

Quantenchemische und Molekulardynamische Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus von Phototropin



Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der Fakultät IV
-Chemie und Pharmazie-
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Christian Neiß
aus Landshut

Regensburg, 2003

Promotionsgesuch eingereicht am: 24. September 2003

Tag des Kolloquiums: 30. Oktober 2003

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Peter Saalfrank

Prüfungsausschuß: Vorsitzender: Prof. Dr. Hartmut Krienke

Erstgutachter: Prof. Dr. Peter Saalfrank

Zweitgutachter: Prof. Dr. Bernhard Dick

Drittprüfer: Prof. Dr. Claudia Steinem

Teile dieser Arbeit sind bereits veröffentlicht worden:

C. Neiss, P. Saalfrank, **Ab Initio Quantum Chemical Investigation of the First Steps of the Photocycle of Phototropin: A Model Study** in *Photochemistry and Photobiology* **77** (2003), 63–71

C. Neiss, P. Saalfrank, M. Parac, S. Grimme, **Quantum Chemical Calculation of Excited States of Flavin-Related Molecules** in *Journal of Physical Chemistry A* **107** (2003), 140–147

The scientific theorist is not to be envied. For nature, or more precisely experiment, is an inexorable and not very friendly judge of his work. It never says “Yes” to a theory. In the most favorable cases it says “Maybe”, and in the great majority of cases simply “No” . . . Probably every theory will some day experience its “No” – most theories, soon after conception. (A. Einstein, Nov. 11, 1922)

Vorwort

Diese Dissertation entstand in der Zeit von Oktober 2000 bis September 2003 am Lehrstuhl für Physikalische und Theoretische Chemie in der Arbeitsgruppe für Theoretische Chemie (Professor Saalfrank) der Universität Regensburg.

An dieser Stelle möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Peter Saalfrank, Herrn Prof. Dr. Bernhard Dick, und auch Herrn Prof. Dr. Peter Hegemann herzlich für die Themenstellung, die stete Betreuung und Diskussionsbereitschaft danken.

Besonders danken möchte ich Herrn Tilman Kottke, Herrn Alexander Botzki und Herrn Dr. Tillmann Klamroth für das freundschaftliche Arbeitsklima und viele sowohl fachliche als auch fachfremde Diskussionen und Gespräche, ohne die diese Arbeit nur schwerlich vorstellbar wäre.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Christian Huber, Frau Annika Hogekamp, Herrn Dr. Ivan Andrianov, Herrn Dr. Mathias Nest und Herrn Klaus Zireich für so manche Hilfestellung und das angenehme Arbeitsumfeld.

Herrn Prof. Dr. Stefan Grimme (Universität Münster) gilt mein Dank für die Zurverfügungstellung seines Multireferenz-DFT-Programms und einige Diskussionen.

Schließlich bedanke ich mich bei allen Mitgliedern des Lehrstuhls für Physikalische und Theoretische Chemie für die kollegiale Zusammenarbeit.

Meiner Familie und Martin Röhrl, Alexander Botzki, Britta Philipp und Ralf Pupkes gilt mein besonderer Dank für die Unterstützung außerhalb der Universität.

Nicht zuletzt möchte ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung danken.

Inhaltsverzeichnis

1 Einführung	1
2 Quantenchemische Methoden	7
2.1 Standard-Quantenchemie	8
2.1.1 Born-Oppenheimer-Näherung	8
2.1.2 Die Hartree-Fock-Methode	9
2.1.3 Basissätze	12
2.1.4 Elektronenkorrelation: CI und MCSCF	13
2.2 (Kohn-Sham-) Dichtefunktionaltheorie	16
2.3 Zeitabhängige Dichtefunktionaltheorie	19
2.4 Multireferenz-DFT	22
2.5 Umgebungseinflüsse: Reaktionsfeldmethoden	25
3 Ergebnisse der quantenchemischen Rechnungen	29
3.1 Grundzustandsrechnungen	29
3.2 Berechnung angeregter Zustände, Absorptionsspektren	36
3.2.1 Triplett-Zustände	36
3.2.2 Angeregte Zustände: Modell Uracil	39
3.2.3 Angeregte Zustände von Lumiflavin	44
3.2.4 Angeregte Zustände von Isolumazin	50
3.2.5 Adduktpektrum	52
3.3 Modellierung der Adduktbildung	54
3.3.1 Energetik der Adduktbildung in der Gasphase	54
3.3.2 Mögliche Primärschritte zur Adduktbildung	57

