierungsenergie der Reaktion verringern kann. Jedoch zeigte Mike, dass die Spannungs-idee problematisch ist, da Enzyme flexibel sind.^[20] Es schien mir klar, dass es für weitere Fortschritte nötig sein würde, die chemische Reaktion im Enzym tatsächlich zu modellieren. Deshalb konzentrierte ich mich nach meiner Ankunft am MRC im Herbst 1974 darauf, enzymatische Reaktionen zu modellieren. Dabei versuchte ich immer noch, mein QCFF/ALL-Programm irgendwie mit

Mikes Energieminimierung des Lysozyms zu kombinieren.^[21] Der erste Versuch führte zu lächerlich hohen Aktivierungsenergien (bei denen die Reaktion niemals stattfinden würde), und ich merkte, dass meine Modellierungen in die völlig falsche Richtung liefen. Es zeigte sich schließlich, dass der Bindungsbruch zwischen den Kohlenstoff- und Sauerstoffatomen im Zuckersubstrat falsch beschrieben wurde. Das Problem war, dass die Bindung in einen positiven Kohlenstoff und einen negativen Sauerstoff gebrochen wird ($C^+ O^-$), und dass diese Ladungen von der elektrostatischen Umgebung des Proteins und des Lösungsmittels stabilisiert werden müssen (siehe Abbildung 1).

Die Implementierung des Einflusses externer Ladungen war nicht einfach, da fast alle früheren Arbeiten zur Beschreibung der Umgebung unzuverlässige Continuum-Cavity-Modelle verwendeten, in denen der Cavity-Radius ein im Grunde freier Parameter ist. Hierzu wurde das komplizierte Bild der Konfigurationswechselwirkung (configuration interaction, CI) verwendet, aus dem sich das Dipolmoment des gesamten Moleküls ergab. Stattdessen erkannte ich, dass man vom allgemeinen Ausdruck des quantenmechanischen selbstkonsistenten Hamilton-Operators ausgehen kann (siehe z. B. Lit. [22]):

$$F_{\mu\mu}^{ii} \equiv U_{\mu\mu} + \frac{1}{2} P_{\mu\mu} \gamma_{\mu\mu} - \sum_{\nu \neq \mu} P_{\nu\nu} \gamma_{\nu\mu} - \sum_{i' \neq i} Q_{i'} \gamma_{i'i} - \sum_j Q_j \gamma_{ij} \quad (1)$$

Hierin ist U der Hamilton-Operator des Kerns, P die quantenmechanische Bindungsordnung, Q die Partialladung eines Atoms und γ das elektronische Abstoßungsintegral; μ und ν sind die Atomorbitale des i -ten Atoms. Nun werden die Atome i dem Teil des Systems zugewiesen, der quantenmechanisch behandelt werden soll, während die anderen Atome (mit j bezeichnet) klassisch behandelt werden können, vorausgesetzt, dass ihre Ladung konstant ist. Wenn man γ durch e^2/r ersetzt, ergibt sich:

$$F_{\mu\mu}^{ii} \equiv \left(F_{\mu\mu}^{ii} \right)_0 - \sum_B \frac{e^2 Q_B}{r_{AB}} = \left(F_{\mu\mu}^{ii} \right)_0 - U_A \quad (2)$$

wobei $\mu \in A$ gilt, $\left(F_{\mu\mu}^{ii} \right)_0$ den Beitrag der Quantenatome bezeichnet (typischerweise des gelösten Stoffes (S)) und U_A das gesamte elektrostatische Potential der klassischen Atome (typischerweise der Lösungsmittelmoleküle (s)) an der Position von Atom A beschreibt. Diese Gleichung kann auf Fälle verallgemeinert werden, in denen die Ladungsverteilung der klassischen Atome nicht festgelegt ist und durch das Feld der Quantenatome polarisiert werden kann.^[23] Somit ergibt sich der führende Term des Hamilton-Operators der Substrat-Lösungsmittel-Kopplung durch Addition des Potentials der Lösungsmittelatome zum Hamilton-Operator des gelösten Stoffes. Die gesamte Potentialenergie ist damit gegeben durch:

$$V_{\text{total}} = E_S(\mathbf{F}^S) + E'_{SS} + E_{SS} \quad (3)$$

In dieser Gleichung beschreibt $E_S(\mathbf{F}^S)$ die Energie, die quantenmechanisch aus der \mathbf{F} -Matrix berechnet werden

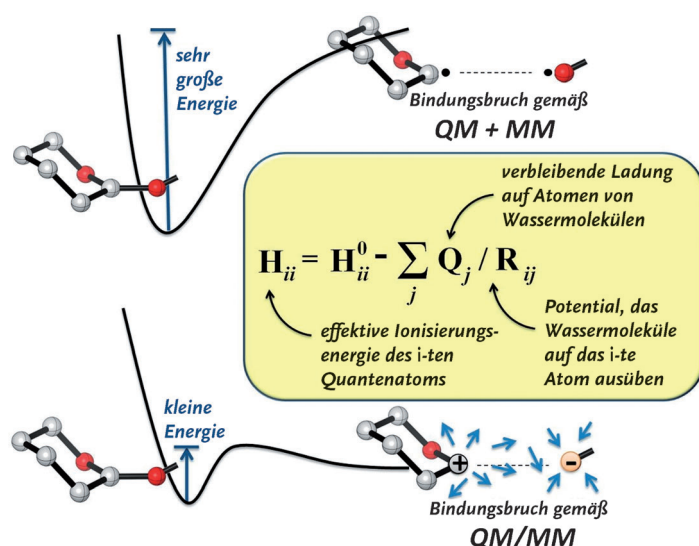


Abbildung 1. Die Energetik einer C-O-Bindungspaltung in einem ungekoppelten QM + MM-Modell (oberes Diagramm) und in einem gekoppelten QM/MM-Modell mit elektrostatischen und sterischen Umgebungseinflüssen (unteres Diagramm). Die Dipole kennzeichnen den Effekt der umgebenden Ladungen. Wie die Abbildung zeigt, ist der Bindungsbruch sehr schwierig, wenn die Kopplung zwischen der QM- und MM-Region nicht berücksichtigt wird.

kann, in welcher das elektrostatische Potential des Lösungsmittels enthalten ist (der Vektor für sämtliche U_A). E'_{ss} beschreibt die nicht-elektrostatische Wechselwirkung zwischen Substrat und Lösungsmittel, und E_{ss} ist das klassische Kraftfeld innerhalb des Lösungsmittels. In dieser Näherung wird der nicht-elektrostatische Term nur durch die klassische Van-der-Waals-Potentialfunktion abgeschätzt. Bei der Simulation von sehr großen gelösten Molekülen teilen wir manchmal sogar die Substratregion in Quanten- und klassische Teile. Die „Verbindung“ zwischen den Quanten- und den klassischen Regionen wird durch ein klassisches Kraftfeld dargestellt (welches in E_{ss} enthalten ist). Die Quantenatome an den Grenzen sind mit wasserstoffartigen Dummy-Atomen verbunden, um die Elektronen im Quantensystem auszubalancieren. Das Hauptproblem, mit dem wir 1975 konfrontiert waren, war die Auswertung der Größe und Positionen der Ladungen in der Umgebung (z.B. Wassermoleküle). Nachdem ich mehrere Monate in der Bibliothek verbracht und mich mit etlichen Fachleuten über elektromagnetische Theorie unterhalten hatte, realisierte ich, dass weder Fachbücher noch Experten wirklich wussten, wie man elektrostatische Effekte in Proteinen oder Lösungen am Computer modellieren kann. Ich rief mir die Erfahrung ins Gedächtnis, die ich bei der Entwicklung des CFF-Modells gemacht hatte: Vergiss, was in den Büchern steht, die vor dem Aufkommen der Computer geschrieben wurden, konzentriere dich nur auf die grundlegende molekulare Ebene und benutze vereinfachte Modelle.

Ich sah ein, dass wir nicht vorankommen würden, solange wir uns im Rahmen der elektrostatischen Standardtheorie bewegten, bei der sämtliche Details eines Proteins oder des umgebenden Lösungsmittels über eine schwer fassbare Dielektrizitätskonstante eingebracht werden. Die damals verfügbare Rechenleistung war klar nicht ausreichend, um ein Protein mit umgebenden atomaren Wassermolekülen zu modellieren und gleichzeitig sinnvolle Energien zu erhalten. Nachdem ich mehrere Optionen mit Mike besprochen hatte, beschlossen wir, die Wassermoleküle als Gitter polarisierbarer Langevin-Dipole (das LD-Modell) darzustellen und die Wechselwirkung dieser Dipole mit den Ladungen im Protein-Substrat-System und miteinander selbstkonsistent zu berechnen. Natürlich war der Schlüssel zum Erfolg dieses Ansatzes, das LD-Modell mithilfe von beobachteten freien Solvationsenergien zu kalibrieren. Ein ähnliches selbstkonsistentes Verfahren wurde dann für die induzierten Dipole an den Atomen der Proteine eingeführt.^[2] Dieses LD-Wassermodell führte zu der ersten mikroskopischen Beschreibung elektrostatischer Effekte in Proteinen und umging alle konzeptionellen Fallstricke, die sich aus der Beschreibung als kontinuierliches Dielektrikum ergeben würden. Für Kollegen, die mit der Vorstellung aufgewachsen waren, dass die spezielle, hochsymmetrische Struktur der Wassermoleküle sehr wichtig für die enorme Lösungsfähigkeit des Wasser ist, schien dieses Modell natürlich problematisch zu sein. Am Ende stellte sich das LD-Gittermodell aber als eine ausgezeichnete Näherung für die Untersuchung von Lösungsmittelleffekten heraus. Dies geschah lange vor allen anderen

mikroskopischen Modellen und auch vor der Entwicklung der makroskopischen Modelle, die die Proteingestalt berücksichtigen.