INHALTSVERZEICHNIS

3.3.3	Modellkomplexe in der Gasphase	59
3.3.4	Modellkomplexe in einem polarisierbaren Kontinuum	63
3.3.5	Energetik der Adduktbildung: Berücksichtigung von Aminosäureresten	65
3.3.6	Linear-Transit-Pfade	70
4	Molekulardynamische und Kraftfeld-Methoden	75
4.1	Kraftfeld	75
4.1.1	Das GROMOS96-Kraftfeld	76
4.1.2	Nichtbindende Wechselwirkungen	77
4.2	Molekulardynamik	79
4.2.1	Der Leap-Frog-Algorithmus	80
4.2.2	Nebenbedingungen	80
4.2.3	Temperatur- und Druckkopplung	81
4.3	Das CONCOORD-Verfahren	83
5	Molekulardynamische Rechnungen	85
5.1	Durchführung der Rechnungen	85
5.1.1	MD-Simulationen	85
5.1.2	CONCOORD-Rechnungen	88
5.2	Ergebnisse der molekulardynamischen Rechnungen	88
5.2.1	Vergleich der MD-Simulations-Trajektorien	88
5.2.2	Speziellere Analysen	95
5.2.3	Hauptkomponentenanalysen	98
6	Zusammenfassung	103
Anhang		107
Literaturverzeichnis		116

Kapitel 1

Einführung

Die Aufgaben von biologischen Photorezeptoren sind vielfältig: neben der Energiegewinnung durch Photosynthese bei Pflanzen sind viele Prozesse im Tier- und Pflanzenreich durch Licht gesteuert. Dennoch sind die meisten bekannten Photosensoren und die Regelkreisläufe, die sie steuern, bis heute weitgehend unverstanden oder unbekannt. Neben dem reinen Interesse, wie Licht Organismen beeinflusst, sind auch die mögliche Anwendbarkeit in der Medizin und/oder die Übertragbarkeit der Prinzipien auf künstliche Systeme weitere Motivationsgrundlagen, sich mit der Funktionsweise von Photorezeptoren näher zu beschäftigen.

Biologische Photorezeptoren können pragmatisch nach ihrer spektralen Empfindlichkeit in rotlichtempfindliche, wie zum Beispiel die Phytochrome [1] und Chlorophylle, und blaulichtempfindliche, beispielsweise Carotenoide, Photolyasen und die hierzu verwandten Chryptochrome [2–4], unterschieden werden. Insbesondere die erst vor einigen Jahren entdeckten sogenannten Phototropine [5, 6] sind in der letzten Zeit ins Zentrum des Interesses gerückt [7, 8], nachdem das entsprechende Gen isoliert worden ist, und die Expression in Wirtszellen möglich wurde [6, 9].

Die Phototropine – neuerdings auch *Phot* Proteine genannt [7] – sind Plasmamembran-assoziierte Proteine, die bei Bestrahlung mit Licht im blauen Spektralbereich phosphoryliert werden (das heißt, die (O–H)-Gruppe eines Serins oder Threonins wird in den entsprechenden Phosphorsäureester überführt) [5–7, 9] und neben dem Phototropismus [6, 9] (also dem Wachstum hin zum Licht, daher der Name des Proteins), die Spaltöffnungen [10] und die Chloroplastenverlagerung [11, 12] in Pflanzen auf noch nicht verstandenem Weg (mit)steuern. Die Analyse der Aminosäuresequenzen zeigt, dass alle Phototropine aus drei Untereinheiten bestehen (Abbildung 1.1), nämlich zwei sogenannten *LOV-Domänen*¹ (LOV1 und LOV2 ge-

¹LOV steht für light, oxygen, voltage. LOV-Domänen kommen auch in Proteinen mit anderen Funktionen vor [6]. Allen gemeinsam ist aber die Regulierbarkeit durch mindestens einen der Umgebungs faktoren Licht, Sauerstoffkonzentration und elektrisches Potential (Spannung).

Einführung



Abbildung 1.1: Sequenz-Schema eines typischen Phototropins mit den beiden LOV-Domänen und der Kinasedomäne.

nannt) und einer C-terminalen Kinaseregion, wo die Autophosphorylierung stattfindet [6, 9]. Jede LOV-Domäne besteht aus ca. 110 Aminosäuren und bindet ein Flavinmononukleotid-Molekül (FMN) nichtkovalent als prosthetische Gruppe [13]; weitere chromophore Gruppen kommen im Phototropin nicht vor. Somit scheint klar, dass die Anregung von FMN der Primärschritt bei der photochemischen Autophosphorylierung von Phototropin ist, und die LOV-Domänen der Ausgangspunkt für die weitere Signalkette sind. Unbekannt ist hingegen, wieso *zwei* LOV-Domänen vorhanden sind, und wie die Signalweitergabe innerhalb des Proteins erfolgt. Durch Mutationsexperimente an *Phot1* und *Phot2* von *Arabidopsis thaliana*, bei denen eine der beiden LOV-Domänen jeweils deaktiviert worden ist, konnte gezeigt werden, dass eine funktionierende LOV2-Domäne ausreicht, um die Kinase zu aktivieren; für LOV1 ist das hingegen nicht der Fall [14].