Zum ersten Mal konnte schließlich die Energie eines heterolytischen Bindungsbruchs in Enzymen und in Lösung erhalten werden, indem ein realistisches elektrostatisches Modell für das Enzym und die umliegenden Wassermoleküle eingeführt und dieses Modell in einen Quanten-Hamiltonoperator integriert wurde. Dieser QM/MM-Ansatz spiegelt die Erkenntnis wider, dass wir einerseits große Systeme nicht quantenmechanisch behandeln können, zugleich aber auch die Chemie nicht ohne eine Quantenmethode beschreiben können. Unser Ansatz bestand also darin, nur das Reaktionszentrum quantenmechanisch zu beschreiben und den Rest des Proteins und das Lösungsmittel klassisch zu behandeln (Abbildung 2). Dieses Verfahren sowie verwandte Modelle,

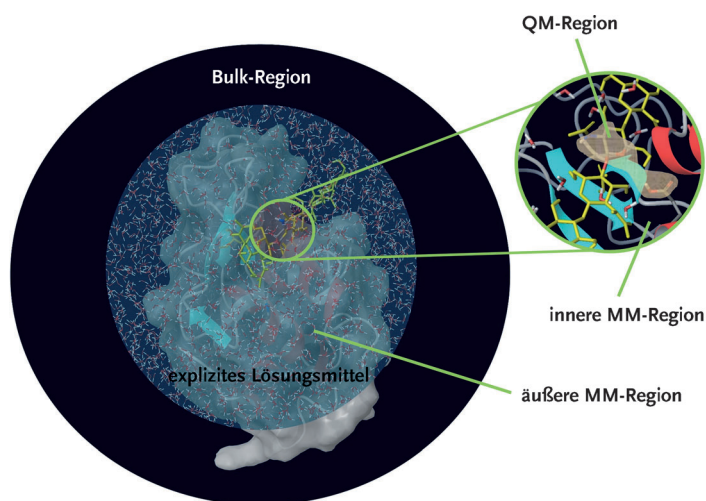


Abbildung 2. Ein QM/MM-Modell des aktiven Zentrums von Lysozym. Das Enzym ist aufgeteilt in eine kleine reaktive QM-Region und in den Rest des Systems, der mit einem klassischen MM-Modell beschrieben wird.

die wir nach und nach eingeführt haben, wurde als „Multi-skalen-Modellierung“ bekannt. Das QM/MM-Modell legte nahe, dass Enzyme mithilfe elektrostatischer Felder operieren, um die Aktivierungsbarrieren für Bindungsbrüche zu reduzieren (siehe unten). Die Verwendung unseres QM/MM-Ansatzes zur Simulation der katalytischen Lysozymreaktion ebnete den Weg für moderne Modellierungsstudien von Enzymwirkungen^[24] als eines der zentralen Themen der modernen theoretischen Chemie und Biophysik.

Unsere QM/MM-Studien führten zu einem tiefen Verständnis des Ursprungs der Enzymkatalyse, für die sich die elektrostatische Präorganisation als entscheidender Faktor herausstellte.^[25] Genauer gesagt führten meine nachfolgenden EVB-Studien zu der nicht-trivialen Erkenntnis, dass die Enzymkatalyse nicht aufgrund der Wechselwirkung zwischen dem Enzym und dem Substrat stattfindet (wovon die meisten ausgingen), sondern vielmehr aufgrund von hohen Kosten an freier Energie für die Reorganisation des Lösungsmittels in der Referenzreaktion ohne Enzym (die aufzuwendende Arbeit für die Drehung der Wassermoleküle in Richtung der

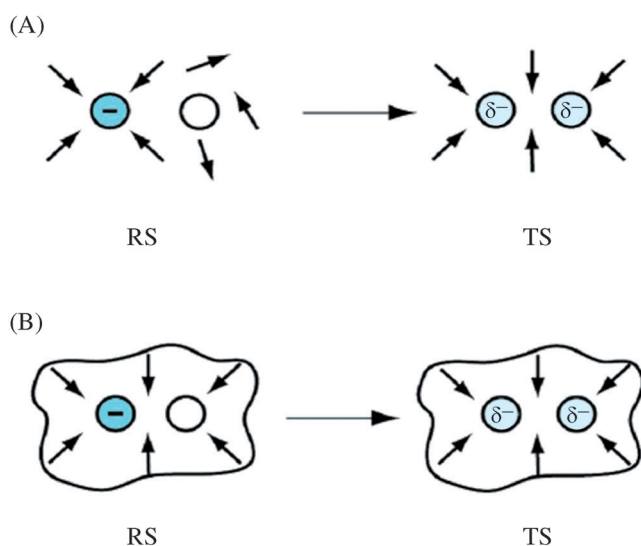


Abbildung 3. Schematische Darstellung der Reorganisation der umgebenden Dipole in einer S_N2 -Reaktion. Die Ladungen verändern sich von einer zentrierten Anordnung im Ausgangszustand der Reaktanten (RS) zu einer delokalisierten Anordnung im Übergangszustand (TS) in A) Wasser und B) im aktiven Zentrum eines Enzyms.^[26]

Ladungen des Übergangszustands). Wie in Abbildung 3 beschrieben, erhöht die Reorganisationsenergie die Aktivierungsbarriere in Lösung, während sich im Enzym die polaren Gruppen, die den Übergangszustand stabilisieren, nicht drehen müssen, da sie bereits mit korrekt polarisierten Dipolen gefaltet sind. In den folgenden Jahren konnte ich auch beweisen, dass die Änderung der elektrostatischen Reorganisationsenergie für fast die gesamte katalytische Wirkung der Enzyme verantwortlich ist.^[26] Obwohl wir diesen schwer fassbaren Ursprung der Katalyse während unserer Studien am MRC nicht vorhersehen konnten, profitierte ich von dem allgemeinen Gespür, dass es irgendwie mit elektrostatischen Effekten zusammenhängen sollte (siehe hierzu auch den aufschlussreichen Übersichtsartikel von Max Perutz^[27]). Obwohl Max intuitiv die Bedeutung dieses Effekts erkannte, glaubte er interessanterweise, dass er mit der Stabilisierung der Ionenpaare in einer schwach dielektrischen Umgebung zu tun hatte. Ich fand hingegen heraus, dass die aktiven Zentren des Enzyms in der Tat sehr polar sind, und wies ihn darauf hin, dass Ionenpaare in einer Ölphase mit umgebendem Wasser nicht sehr stabil wären. Diese Erklärung führte schließlich zu einem Artikel, den er für mich an *PNAS* übermittelte.^[25] Die 1975 konzipierten elektrostatischen Modelle waren die Basis für die einheitliche mikroskopische Behandlung biologischer Modelle, für das Verständnis der wahren Natur der dielektrischen Konstanten von Proteinen^[28,29] und für die Simulation der wichtigsten funktionellen Eigenschaften von Proteinen, einschließlich pK_a -Werten, Redoxpotentialen, freien Bindungsenergien, Ionen- und Protonenleitfähigkeiten^[29] und Proteininstabilitäten.^[30]

In den folgenden Jahren vereinfachten meine Mitarbeiter und ich den QM/MM-Ansatz drastisch, indem wir die verschiedenen Schritte der Reaktion mit einem Valenzbindungsmodell beschrieben – von mir als empirische Valenzbindungs(EVB)-Methode bezeichnet.^[31] Dieser Ansatz, der

die klare Physik der diabatischen Reaktant- und Produktzustände nutzte, ermöglichte es uns, einen großen Schritt hin zur Erfüllung meines großen Traums der quantitativen Modellierung der Enzymkatalyse zu machen. Er half außerdem, populäre Vorschläge für vermeintliche Ursachen der Enzymkatalyse zu erforschen (und häufig zu widerlegen), darunter entropische Effekte, Destabilisierung des Grundzustands durch Desolvatation, dynamische Effekte, Steuerung durch Orbitale und andere (siehe Diskussion in Lit. [32] und [26]). Die Fähigkeit, die eigentliche chemische Reaktion im aktiven Zentrum des Enzyms modellieren zu können, war der Schlüssel zur Erforschung des Geheimnisses der Enzymkatalyse. Hierdurch konnten die verschiedenen Beiträge zur Geschwindigkeitskonstante entschlüsselt werden, was mit rein experimentellen Ansätzen praktisch unmöglich ist. Insgesamt lieferten die QM/MM-Studien eine Lösung für das lang anhaltende Rätsel der Herkunft der katalytischen Wirkung von Enzymen und ebneten den Weg für quantitative Studien enzymatischer Reaktionen.^[26] Sie erlaubten es außerdem, das Problem eines gezielten Enzymdesigns auf rationale Weise anzugehen.^[33]

QM/MM-Ansätze mit einem Ab-initio-QM-Hamiltonoperator (QM(ai)/MM-Rechnungen) wurden in den letzten Jahren auf ein Niveau entwickelt, das es ermöglicht, mit einer geeigneten Stichprobe zuverlässige Freie-Energie-Oberflächen in kondensierter Phase zu erhalten.^[34] Noch beim Schreiben dieses Aufsatzes erscheint es mir besser, die EVB-Methode mithilfe von QM(ai)/MM-Rechnungen in Lösung zu kalibrieren und dann zu Studien in Proteinen mit dem EVB-Ansatz überzugehen.^[35] Jedoch bin ich mir sicher, dass man in der Zukunft in der Lage sein wird, konvergierende QM(ai)/MM-Oberflächen auch für Reaktionen in aktiven Zentren von Enzymen zu erhalten. Wenn man über Multiskalen-Modellierung im Rahmen von QM/MM und verwandten Ansätzen spricht, ist es wichtig zu betonen, dass die allgemeine Idee als ein „Einbettungsansatz“ bezeichnet werden kann. Im Rahmen eines solchen Ansatzes sucht man nach dem besten Weg, die Umgebung des aktiven Systems zu beschreiben. Hier stellen das Frozen-DFT-(FDFT)- und Constrained-DFT-(CDFT)-Verfahren zwei der vielversprechendsten Strategien dar (z. B. Lit. [36]). Beide Ansätze behandeln das gesamte System auf einem quantenmechanischen DFT-Niveau mit einem im Prinzip strengen Formalismus,^[37] dabei ist jedoch die Elektronendichte rund um die Hauptregion nicht Gegenstand der selbstkonsistenten Optimierung und wird durch grobe Näherungen bestimmt (einschließlich einer „freeze-and-thaw“-Strategie). Der CDFT-Ansatz kann als QM/QM-Ansatz beschrieben werden, aber auch hier besteht die Grundidee darin, einen Teil des Systems weniger streng und weniger anspruchsvoll zu beschreiben, um Rechenleistung zu sparen.

Das Primärereignis beim Sehvorgang und der Aufstieg der Moleküldynamiksimulationen in der Biologie

Anfang der 70er Jahre erkannte ich, dass die klassische Beschreibung der Übergänge zwischen Energieniveaus nicht

der optimale Weg war, um photochemische Reaktionen mittlerer und großer Moleküle zu beschreiben. Stattdessen verwendete ich einen semiklassischen Trajektorienansatz – das Surface-Hopping –, der zur Untersuchung von Gasphasenreaktionen sehr kleiner Moleküle eingeführt worden war.^[38] Dieser Fortschritt, der sich als konzeptioneller Durchbruch herausstellen sollte, wurde 1975 veröffentlicht,^[39] mit der Photoisomerisierung von Buten als Beispiel. Mit der Überzeugung, dass dieser Ansatz der Schlüssel zu quantitativen Studien der Photobiologie sei, richtete ich mein Hauptaugenmerk auf das wichtigste Problem der biologischen Photochemie, nämlich die primäre Photoisomerisierung des Retinals beim Sehvorgang. Zwar hatte ich mich bereits während meiner Zeit als Postdoc für Retinal interessiert (siehe z. B. Lit. [40]), damals galt mein Interesse aber spektroskopischen und geometrischen Eigenschaften und nicht dem weitaus spannenderen Problem, was nämlich im ersten Schritt des Sehvorgangs geschieht (ein Problem, das scheinbar völlig unzugänglich für theoretische Studien mit den Standardstrategien zu sein schien). Damals war bekannt, dass im Auge auftreffendes Licht von der Schiffschen Base des Retinals, das in dem Protein Rhodopsin eingebettet ist, absorbiert wird. Nach der Lichtabsorption isomerisiert das Retinalmolekül von seiner ursprünglichen 11-*cis*-Struktur in eine all-*trans*-Struktur, was strukturelle Veränderungen des Proteins verursacht. Die neu gebildete Proteinform, das Metarhodopsin, aktiviert die Übertragung des optischen Signals an das Gehirn. Später wurde entdeckt, dass Metarhodopsin ein G-Protein namens Transducin aktiviert und Rhodopsin tatsächlich ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor ist (GPCR).^[41] Es war auch bekannt, dass die primäre Lichtabsorption zur Photoisomerisierung des Retinalmoleküls in weniger als 6 Pikosekunden führt (der kürzesten Zeit, die in den frühen 70er Jahren gemessen werden konnte). Darüber hinaus schien das Fehlen von Strukturinformationen noch größere Herausforderungen zu stellen. Obwohl ich eine Bindung von Retinal an Chymotrypsin in Erwägung zog, beschloss ich, die Wirkung des Proteins durch einen sterischen Hohlraum und ein mögliches internes Gegenion zu modellieren. Ich benutzte den semiklassischen Surface-Hop-

ping-Ansatz zur Beschreibung der Schiff-Base des Retinals, das ich in der anfänglichen 11-*cis*-Konformation fixierte.^[42] Meine MD-Simulationen, die in Abbildung 4 dargestellt sind, sagten voraus, dass der Primärprozess etwa 100 Femtosekunden dauert. Bedingt durch eine sehr große nichtadiabatische Kopplung gab es eine enorm hohe Wahrscheinlichkeit für einen Sprung („Hopping“) aus dem angeregten Zustand in den Grundzustand (ein Phänomen, das später als konische Durchschneidung identifiziert wurde). Es ist wichtig zu bemerken, dass die Ergebnisse dieser Simulationen, die die erste Verwendung von MD-Simulationen in der Biologie darstellten, sowohl experimentell^[43] als auch theoretisch^[44] bestätigt worden sind.

Die Moleküldynamiken, die aus diesen Computersimulationen erhalten wurden, zeigten klar auf, wie eine schnelle Bewegung in einem begrenzten Hohlraum im Protein ohne starke Kollisionen möglich ist. Genauer gesagt wurde festgestellt, dass die Isomerisierung mit einer konzertierten Drehung mehrerer Bindungen einhergeht, was ich als „Pedal“-Bewegung bezeichnete. Um festzustellen, ob das Pedal-Modell sinnvoll ist, ließ ich mir Modellbauteile aus dem Strukturbiologielabor von Max Perutz und baute ein Modell, das die konzertierte Bewegung ohne große strukturelle Veränderungen reproduzieren konnte. Interessanterweise wurde diese Bewegung etwa 30 Jahre nach meinem ursprünglichen Modell durch Ab-initio-Studien bestätigt.^[44]

In den folgenden Jahren verwendeten mein langjähriger Mitarbeiter Bill Parson und andere^[45] die Struktur eines bakteriellen Reaktionszentrums (RC) und den gleichen semiklassischen Ansatz, um das primäre Elektronentransferereignis in der Photosynthese zu modellieren. Sie wiesen nach, dass der beobachtete 3-ps-Prozess ein sequenzielles Hopping vom primären Chlorophyll-Dimer (P*) zu einem Monomer (B) und dann zu einem zweiten Monomer (H) umfasst. Auch diese Ergebnisse wurden später durch experimentelle Studien bestätigt (z. B. Lit. [46]). Unsere Forschungen fanden zu einer Zeit statt, in der man allgemein davon ausging, dass das Primäreignis nicht schrittweise stattfinden könne und vielmehr ein einstufiger Superaustauschprozess sei. Hier stellte sich die Fähigkeit, die richtige elektrostatische