Die Kristallstrukturen der LOV2-Domäne von *Adiantum capillus-veneris* [15] und der LOV1-Domäne von *Chlamydomonas reinhardtii* zeigen die charakteristische Sekundärstruktur der sogenannten *PAS-Domänen* bestehend aus drei α -Helices mit dazwischenliegender kurzer 3_{10} -Helix,² und einer fünfsträngigen β -Faltblattstruktur (Abbildung 1.2).³ PAS-Domänen sind ein gängiges Motiv, über das sich Proteine zu Dimeren aneinanderlagern, enthalten im allgemeinen aber kein chromophores Molekül.

Ebenfalls auf Grund von Mutationsexperimenten an einzelnen LOV-Domänen konnte ein zum FMN benachbartes Cystein als wesentlich zur Funktionalität identifiziert werden [16]: Während bei der Bestrahlung der Wildtyp-LOV-Domäne ein metastabiles Photoprodukt entsteht, wie man durch Änderung des UV/VIS-Absorptionsspektrums leicht sehen kann, ist dies bei mutierten LOV-Domänen, in denen Cystein durch Alanin ersetzt wurde, nicht der Fall. Durch Vergleich des Photoproduktspektrums mit Literaturspektren, sagten Salomon und Mitarbeiter die Reaktion des Flavinkerns mit der benachbarten Cystein-Einheit zu einem „Flavin-

²Bei einer 3_{10} -Helix besteht eine Windung aus drei Aminosäureeinheiten bzw. zehn Atomen, die das Rückgrat bilden. Sie ist somit enger gewunden als die α -Helix, die man in dieser Nomenklatur als $3_{10}13$ -Helix bezeichnet.

³Die Abkürzung PAS setzt sich aus den Namen für verschiedene Proteine zusammen; diese sind *Drosophila* period PER, vertebrate aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator ARNT, und *Drosophila* single-minded SIM.