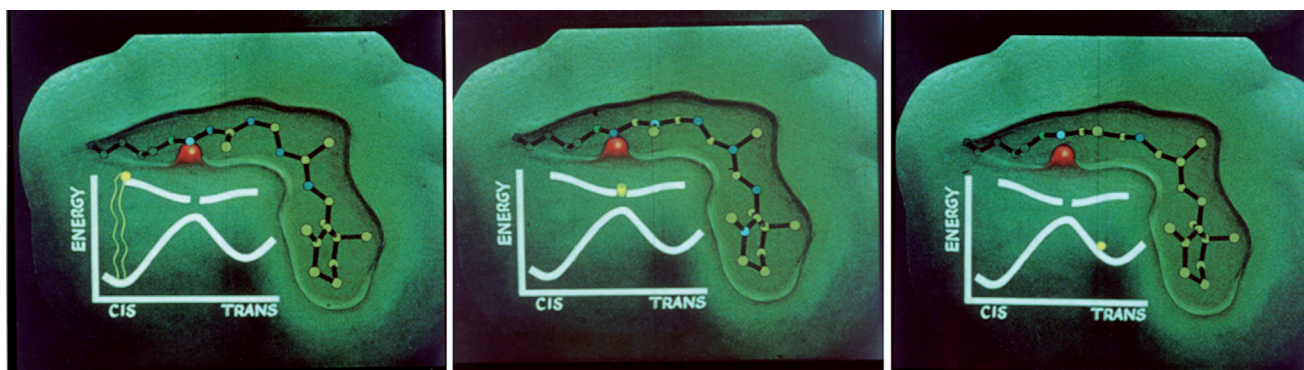


Abbildung 4. Momentaufnahmen einer simulierten MD-Trajektorie des Primäreignisses beim Sehvorgang. Die Trajektorie startet mit 11-*cis*-Retinal im Grundzustand und wechselt nach der Absorption von Licht in einen angeregten Zustand. Hier dreht sich der 11-12-Torsionswinkel barrierefrei auf 90°, und die Trajektorie wechselt in den Grundzustand in Richtung des *trans*-Isomers. In der Bewegung wird die Gesamtstruktur kaum verändert, weil sich die anderen Torsionswinkel entgegengesetzt zum 11-12-Torsionswinkel bewegen. Die Momentaufnahmen wurden aus einem Film entnommen, der die originale Trajektorie aus Lit. [42] zeigt.

Energie eines jeden Zwischenzustandes bestimmen zu können, als ein großer Vorteil gegenüber ähnlichen Ansätzen heraus, die nicht in der Lage waren, von Proteinstrukturen auf elektrostatische Energien und Redoxpotentiale zu schließen. Obwohl wir vier Jahre warten mussten, um die RC-Koordinaten zu erhalten, standen alle Computerprogramme bereit und wurden seit langer Zeit getestet, sodass wir Ende 1987 lediglich zwei Wochen benötigten, um aus der Struktur des RC einen detaillierten (und korrekten) Funktionsmechanismus abzuleiten.

Berechnung von freien Energien und thermodynamischen Zyklen

Einer der bemerkenswertesten Fortschritte, die aus der Verwendung von Computermodellen biologischer Moleküle hervorgegangen sind, war die Fähigkeit, die relevanten freien Energien und insbesondere die Energetik geladener Gruppen in Proteinen auszuwerten. Der erste, noch sehr grobe Ansatz in diese Richtung wurde 1976 vorgestellt (siehe Abbildung 8 in Lit. [2]), bevor quantitativere Freie-Energie-Rechnungen und gut definierte thermodynamische Zyklen auf mikroskopischer Grundlage mit dem PDL-Modell eingeführt wurden, das den Weg zur Berechnung von pK_s -Werten,^[28] Redoxenergien,^[47] Iontentransferenergien^[48] und freien Bindungsenergien von Wirkstoffen^[29] ebnete. Nachdem ich den exzellenten Übersichtsartikel von Valleau und Toerrie gelesen hatte,^[49] begann ich 1977/78 mithilfe von Störungsrechnungen der freien Energie (free energy perturbation, FEP) die Ladung eines Ions in meinem oberflächenbeschränkten Dipol-Wassermodell mit weichen Kugeln (surface-constrained soft sphere dipole, SCSSD) zu berechnen.^[50] Dies machte ich hauptsächlich, um den Gutachtern des SCSSD-Manuskripts zu beweisen, dass der entropische Beitrag zu den freien Lösungsenergien von Ionen gering ist. Die Berechnungen ergaben einen sinnvollen Trend, aber ich war zu sehr damit beschäftigt, mit den Gutachtern über andere triviale Probleme zu streiten, dass ich die vorläufigen Entropie-Ergebnisse nicht veröffentlichte. Dank der immer besser werdenden Rechenleistungen konnten wir schließlich 1982 mit Freie-Energie-Rechnungen der Ladungen in vollatomaren Lösungsmodellen beginnen,^[51] 1983/84 folgten dann entsprechende Rechnungen an Proteinen.^[52] Die mikroskopischen FEP-Rechnungen und die entsprechenden Freie-Energie-Zyklen sind zu einem wichtigen Bestandteil des Gebiets geworden, vor allem deshalb, weil schon triviale Veränderungen einiger weniger gelöster Atome in Lösung^[53] und in Proteinen^[54] spannende Ergebnisse liefern. Da ich fest von der Bedeutung elektrostatischer Energien überzeugt war, empfand ich diese „alchemistischen Veränderungen“ als keine wirkliche Herausforderung und konzentrierte mich daher weiterhin auf die Berechnung der großen absoluten freien Lösungsenergie, woraus die ersten FEP-Studien der freien Energie von ionisierenden Säuren in Proteinen, von Redoxprozessen (siehe Lit. [29]) und von freien Energien unzähliger enzymatischer Reaktionen hervorgingen.^[26] Zusammen mit meinen Mitarbeitern versuchte ich auch, der Fachwelt die enormen Risiken aufzuzeigen, die sich aus der

Betrachtung des Potentials der mittleren Kraft (potential of mean force, PMF) in Studien des biologischen Ladungstransports ergeben. Wir wiesen darauf hin, dass die Betrachtung des PMF beim Ionentransport durch Ionenkanäle extrem irreführend sein kann, da es nicht viel darüber aussagt, wie groß der Fehler bei der Berechnung der absoluten freien Lösungsenergien ist. Auf der anderen Seite ist die Berechnung der absoluten freien Energie der beste Weg, um zu überprüfen, ob das Modell die korrekte Physik erfasst.^[26,29] Dieser Aspekt hat damit zu tun, dass formale Strenge oft mit tatsächlicher Zuverlässigkeit verwechselt wird. Es dauerte relativ lange, bis die Fachwelt realisierte, dass die richtigen Randbedingungen der Schlüssel für die Zuverlässigkeit von Ergebnissen sind.

Der Brückenschlag zwischen Zeit- und Längenskalen: vereinfachte grobkörnige Modelle der Funktion komplexer molekularer Maschinen

Während die MD-Studien ultraschneller photobiologischer Prozesse des oben diskutierten Typs sehr effektiv sind,^[55] stellten Simulationen der funktionellen Eigenschaften, die längere Zeitschritte und größere Systeme beinhalten, eine viel größere Herausforderung dar. Tatsächlich ist unsere Fähigkeit zur Berechnung funktioneller Eigenschaften noch heute begrenzt, trotz des exponentiellen Zuwachses von MD-Simulationen von Proteinen und verwandten Systemen und den enormen Fortschritten in der Computerleistung (z. B. Lit. [56,57]). Man trifft hier auf große Sampling-Probleme (wie in Lit. [58] diskutiert), die auch durch ausgeklügelte Formulierungen, wie etwa in Lit. [59], nicht unbedingt reduziert werden können. Wenn man eine sehr lange Trajektorie laufen lässt, um eine funktionelle Eigenschaft zu simulieren, ist es natürlich problematisch, nur diese einzige zu betrachten, da sie die Gesamtwirkung nicht notwendigerweise repräsentiert. Darüber hinaus setzt die Beobachtung einer einzigen langen Trajektorie eine sorgfältige Interpretation und ein allgemeines, reduziertes Modell voraus. Deshalb war es aus unserer Sicht eindeutig, dass man bei der Simulation komplexer Systeme die Zeit- und Längenskalen durch einfache Modelle verbrücken muss.

An dieser Stelle riefen wir uns die CG-Idee aus den Tagen der Proteinfaltung ins Gedächtnis.^[6] Wir stellten uns die Frage, ob und wie sie zur Untersuchung von Proteinfunktionen verwendet werden könnte. Es war klar, dass diese Aufgabe eine verbesserte Berechnung der elektrostatischen Energien voraussetzte (die der Schlüssel für Struktur-Funktions-Korrelationen zu sein schienen), und so begannen wir ein großangelegtes Projekt, in dem wir ein verbessertes elektrostatisches Modell entwarfen und auf absolute Proteininstabilitäten kalibrierten.^[30] Das resultierende CG-Modell schien das beste Werkzeug zu sein, um von der Struktur molekularer Maschinen zu ihrer Funktion zu gelangen (siehe unten). Eine weitere Herausforderung, mit der wir uns befassen mussten, war die Anforderung, dass das Langzeitverhalten des einfachen Modells den entsprechenden Trend des vollständigen Modells wiedergibt. Dieses Problem lösten wir mit unserem Renormalisierungsverfahren,^[60] das starke ex-

terne Kräfte auf das vollständige Modell einwirken lässt (und hierdurch große Konformationsänderungen in kurzen Zeiten hervorruft). Die gleichen Kräfte legten wir auch an das reduzierte Modell an, welches durch eine Langevin-Dynamik simuliert wurde. Wir veränderten dann die effektive Reibung in den Langevin-Dynamiksimulationen so lange, bis sowohl das vollständige als auch das reduzierte Modell die gleiche zeitabhängige Reaktion auf die angelegten Kräfte zeigten. Die resultierende Reibung verwendeten wir als optimale Reibung für Simulationen mit dem reduzierten Modell auf langen Zeitskalen und in Abwesenheit der externen Kraft. Dieser Renormalisierungsansatz schien mikroskopische Simulationen auf langen Zeitskalen zuverlässig zu reproduzieren^[61] und erlaubte es uns, das Verhalten von komplexen molekularen Maschinen auf langen Zeitskalen zu erkunden.^[60,62]

Bei der Entwicklung der oben diskutierten CG- und Multiskalenmodelle sieht man sich mit der bedeutenden Frage konfrontiert, wie man die vereinfachte Freie-Energie-Fläche mit den Ergebnissen in Beziehung setzen kann, die mit dem vollständigen Modell erzielt werden würden. Hier griffen wir auf das Konzept der Paradynamik (PD) zurück, indem wir zuerst die freie CG-Energie ermittelten und dann eine Störungsrechnung zwischen der CG- und der vollständigen Oberfläche an verschiedenen Schlüsselbereichen auf der Energielandschaft durchführten.^[60] Damit konnten wir unser CG-Modell in Simulationen von molekularen Maschinen und anderen komplexen biologischen Systemen verwenden. Weiter unten werde ich auf einige der instruktivsten Beispiele aus neuerer Zeit eingehen.