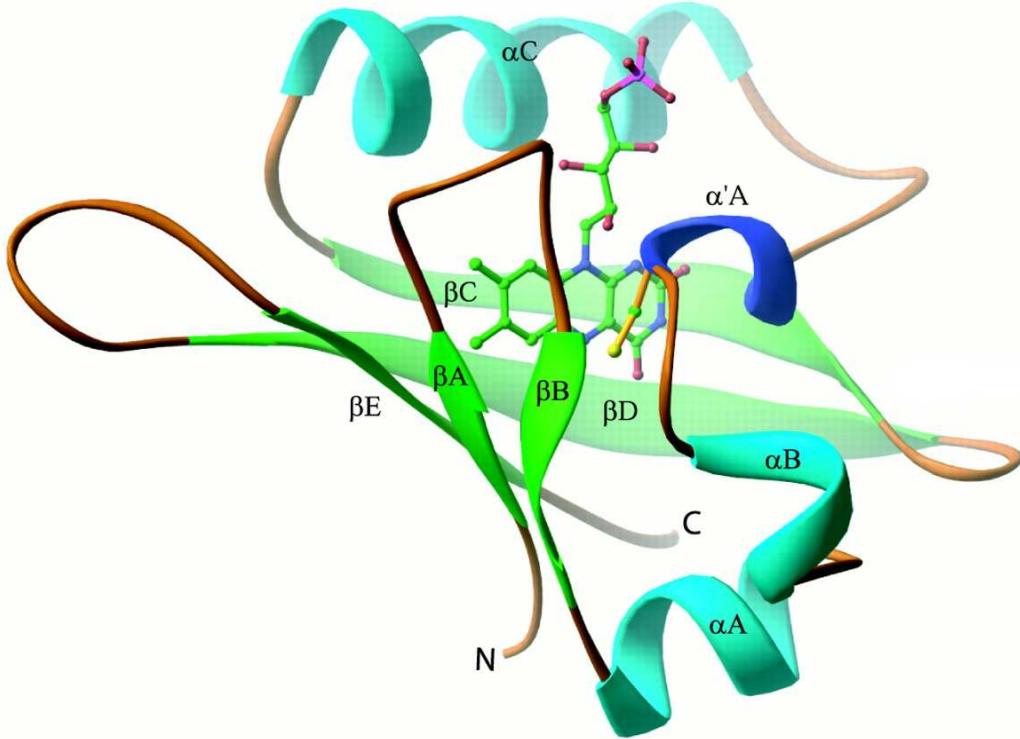


Abbildung 1.2: Kristallstruktur der LOV2-Domäne von *Adiantum capillus-veneris* aus Ref. [15]. Farbgebung der Atome (auch im weiteren verwendet): C = grün, N = blau, O = rot, S = gelb, P = pink; Farbgebung der Sekundärstruktur: α -Helix = hellblau, β -Faltblatt = grün, 3-Helix = dunkelblau. PDB-Code: 1G28.

Cysteinyl-C4a-Addukt“ voraus [16], vgl. Abbildung 1.3. Diese Spezies bildet sich thermisch mit Halbwertszeiten im Minutenbereich (zumindest bei einzeln exprimierten (das heißt, ohne die restlichen Domänen des *Phot*-Proteins erzeugten) LOV-Domänen) zum Edukt zurück, und der Zyklus kann viele Male durchlaufen werden. Diese Hypothese wurde inzwischen durch Kristallstrukturen im belichtetem Zustand der LOV2-Domäne des Frauenhaarfarns *Adiantum capillus-veneris* [17] und der LOV1-Domäne von *Chlamydomonas reinhardtii* [18] bestätigt.

Durch Blitzlichtphotolyse an LOV-Domänen [19, 20] konnte neben der „Adduktform“ eine weiteres Intermediat entdeckt werden, das als Tripletzustand des FMNs interpretiert worden ist. Dieser bildet sich innerhalb von einigen Nanosekunden nach Belichtung und bildet nach einigen weiteren Mikrosekunden die Adduktform des Proteins [19, 20]. Abbildung 1.3 fasst die gemessenen Daten für die LOV1-Domäne von *Chlamydomonas reinhardtii* zusammen. Die Existenz der Flavin-Cysteinyl-Verbindung in der belichteten Form der LOV-Domänen wurde des weiteren durch NMR- und IR/Raman-spektroskopische Untersuchungen bestätigt [21, 22].