Die F_1F_0 -ATP-Synthase ist ein zelluläres Aggregat, das aus zwei Rotationsmotoren besteht, dem zytoplasmatischen Komplex F_1 und daran gekoppelt der in der Membran eingebettete Komplex F_0 . Der F_0 -Rotor nutzt die Energie des Protonentransports durch die Zellmembran, um den in der

Membran eingebetteten c-Ring zu drehen. Der F_1 -Komplex koppelt die Rotation des c-Rings mit der zentralen Achse (γ -Untereinheit), um ATP aus ADP und P_i zu erzeugen. Trotz zahlreicher Simulationen und phänomenologischer Studien (z. B. Lit. [63,64]) gelang es nicht, den Ursprung der Kopplung zwischen chemischen und mechanischen Ereignissen in der F_1F_0 -ATP-Synthase konsistent und unvoreingenommen aufzuklären oder zu simulieren. In mehreren Einzelmolekülexperimenten^[65] entdeckte man die erstaunliche Anwesenheit einer schrittweisen $80^\circ/40^\circ$ -Drehung des Systems und fand, dass der chemische Schritt nach dem 80° -Schritt stattfindet (die Verzögerung vor dem chemischen Schritt wurde „katalytische Verweilzeit“ genannt). Leider war es ausnehmend schwierig, den Ursprung und die Bedeutung der schrittweisen Kopplung aus struktureller Sicht zu verstehen. Dies hat zum Teil mit der enormen Systemgröße und der sehr langen Zeitskala des Prozesses zu tun, die jenseits von Millisekunden liegt. Als wir die elektrostatische Freie-Energie-Fläche mit den freien Energien der ATP-Hydrolyse und der Produktfreisetzung koppelten, konnten wir damit bemerkenswerterweise das beobachtete Verhalten des Systems reproduzieren. Dies beinhaltet die Erzeugung der elektrostatischen Potentialfläche, die eine hohe Energie nach der 80° -Drehung der γ -Achse aufweist (siehe Abbildung 5). Nach Hinzunahme des chemischen Potentials konnte eine funktionale Energiefläche reproduziert werden (Lit. [62]), auf der die 80° -Barriere an die chemische Koordinate der ATP-Hydrolyse gekoppelt ist. Dies reproduzierte die experimentell beobachtete katalytische Verweilzeit bei $80^\circ/40^\circ$. Die Details unserer CG-Modellierung und der entsprechenden Analyse sind in Lit. [62] gegeben.

Eine weitere ermutigende CG-Studie^[66] konnte zum ersten Mal die Richtungsabhängigkeit der Kopplung zwischen der antreibenden Kraft und der Drehung des c-Rings in der F_0 -ATPase reproduzieren. Phänomenologische Modelle

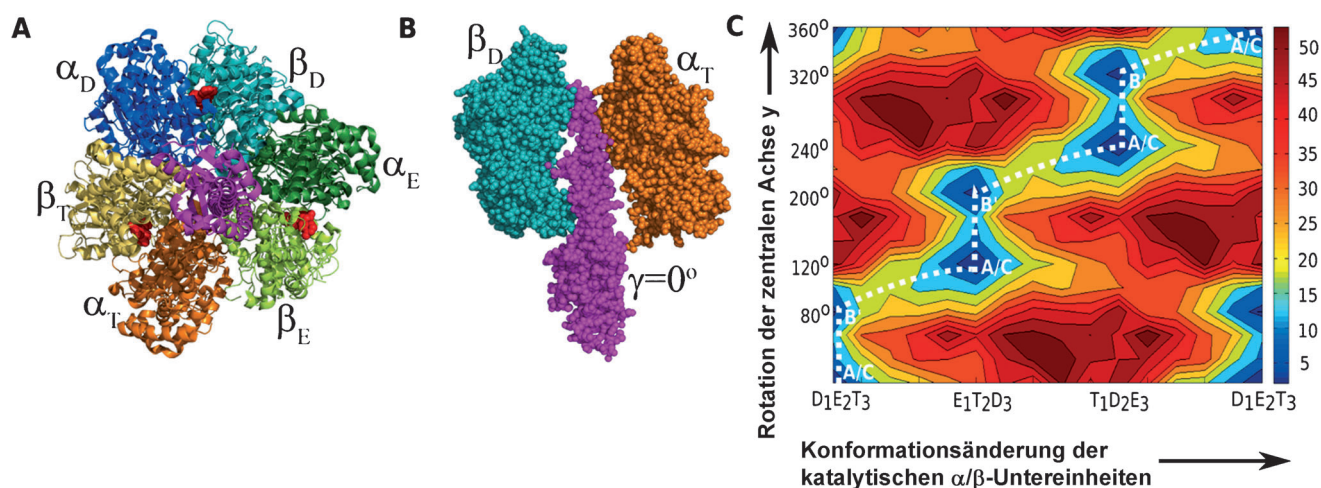


Abbildung 5. Kopplung zwischen der Rotation der γ -Achse und der ATP-Hydrolyse in F_1 -ATPase. Die F_1 -ATPase ist von der Membranseite (A) und entlang der Vertikalrichtung parallel zur zentralen γ -Achse (B) dargestellt. Die katalytischen α -Untereinheiten sind dunkelblau, dunkelgrün und orange dargestellt, die β -Einheiten sind cyan, hellgrün und gelb. Die γ -Achse ist magenta dargestellt. Die Verbindungen der β -Untereinheiten zu Nukleotiden sind mit T (ATP-gebunden), D (ADP-gebunden) oder E (leer) bezeichnet. C) Die elektrostatische CG-Freie-Energie-Fläche der Rotation der γ -Achse gekoppelt mit den α/β -Konformationsänderungen spiegelt die schrittweisen $80^\circ/40^\circ$ -Ereignisse wider, die im Text diskutiert sind. Die Kombination des Diagramms (C) mit der Energetik des chemischen Schrittes (die in Lit. [62] dargestellt ist) liefert eine strukturbasierte Beschreibung der Wirkungsweise von F_1 -ATPase. Die Abbildung wurde aus Lit. [62] entnommen.

wurden verwendet, um die Wirkungsweise der c-Ring-Rotation auf den membranären Protonentransfer von sauren in basische Reservoiren zu verstehen.^[67,68] Eine quantitative Beziehung zwischen Struktur und Funktion, die die physikalische Natur der gerichteten Drehung erklärt, fehlte jedoch vollständig. Unser CG-Modell konnte die elektrostatische Freie-Energie-Fläche der c-Ring-Drehung gekoppelt mit dem Protonentransport von der P-Seite (pH 5) zur N-Seite (pH 8) der Membran erzeugen. Die erhaltene Energiefläche zeigte, dass der molekulare Ursprung der gerichteten c-Ring-Drehung hauptsächlich in der Asymmetrie des Protonentransportpfades zwischen den N- und P-Regionen der F_0 -Einheit zu finden ist, nicht jedoch in der Energetik der zentral angeordneten Salzbrücke zwischen dem c-Ring und der Stator-Untereinheit.^[66]