Einführung

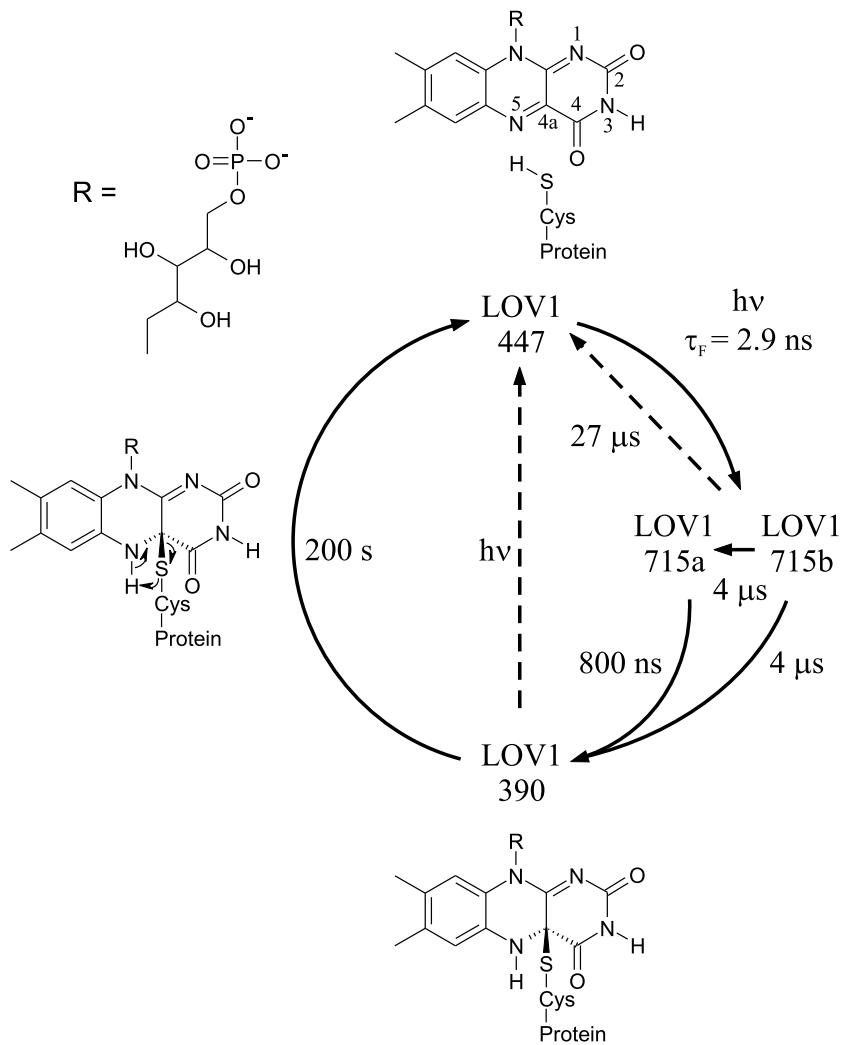


Abbildung 1.3: Gemessene Daten für den Photozyklus der LOV1-Domäne von *Chlamydomonas reinhardtii*, nach Ref. [19] (mit freundlicher Genehmigung von T. Kottke). Der Dunkelzustand LOV1 447 (die Bezeichnung leitet sich von der Wellenlänge der langwelligen UV/VIS-Absorptionsbande ab) wandelt sich bei Bestrahlung in LOV1 715a und LOV1 715b um, die zum Addukt LOV1 390 weiterreagieren. Möglicherweise liegt auch ein Gleichgewicht zwischen den beiden LOV1 715-Spezies vor. LOV1 715a und LOV1 715b werden als Triplettzustände gedeutet, die sich vermutlich ein wenig in der Konformation des Proteins unterscheiden. Die Adduktform lagert sich innerhalb einiger Minuten wieder in die Dunkelform um; bei Bestrahlung mit Licht wird die Rückreaktion beschleunigt, wie durch den gestrichelten Pfeil angedeutet.

Kürzlich sind weitere Untersuchungen an mutierten LOV-Domänen durchgeführt worden, bei denen Cystein durch eine andere Aminosäure ersetzt ist. Ersetzt man beispielsweise Cystein durch Serin, findet zwar die Bildung des Triplet-FMN statt, aber keine Adduktbildung [19]. EPR-Mesungen an einer Cystein→Alanin Mutante zeigten die Entstehung eines FMN-Radikals [23]; die Autoren vermuten auf Grund dessen einen radikalischen Mechanismus, wie er auch in der vorliegenden Arbeit postuliert wird, siehe auch [24].

Ziel dieser Doktorarbeit war es, in Kooperation mit Experimentatoren zum Verständnis des Reaktionsmechanismus der Adduktbildung beizutragen. Des Weiteren wurden die Auswirkungen der Adduktbildung auf die restliche LOV-Domäne unter Benutzung von Molekulardynamik-Methoden untersucht, um möglicherweise die Signalfortpflanzung in den LOV-Domänen zu verstehen. Die Arbeit gliedert sich folgendermaßen:

In Kapitel 2 werden die quantenchemischen Methoden vorgestellt, die im darauffolgenden Kapitel verwendet werden.

Die Kapitel 3.1 und 3.2 beschäftigen sich mit der Berechnung von Grund- und angeregten Zuständen von Flavinen und ähnlichen Molekülen. Die erhaltenen Ergebnisse werden mit den experimentellen Befunden verglichen. In Kapitel 3.3 wird darauf aufbauend der Mechanismus der Adduktbildung untersucht.

Kapitel 4 liefert die Grundlagen zum Verständnis der in Kapitel 5 beschriebenen Molekulardynamik-(MD)-Simulationen der Dunkel- und Adduktform einer LOV-Domäne.

Schließlich folgt in Kapitel 6 eine Zusammenfassung der Arbeit.

Kapitel 2

Quantenchemische Methoden

Die fundamentale Gleichung der nichtrelativistischen Quantentheorie ist die *zeitabhängige Schrödinger-Gleichung*:

$$i\hbar\dot{\Psi} = \hat{H}\Psi \quad (2.1)$$

Ψ ist die (Gesamt-)Wellenfunktion des durch den Energieoperator/Hamiltonoperator \hat{H} beschriebenen Systems. Typischerweise besitzt dieser für N beliebige Teilchen die folgende Form:

$$\hat{H} = \sum_{i=1}^N -\frac{\hbar^2}{2m_i} \Delta_i + V(\{\mathbf{r}_i\}) \quad (2.2)$$

mit $\Delta_i = \partial^2/\partial x_i^2 + \partial^2/\partial y_i^2 + \partial^2/\partial z_i^2$ (Laplace-Operator) und $\{\mathbf{r}_i\}$ als Gesamtheit aller Ortskoordinaten. Der erste Summand beschreibt die kinetische Energie, der zweite die Wechselwirkung zwischen den Teilchen. \hat{H} kann zudem auch von den Spinkoordinaten $\{s_i\}$ und der Zeit – beispielsweise durch Ankopplung eines elektromagnetischen externen Felds – abhängen. Ebenso hängt die Wellenfunktion Ψ im allgemeinen von allen Orts- und Spinkoordinaten und der Zeit ab: $\Psi = \Psi(\{\mathbf{r}_i, s_i\}, t) =: \Psi(\{\mathbf{x}_i\}, t)$, wobei $\{\mathbf{x}_i\}$ die Gesamtheit der Orts- und Spinkoordinaten darstellen soll.

Im Falle eines zeitunabhängigen Hamiltonoperators kann die Schrödinger-Gleichung (2.1) unter Verwendung eines Separationsansatzes in einen rein zeitabhängigen und einen zeitunabhängigen Teil zerlegt werden:

$$\Psi(\{\mathbf{x}_i\}, t) = \Phi(\{\mathbf{x}_i\}) \cdot \phi(t) \quad (2.3)$$

$$\Rightarrow \frac{\hat{H}\Phi(\{\mathbf{x}_i\})}{\Phi(\{\mathbf{x}_i\})} = \frac{i\hbar\dot{\phi}(t)}{\phi(t)} = \text{const.} =: E \quad (2.4)$$

$$i\hbar\dot{\phi}(t) = E \cdot \phi(t) \quad (2.5)$$

$$\hat{H}\Phi(\{\mathbf{x}_i\}) = E \cdot \Phi(\{\mathbf{x}_i\}) \quad (2.6)$$

Quantenchemische Methoden

E ist der sogenannte Separationsparameter; da \hat{H} aber der Energieoperator des Systems ist, stellt E einfach die Gesamtenergie dar. Es zeigt sich, dass (2.6) im allgemeinen nur für bestimmte Werte von E Lösungen besitzt. Die damit verbundenen Eigenfunktionen $\Phi(\{\mathbf{x}_i\})$ bzw. $\Psi(\{\mathbf{x}_i\}, t)$ sind die sogenannten stationären Zustände des Systems. Durch Linearkombination der $\Psi(\{\mathbf{x}_i\}, t)$ lassen sich dann auch alle nicht-stationären Zustände des Systems beschreiben, womit der Lösung von Gleichung (2.6) eine besondere Rolle zufällt; Gleichung (2.6) ist die *zeitunabhängige Schrödinger-Gleichung* und stellt die Grundlage für die kommenden Abschnitte dar.

2.1 Standard-Quantenchemie

Im folgenden wird zunächst die „Standard-Quantenchemie“, das heißt, die auf der noch zu besprechenden Hartree-Fock-Methode beruhenden quantenchemischen Verfahren (inklusive Post-Hartree-Fock), besprochen [25]. Dabei wird ein System mit N Elektronen (Masse m_e , für alle gleich) und N_A Kernen (Masse M_A) betrachtet, die über Coulombkräfte miteinander wechselwirken. Der Hamiltonoperator lautet dann in atomaren Einheiten ($m_e = \hbar = e = 4\pi\varepsilon_0 = 1$):

$$\hat{H}(\{\mathbf{r}_i\}, \{\mathbf{R}_A\}) = \underbrace{-\frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \Delta_i}_{\hat{T}_e} - \underbrace{\frac{1}{2} \sum_{A=1}^{N_A} \frac{1}{M_A} \Delta_A}_{\hat{T}_K} + \underbrace{\sum_{i=1}^N \sum_{j>i}^N \frac{1}{r_{ij}}}_{\hat{V}_{ee}(\{\mathbf{r}_i\})} + \underbrace{\sum_{A=1}^{N_A} \sum_{B>A}^{N_A} \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}}}_{\hat{V}_{KK}(\{\mathbf{R}_A\})} - \underbrace{\sum_{i=1}^N \sum_{A=1}^{N_A} \frac{Z_A}{r_{iA}}}_{\hat{V}_{eK}(\{\mathbf{r}_i\}, \{\mathbf{R}_A\})} \quad (2.7)$$

$\{\mathbf{r}_i\}$ bezeichnet die Ortskoordinaten der Elektronen, $\{\mathbf{R}_A\}$ die der Kerne, und $r_{ij} = |\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j|$.