Ein weiteres interessantes System, das mit unserem CG-Modell untersucht wurde, ist der Translocon-Komplex, der die Translokation von Polypeptiden durch die Membran steuert. Wir haben das CG-Modell benutzt, um mehrere wichtige Fragen über dieses System anzugehen, beginnend mit dem Mechanismus der Membranınsertion geladener Reste.^[69] Wir erzielten beträchtliche Fortschritte bei der Erforschung der Energetik der Translocon-unterstützten Proteininsertion und stellten uns die Aufgabe, das vollständige Freie-Energie-Profil für die Proteintranslokation über den Translocon-Komplex und die Partitionierung in der Wasser- und Membranphase zu erhalten. Nachdem wir mehrere Randbedingungen auf das System anwendeten, erhielten wir ein Freie-Energie-Profil,^[70] das wir benutzen konnten, um den Effekt verschiedener Mutationen und der Bindung des Ribosoms zu untersuchen. Ein Vergleich mit experimentellen Daten führte zu der Schlussfolgerung, dass der Insertionsvorgang wahrscheinlich ein Nichtgleichgewichtsprozess ist, und dass die Barriere für die Insertion in das Translocon die Peptidtopologie steuert. Das erhaltene Freie-Energieprofil erlaubte es uns, extrem anspruchsvolle und grundlegende Fragen über die Art der Kopplung zwischen zwei großen biologischen Systemen, dem Translocon und den Ribosomen, zu beantworten. Wir untersuchten den Ursprung der experimentell beobachteten^[71] zweiphasigen Zugkraft des Translocons, die die frisch synthetisierten Peptidketten vom Ribosom ablöst. Wir konnten die experimentellen Effekte reproduzieren (Lit. [72] und Abbildung 6), indem wir die chemischen Barrieren der Bildung von Peptidbindungen für reguläre und festgehaltene Peptidsequenzen abschätzten und mit dem Profil für die Translocon-unterstützte Insertion in die Proteinmembran kombinierten und Langevin-Dynamiksimulationen für das Ribosom/Translocon-Modell durchführten. Ein weiteres aufschlussreiches Beispiel ist unsere Simulation der Wirkungsweise spannungsaktivierter Ionenkanäle.^[73] Die oben aufgezeigten Beispiele verdeutlichen, wie wichtig die Berechnung der Freie-Energie-Profile ist, um ein gründliches Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen verschiedener biologischer Prozesse zu erlangen.

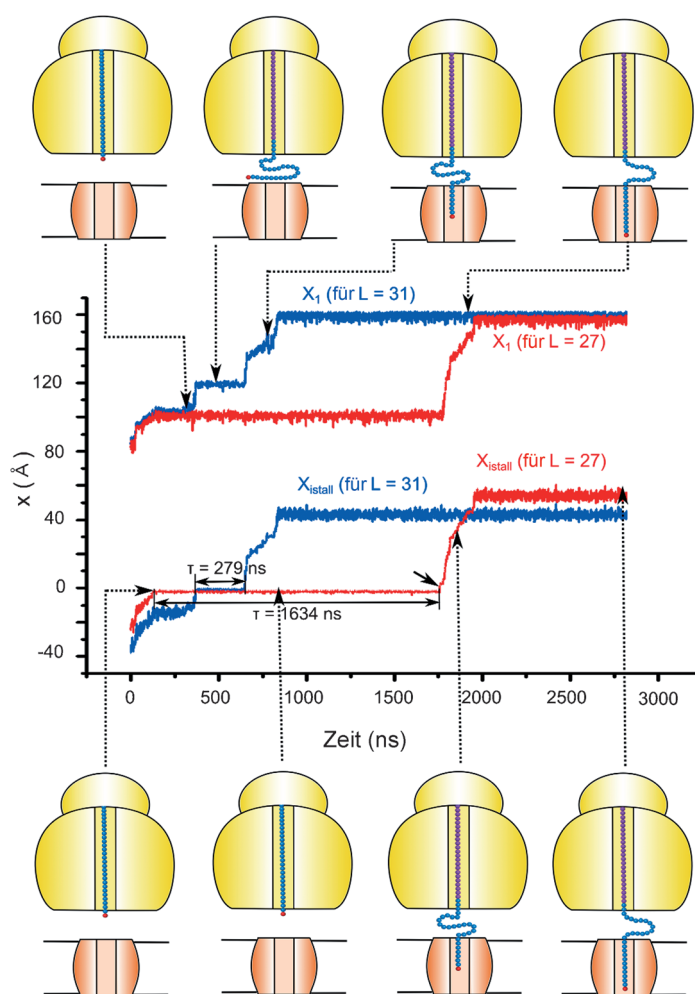


Abbildung 6. Simulationen der Kopplung zwischen dem Ribosom und dem Translocon (TR). Die Simulation beschreibt den Effekt des TR auf festgehaltene Peptide, wobei bei bestimmten Längen des Linkers L die Kopplung zum TR die Freisetzung des festgehaltenen Peptids unterstützt. Die Zeitabhängigkeit von x_{install} und x_1 ist für eine Peptidkette mit 40 und 36 Einheiten dargestellt, was einer Länge von $L=31$ (blau) bzw. $L=27$ (rot) entspricht. Die x -Koordinate bezeichnet die Insertionskoordinate und ist in Lit. [72] definiert. Die Barrieren, die für die Langevin-Dynamiksimulationen verwendet wurden, wurden durch eine Skalierung der Energiewerte mit 0.43 erhalten. Dies erlaubte eine Simulation des Insertionsprozesses auf einer relativ kurzen Zeitskala und eine anschließende Abschätzung der relevanten Zeiten für die wirklichen Barrieren durch eine entsprechende Boltzmann-Verteilung. Die Momentaufnahmen im oberen und unteren Teil des Diagramms zeigen die Konfiguration der naszierenden Peptidkette für $L=31$ bzw. $L=27$. Ribosom und TR sind schematisch dargestellt. Die Startkonfiguration der naszierenden Proteinkette ist cyan dargestellt. Das führende Teilchen (x_1) ist rot dargestellt, alle anderen Teilchen, die an die wachsende Kette angefügt werden, sind magenta dargestellt. Die interpolierten Zeiten (die ohne Skalierung erhalten werden sollten) für $L=31$ und $L=27$ sind 6 min bzw. 36 min. Die Abbildung wurde aus Lit. [72] entnommen, die auch eine vollständige Beschreibung des Problems und der durchgeführten Simulationen enthält.

Zukünftige Richtungen

Durch die enorme Steigerung der Rechenleistung ist es nahezu sicher, dass Computersimulationen immer mehr das zentrale Instrument bei der Modellierung komplexer Systeme werden. Obwohl es schwierig ist, die exakte zukünftige Aus-

richtung des Gebiets vorherzusagen, kann es sinnvoll sein, einige vielversprechende Entwicklungen zu betrachten. Eine klare Ausrichtung ist die Bekämpfung von Wirkstoffresistenzen. An der Wende zum 20. Jahrhundert hatte der Mensch eine kurze Lebensspanne, vor allem auch durch tödliche Krankheiten bedingt. Die Entdeckung des Penicillins und anderer Medikamente bot Schutz und Hilfe gegen einige schwere Krankheiten. In den letzten Jahren begann sich das Bild jedoch zu wandeln, durch das zunehmende Auftreten von Wirkstoffresistenzen. Es scheint, als gäbe es keine Zauberkugel: Schlüsselmedikamente werden wirkungslos, zum Teil wegen des übermäßigen und verantwortungslosen Einsatzes von Antibiotika. Zudem haben wir Krankheiten wie HIV, die aufgrund schnell mutierender Erreger schwer zu bekämpfen sind, oder die Malaria, wo es ebenso das Resistenzproblem gibt. Damit ist es unabdingbar geworden, neue Strategien für die gezielte Entwicklung von Wirkstoffen zu verfolgen. Die Herausforderung besteht darin, die experimentelle Reaktion des Erregers auf verschiedene Medikamente vorherzusagen. Es wäre ungemein hilfreich, computergestützte Strategien für das Studium von Wirkstoffresistenzen einzusetzen, aber für einen solchen Ansatz muss die Möglichkeit effektiver Mutationen drastisch reduziert werden.

Eine solche Strategie könnte die Tatsache nutzen, dass ein Virus im Kampf gegen einen bestimmten Wirkstoff die Affinität zu diesem Wirkstoff verringern und gleichzeitig eine vernünftige katalytische Effizienz gegen die nativen Substrate behalten muss. Daher wäre es nützlich, einen Weg zu finden, das Virus zu überlisten, indem wir Inhibitoren entwerfen, deren Bindung an das Zielenzym nicht durch Mutationen reduziert werden kann, ohne den $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Wert deutlich zu reduzieren. Mit anderen Worten müssen die resistenten Mutationen den K_{i} -Wert für den Wirkstoff erhöhen und gleichzeitig einen vernünftigen $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Wert für das native Substrat beibehalten. Eine wirkungsvolle Strategie ist die Berechnung des Vitalitätswertes γ ($\gamma = K_{\text{i}} k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$) und die Bestimmung der Wahrscheinlichkeit, dass das Virus auf eine bestimmte Art mutieren wird. Die Kombination des Vitalitätswertes mit anderen Randbedingungen (wie z. B. der Aufrechterhaltung einer vernünftigen Proteinstabilität) liefert den Überlebenswert, d. h. die Wahrscheinlichkeit, dass eine bestimmte Mutation in der Gegenwart eines bestimmten Wirkstoffs überleben wird. Vitalitätswerte wurden in ersten Studien bereits berechnet,^[74,75] und wir sind zuversichtlich, dass man ein robustes Verfahren entwickeln kann, um das Überleben von Virusmutationen vorhersagen und damit Wirkstoffe entwerfen zu können, die das Resistenzproblem verringern. Andere Randbedingungen wie Mutationsneigung und weitere Faktoren können durch Bioinformatikansätze eingeführt werden. Es ist sehr wahrscheinlich, dass ein offensiver Einsatz von Computersimulationen den Weg ebnet, einen Erreger mit seinen eigenen Waffen zu schlagen.

Eine weitere spannende Richtung kann die Entwicklung von Wirkstoffen sein, die in Protein-Protein-Wechselwirkungen eingreifen. Hier besteht die Idee darin, die zentralen Interaktionen zwischen Partnerspezies in Signalleitungsnetzwerken (z. B. Ras/RAF)^[76] zu identifizieren und dann Moleküle basierend auf den Bereichen stärkster Wechselwirkun-

gen zu entwerfen (siehe die Strategie in Abbildung 49 aus Lit [77]). Eine andere Richtung, die immer wichtiger werden wird, ist das rationale Enzymdesign. Mir scheint naheliegend, dass Ansätze zum gezielten Design von Enzymen eine realistische Modellierung der katalytischen Wirkung verschiedener Entwürfe beinhalten müssen. Es ist unwahrscheinlich, dass unverifizierte Vorstellungen von der Funktionsweise von Enzymen (z. B. die Vorstellung, dass Enzymkatalyse aufgrund dynamischer Effekte stattfindet), oder Vorstellungen, die auf Gasphasenmodellierungen basieren, zu künstlichen Enzymen mit großen katalytischen Wirkungen führen können. Auf der anderen Seite müssen Vorgehensweisen, die die katalytischen Wirkungen bekannter Enzyme reproduzieren können, ein sehr mächtiges Werkzeug für das Austesten verschiedener Entwürfe sein. Multiskalenmodellierungen der Wirkungsweise molekularer Komplexe werden wahrscheinlich bei der Beschreibung von Signalübertragungen verwendet werden und ein immer klareres Verständnis zellulärer Wirkungsweisen erlauben. Schließlich sollte auch erwähnt werden, dass die Multiskalenmodellierung ein sehr mächtiges Werkzeug auch für die Modellierung nichtbiologischer Systeme darstellt. Vielversprechende Richtungen sind hier die Entwicklung von Katalysatoren für vielfältige Anwendungen, das Design neuer Materialien und die Optimierung nanotechnologischer Funktionseinheiten. Insgesamt wird der Einsatz von Computermodellen wahrscheinlich in jedem Bereich der molekularen Wissenschaft enorm zunehmen, ebenso bei der Modellierung sehr großer Systeme, die als makroskopische Systeme betrachtet werden können.

Ich danke meiner Frau Tamar, die mich auf meinem wissenschaftlichen Lebensweg begleitet hat und mir in schwierigen wie erfolgreichen Zeiten zur Seite stand.

Eingegangen am 25. März 2014

Online veröffentlicht am 24. Juli 2014

Übersetzt von Lasse Spörkel, Mülheim

- [1] „Quantenchemische Modelle (Nobel-Vortrag)“: J. A. Pople, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 2014–2023; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1894–1902.
- [2] „Theoretical Studies of Enzymic Reactions – Dielectric, Electrostatic and Steric Stabilization of Carbonium-Ion in Reaction of Lysozyme“: A. Warshel, M. Levitt, *J. Mol. Biol.* **1976**, *103*, 227–249.
- [3] A. Fersht, *Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding*, Freeman, New York, **1999**, S. 631.
- [4] A. Warshel, *Computer Modeling of Chemical Reactions in Enzymes and Solutions*, Wiley-Interscience, Hoboken, **1997**, S. 256.
- [5] W. P. Jencks, *Catalysis in Chemistry and Enzymology*, McGraw-Hill, New York, **1969**, S. 644.
- [6] „Computer Simulation of Protein Folding“: M. Levitt, A. Warshel, *Nature* **1975**, *253*, 694–698.
- [7] „Proceedings of the XXXVI Meeting of the Israel Chemical Society: On the interaction of Chymotrypsin with ionized substrates“: A. Warshel, Y. Shalitin, *Isr. J. Chem.* **1966**, *4*, 85p.
- [8] „Consistent Force Field for Calculations of Conformations Vibrational Spectra and Enthalpies of Cycloalkane and N-Alkane Molecules“: S. Lifson, A. Warshel, *J. Chem. Phys.* **1968**, *49*, 5116–5129.

- [9] „Consistent Force Field Calculations. 2. Crystal Structures, Sublimation Energies, Molecular and Lattice Vibrations, Molecular Conformations, and Enthalpies of Alkanes“: A. Warshel, S. Lifson, *J. Chem. Phys.* **1970**, *53*, 582–594.
- [10] „Potential Functions and Conformations in Cycloalkanes“: M. Bixon, S. Lifson, *Tetrahedron* **1967**, *23*, 769.
- [11] „Molecular Geometry. 4. Medium Rings“: J. B. Hendrickson, *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 4854–4866.
- [12] „Conformational-Analysis. 84. Study of Structures and Energies of Some Alkenes and Cycloalkenes by Force Field Method“: N. L. Allinger, J. T. Sprague, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 5734–5747.
- [13] E. B. Wilson, J. C. Decius, P. C. Cross, *Molecular Vibrations. The Theory of Infrared and Raman Vibrational Spectra*, McGraw-Hill, New York **1955**, S. 388.
- [14] „The birth of computational structural biology“: M. Levitt, *Nat. Struct. Biol.* **2001**, *8*, 392–393.
- [15] „Oxidation of 4a,4b-Dihydrophenanthrenes. 3. A Theoretical Study of Large Kinetic Isotope Effect of Deuterium in Initiation Step of Thermal Reaction with Oxygen“: A. Warshel, A. Bromberg, *J. Chem. Phys.* **1970**, *52*, 1262–1269.
- [16] „Implications of Torsional Potential of Retinal Isomers for Visual Excitation“: B. Honig, M. Karplus, *Nature* **1971**, *229*, 558–560.
- [17] „Calculation of Ground and Excited-State Potential Surfaces of Conjugated Molecules. 1. Formulation and Parametrization“: A. Warshel, M. Karplus, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 5612–5625.
- [18] „Quantum-Mechanical Consistent Force-Field (Qcuff/Pi) Method - Calculations of Energies, Conformations and Vibronic Interactions of Ground and Excited-States of Conjugated Molecules“: A. Warshel, *Isr. J. Chem.* **1973**, *11*, 709–717.
- [19] „Hen Egg-White Lysozyme Molecule“: D. C. Phillips, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1967**, *57*, 483–495.
- [20] „On the Nature of the Binding of Hexa-N-Acetyl Glucosamine Substrate to Lysozyme“: M. Levitt, *Pept. Polypept. Proteins* **1974**, 99–113.
- [21] „Energy Refinement of Hen Egg-White Lysozyme“: M. Levitt, *J. Mol. Biol.* **1974**, *82*, 393–420.
- [22] J. A. Pople, D. L. Beveridge, *Approximate Molecular Orbital Theory*, McGraw-Hill, New York, **1970**, S. 214.
- [23] „Microscopic Models for Quantum Mechanical Calculations of Chemical Processes in Solutions: LD/AMPAC and SCAAS/AMPAC Calculations of Solvation Energies“: V. Luzhkov, A. Warshel, *J. Comput. Chem.* **1992**, *13*, 199–213.
- [24] „Progress in Ab Initio QM/MM Free-Energy Simulations of Electrostatic Energies in Proteins: Accelerated QM/MM Studies of pK_a Redox Reactions and Solvation Free Energies“: S. C. L. Kamerlin, M. Haranczyk, A. Warshel, *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 1253–1272.
- [25] „Energetics of Enzyme Catalysis“: A. Warshel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1978**, *75*, 5250–5254.
- [26] „Electrostatic basis for enzyme catalysis“: A. Warshel, et al., *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3210–3235.
- [27] „Electrostatic Effects in Proteins“: M. F. Perutz, *Science* **1978**, *201*, 1187–1191.
- [28] „Calculations of Electrostatic Interactions in Biological Systems and in Solutions“: A. Warshel, S. T. Russell, *Q. Rev. Biophys.* **1984**, *17*, 283–421.
- [29] „Modeling electrostatic effects in proteins“: A. Warshel, P. K. Sharma, M. Kato, W. W. Parson, *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteomics* **2006**, *1764*, 1647–1676.
- [30] „Effective approach for calculations of absolute stability of proteins using focused dielectric constants“: S. Vicatos, M. Roca, A. Warshel, *Proteins Struct. Funct. Bioinf.* **2009**, *77*, 670–684.
- [31] „An Empirical Valence Bond Approach for Comparing Reactions in Solutions and in Enzymes“: A. Warshel, R. M. Weiss, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 6218–6226.
- [32] „Computer simulations of enzyme catalysis: Methods, progress, and insights“: A. Warshel, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2003**, *32*, 425–443.
- [33] „Exploring challenges in rational enzyme design by simulating the catalysis in artificial kemp eliminase“: M. P. Frushicheva, J. Cao, Z. T. Chu, A. Warshel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 16869–16874.
- [34] „Exploring, Refining, and Validating the Paradynamics QM/MM Sampling“: N. V. Plotnikov, A. Warshel, *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116*, 10342–10356.
- [35] „Quantitative exploration of the molecular origin of the activation of GTPase“: B. R. Prasad, N. V. Plotnikov, J. Lameira, A. Warshel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 20509–20514.
- [36] „Quantum chemistry ‘without orbitals’—An old idea and recent developments“: T. A. Wesolowski, *Chimia* **2004**, *58*, 311–315.
- [37] „Frozen Density-Functional Approach for Ab-Initio Calculations of Solvated Molecules“: T. A. Wesolowski, A. Warshel, *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 8050–8053.
- [38] „Semiclassical Trajectory Surface Hopping Approach to Non-adiabatic Molecular Collisions: The reaction of H⁺ with D₂“: J. C. Tully, R. M. Preston, *J. Phys. Chem.* **1971**, *55*, 562–572.
- [39] „Semiclassical Trajectory Approach to Photoisomerization“: A. Warshel, M. Karplus, *Chem. Phys. Lett.* **1975**, *32*, 11–17.
- [40] „Calculation of $\pi\pi^*$ Excited-State Conformations and Vibronic Structure of Retinal and Related Molecules“: A. Warshel, M. Karplus, *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 5677–5689.
- [41] „Nobel Prizes 2012: Cells and Sensitivity-GPCR Heroes Honored“: B. K. Kobilka, R. J. Lefkowitz, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 11361–11361; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 11199–11199.
- [42] „Bicycle-Pedal Model for 1st Step in Vision Process“: A. Warshel, *Nature* **1976**, *260*, 679–683.
- [43] „Direct Observation of the Femtosecond Excited-State *Cis-Trans* Isomerization in Bacteriorhodopsin“: R. A. Mathies, C. H. Brito Cruz, W. T. Pollard, C. V. Shank, *Science* **1988**, *240*, 777–779.
- [44] „Tracking the excited-state time evolution of the visual pigment with multiconfigurational quantum chemistry“: L. M. Frutos, T. Andrzejewski, F. Santoro, N. Ferré, M. Olivucci, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 7764–7769.
- [45] „Simulating the Dynamics of the Primary Charge Separation Process in Bacterial Photosynthesis“: S. Creighton, J. K. Hwang, A. Warshel, W. W. Parson, J. Norris, *Biochemistry* **1988**, *27*, 774–781.
- [46] „Energetics and kinetics of radical pairs in reaction centers from Rhodospirillum rubrum. A femtosecond transient absorption study“: A. R. Holzwarth, M. G. Muller, *Biochemistry* **1996**, *35*, 11820–11831.
- [47] „Control of Redox Potential of Cytochrome c and Microscopic Dielectric Effects in Proteins“: A. K. Churg, A. Warshel, *Biochemistry* **1986**, *25*, 1675.
- [48] „Energetics of Ion Permeation through Membrane Channels—Solvation of Na⁺ by Gramicidin-A“: J. Aqvist, A. Warshel, *Biophys. J.* **1989**, *56*, 171–182.
- [49] „A Guide to Monte Carlo for Statistical Mechanics: 2. Byways“: J. P. Valleau, G. M. Torrie in *Statistical Mechanics* (Hrsg.: B. Berne), Springer, New York, **1977**, S. 169–194.
- [50] „Calculations of Chemical Processes in Solutions“: A. Warshel, *J. Phys. Chem.* **1979**, *83*, 1640–1652.
- [51] „Dynamics of reactions in polar solvents. Semiclassical trajectory studies of electron-transfer and proton-transfer reactions“: A. Warshel, *J. Phys. Chem.* **1982**, *86*, 2218–2224.
- [52] „Simulating the Energetics and Dynamics of Enzymatic Reactions“: A. Warshel in *Specificity in Biological Interactions* (Hrsg.: C. Chagas, B. Pullman), Springer, Dordrecht, **1984**, S. 59–81.
- [53] „Monte-Carlo Simulation of Differences in Free-Energies of Hydration“: W. L. Jorgensen, C. Ravimohan, *J. Chem. Phys.* **1985**, *83*, 3050–3054.