2.1.1 Born-Oppenheimer-Näherung

Im Rahmen der *Born-Oppenheimer-Näherung* lässt sich die resultierende zeitunabhängige Schrödinger-Gleichung in einen „elektronischen“ Anteil und einen „Kernanteil“ zerlegen, wenn man annimmt, dass sich die Elektronen auf Grund ihrer wesentlich kleineren tragen Masse sofort an jede Kernkonfiguration anpassen, und im Gegenzug die Kerne effektiv nur das gemittelte Feld der Elektronen „spüren“. Damit geht (2.6) über in folgendes Gleichungssystem (*adiabatische Näherung*):

$$\Phi(\{\mathbf{x}_i\}, \{\mathbf{X}_A\}) = \Phi_e(\{\mathbf{x}_i\}; \{\mathbf{X}_A\}) \cdot \Phi_K(\{\mathbf{X}_A\}) \quad (2.8)$$

$$[\hat{T}_e + \hat{V}_{ee} + \hat{V}_{eK}] \Phi_e(\{\mathbf{x}_i\}; \{\mathbf{X}_A\}) = E_e(\{\mathbf{X}_A\}) \cdot \Phi_e(\{\mathbf{x}_i\}; \{\mathbf{X}_A\}) \quad (2.9)$$

$$[\hat{T}_K + \hat{V}_{KK} + E_e(\{\mathbf{X}_A\})] \Phi_K(\{\mathbf{X}_A\}) = E \cdot \Phi_K(\{\mathbf{X}_A\}) \quad (2.10)$$

Das heißt, man löst zuerst die *elektronische Schrödinger-Gleichung* (2.9) in den Elektronenkoordinaten $\{\mathbf{x}_i\}$; die Kernkoordinaten $\{\mathbf{X}_A\}$ werden dabei als Parameter behandelt. Mit den so erhaltenen elektronischen Energien $E_e(\{\mathbf{X}_A\})$ geht man dann in die *Kern-Schrödinger-Gleichung* (2.10);¹ die Summe $V_{KK} + E$ als Funktion der Kernkoordinaten heißt *Potentialfläche*.

Die Born-Oppenheimer-Näherung ermöglicht so die Trennung zwischen elektronischen und Kernzuständen. Im weiteren wird die Berechnung der elektronischen Zustände behandelt.

2.1.2 Die Hartree-Fock-Methode

Auch die elektronische Schrödinger-Gleichung (2.9), (2.11)²

$$\left[-\frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \Delta_i + \sum_{i=1}^N \sum_{j>i}^N \frac{1}{r_{ij}} - \sum_{i=1}^N \sum_{A=1}^{N_A} \frac{Z_A}{r_{iA}} \right] \Phi(\{\mathbf{x}_i\}) = E \cdot \Phi(\{\mathbf{x}_i\}) \quad (2.11)$$

ist im allgemeinen nicht ohne weitere Annahmen bzw. Näherungen lösbar (die man aber systematisch verbessern kann).

Als Ansatz für die Wellenfunktion wählt man eine *Slaterdeterminante*:

$$\Phi(\{\mathbf{x}_i\}) = \frac{1}{\sqrt{N!}} \begin{vmatrix} \varphi_1(\mathbf{x}_1) & \varphi_1(\mathbf{x}_2) & \dots & \varphi_1(\mathbf{x}_N) \\ \varphi_2(\mathbf{x}_1) & \varphi_2(\mathbf{x}_2) & \dots & \varphi_2(\mathbf{x}_N) \\ \vdots & \vdots & & \vdots \\ \varphi_N(\mathbf{x}_1) & \varphi_N(\mathbf{x}_2) & \dots & \varphi_N(\mathbf{x}_N) \end{vmatrix} \quad (2.12)$$

Im Falle ohne Elektron-Elektron-Wechselwirkung (d. h. $\hat{V}_{ee} = 0$) ist die exakte Lösung von (2.11) eine Slaterdeterminante. Die φ_k heißen *Spinorbitale*. Die Form der Slaterdeterminante leitet sich aus einem Produktansatz für die Wellenfunktion ab (*Hartreeprodukt*); durch Anwendung des Permutationsoperators wird die Antisymmetrie bezüglich des Vertauschens zweier Elektronen sichergestellt (*Pauli-Antisymmetrieprinzip*). Durch Einsetzen von (2.12) in (2.11) erhält man unter der Nebenbedingung, dass die Spinorbitale zueinander orthonormiert sind und der Forderung nach möglichst niedriger Energie E (\Rightarrow Grundzustand) durch Variationsrechnung die *Hartree-Fock-Gleichungen* (2.13):

$$\left\{ \hat{h}(\mathbf{x}_i) + \sum_{l=1}^N \left[\hat{J}_l(\mathbf{x}_i) - \hat{K}_l(\mathbf{x}_i) \right] \right\} \varphi_k(\mathbf{x}_i) = \epsilon_k \varphi_k(\mathbf{x}_i), \quad (2.13)$$

¹In der Praxis wird allerdings der Spin der Kerne bei den Berechnungen nicht berücksichtigt, da Austauschterme zwischen Kernen vernachlässigbar klein sind.