- [54] „Free Energy Perturbation Calculations on Binding and Catalysis after Mutating Asn 155 in Subtilisin“: S. N. Rao, U. C. Singh, P. A. Bash, P. A. Kollman, *Nature* **1987**, 328, 551–554.
- [55] „Molecular dynamics simulations of biological reactions“: A. Warshel, *Acc. Chem. Res.* **2002**, 35, 385–395.
- [56] „Millisecond-long molecular dynamics simulations of proteins on a special-purpose machine“: D. E. Shaw, *Abstr. Pap. Am. Chem. Soc.* **2012**, 243, 0.
- [57] „Molecular Simulation of ab Initio Protein Folding for a Millisecond Folder NTL9(1–39)“: V. A. Voelz, G. R. Bowman, K. Beauchamp, V. S. Pande, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 1526–1528.
- [58] „Renormalizing SMD: The Renormalization Approach and Its Use in Long Time Simulations and Accelerated PAU Calculations of Macromolecules“: A. Dryga, A. Warshel, *J. Phys. Chem. B* **2010**, 114, 12720–12728.
- [59] „Nonequilibrium equality for free energy differences“: C. Jarzynski, *Phys. Rev. Lett.* **1997**, 78, 2690–2693.
- [60] „Coarse-grained (multiscale) simulations in studies of biophysical and chemical systems“: S. C. Kamerlin, S. Vicatos, A. Dryga, A. Warshel, *Ann. Rev. Phys. Chem.* **2011**, 62, 41–64.
- [61] „Renormalizing SMD: The Renormalization Approach and Its Use in Long Time Simulations and Accelerated PMF Calculations of Macromolecules“: A. Dryga, A. Warshel, *J. Phys. Chem. B* **2010**, 114, 12720–12728.
- [62] „Electrostatic origin of the mechanochemical rotary mechanism and the catalytic dwell of F1-ATPase“: S. Mukherjee, A. Warshel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, 108, 20550–20555.
- [63] „Energy transduction in the F-1 motor of ATP synthase“: H. Y. Wang, G. Oster, *Nature* **1998**, 396, 279–282.
- [64] „How subunit coupling produces the gamma-subunit rotary motion in F-1-ATPase“: J. Z. Pu, M. Karplus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, 105, 1192–1197.
- [65] „Direct observation of the rotation of F-1-ATPase“: H. Noji, N. Yasuda, M. Yoshida, K. Kinosita, Jr., *Nature* **1997**, 386, 299–302.
- [66] „Realistic simulations of the coupling between the protomotive force and the mechanical rotation of the F0-ATPase“: S. Mukherjee, A. Warshel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, 109, 14876–14881.
- [67] „Catalytic and mechanical cycles in F-ATP synthases—Fourth in the cycles review series“: P. Dimroth, C. von Ballmoos, T. Meier, *EMBO Rep.* **2006**, 7, 276–282.
- [68] „Torque generation and elastic power transmission in the rotary F0F1-ATPase“: W. Junge, H. Sialaff, S. Engelbrecht, *Nature* **2009**, 459, 364–370.
- [69] „On the energetics of translocon-assisted insertion of charged transmembrane helices into membranes“: A. Rychkova, S. Vicatos, A. Warshel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, 107, 17598–17603.
- [70] „Exploring the nature of the translocon-assisted protein insertion“: A. Rychkova, A. Warshel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, 110, 495–500.
- [71] „A biphasic pulling force acts on transmembrane helices during translocon-mediated membrane integration“: N. Ismail, R. Hedman, N. Schiller, G. von Heijne, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2012**, 19, 1018–1022.
- [72] „Imulating the pulling of stalled elongated peptide from the ribosome by the translocon S“: A. Rychkova, S. Mukherjee, R. B. Prasad, A. Warshel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, 110, 10195–10200.
- [73] „Realistic simulation of the activation of voltage-gated ion channels“: A. Dryga, S. Chakrabarty, S. Vicatos, A. Warshel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, 109, 3335–3340.
- [74] „Predicting drug-resistant mutations of HIV protease“: H. Ishikita, A. Warshel, *Angew. Chem.* **2008**, 120, 709–712; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 697–700.
- [75] „Validating the vitality strategy for fighting drug resistance“: N. Singh, M. P. Frushicheva, A. Warshel, *Proteins Struct. Funct. Bioinf.* **2012**, 80, 1110–1122.
- [76] „Electrostatic contributions to protein-protein binding affinities: Application to Rap/Raf interaction“: I. Muegge, T. Schweins, A. Warshel, *Proteins Struct. Funct. Genet.* **1998**, 30, 407–423.
- [77] „Why nature really chose phosphate“: S. C. L. Kamerlin, P. K. Sharma, R. B. Prasad, A. Warshel, *Q. Rev. Biophys.* **2013**, 46, 1–132.