²Zur Vereinfachung lassen wir die Kernkoordinaten und den Index e weg.

Quantenchemische Methoden

bzw. kurz

$$\hat{f}(\mathbf{x}_i)\varphi_k(\mathbf{x}_i) = \epsilon_k \varphi_k(\mathbf{x}_i). \quad (2.14)$$

\hat{f} ist der Fock-Operator. Die in Gl. (2.13) auftretenden Operatoren sind definiert als

$$\hat{h}(\mathbf{x}_i)\varphi_k(\mathbf{x}_i) = \left[-\frac{1}{2}\Delta_i - \sum_{A=1}^{N_A} \frac{Z_A}{r_{iA}} \right] \varphi_k(\mathbf{x}_i) \quad (2.15)$$

$$\hat{J}_l(\mathbf{x}_i)\varphi_k(\mathbf{x}_i) = \left[\int \varphi_l^*(\mathbf{x}_j) \frac{1}{r_{ij}} \varphi_l(\mathbf{x}_j) d\mathbf{x}_j \right] \varphi_k(\mathbf{x}_i) \quad (2.16)$$

$$\hat{K}_l(\mathbf{x}_i)\varphi_k(\mathbf{x}_i) = \left[\int \varphi_l^*(\mathbf{x}_j) \frac{1}{r_{ij}} \varphi_k(\mathbf{x}_j) d\mathbf{x}_j \right] \varphi_l(\mathbf{x}_i). \quad (2.17)$$

Die Integration erfolgt dabei über den gesamten Orts-Spin-Raum. Die Hartree-Fock-Gleichungen besitzen unendlich viele Lösungen, die als Eigenfunktionen eines hermiteschen Operators³ ein vollständiges orthonormiertes Funktionensystem bilden, was weiter unten noch von besonderer Bedeutung sein wird. Die Determinante, die die Näherung für die Grundzustandswellenfunktion darstellt, besteht aus den N Spinorbitalen, die zu den N niedrigsten Orbitalenergien ϵ_i gehören.

Da der Hamiltonoperator in (2.11) unabhängig von den Spinkoordinaten ist, kann man die Spinabhängigkeit der Orbitale durch Integration eliminieren, indem man wieder von einem Produktansatz ausgeht:

$$\varphi_k(\mathbf{x}_i) = \psi_k(\mathbf{r}_i) \cdot \gamma_k(s_i) \quad (2.18)$$

Dies setzt man in (2.13) ein und führt die Integration über die Spinvariablen durch, was leicht möglich ist, da γ ja nur die Spineigenfunktionen α oder β annehmen kann.⁴ Nimmt man dabei den sogenannten *closed shell* Fall an, d. h. es liegt eine gerade Anzahl von Elektronen vor, die jeweils paarweise dasselbe Raumorbital ψ besetzen, spricht man von der *Restricted-Hartree-Fock-(RHF)*-Methode. Sitzen einige Elektronen in nicht paarweise besetzten Raumorbitalen (z. B. Radikale, Triplettzustände), dann spricht man von der *Restricted-Open-Hartree-Fock-(ROHF)*-Methode. Geht man hingegen davon aus, dass alle Elektronen unterschiedliche Raumorbitale haben können, hat man es mit der *Unrestricted-Hartree-Fock*-Methode zu tun.

Wie erhält man nun aber praktisch die Eigenfunktionen aus (2.13)? Wie man sieht, hängen alle Gleichungen voneinander ab (jedes Orbital hängt von allen anderen ab). Daher kann man die Lösung nur iterativ finden, d. h., indem man sich einen Satz von N besetzten Startorbitalen, den „Guess“, vorgibt. Dieser wird in (2.13) eingesetzt und damit ein neuer, hoffentlich „besserer“ Satz von Orbitalen ausgerechnet. Das ganze wird so lange wiederholt, bis sich sowohl die Orbitale, als auch die Energie

³Der Hartree-Fock-Operator ist ebenso wie der Hamiltonoperator hermitesch.

⁴Es gilt (s in atomaren Einheiten (Vielfache von \hbar)): $\alpha(\frac{1}{2}) = 1, \alpha(-\frac{1}{2}) = 0, \beta(\frac{1}{2}) = 0, \beta(-\frac{1}{2}) = 1$

2.1 Standard-Quantenchemie

E der Slaterdeterminante (2.12) praktisch nicht mehr ändern, also Konvergenz erreicht worden ist. Diese Vorgehensweise nennt man die *Self-Consistent-Field-(SCF)-Methode*. Wie man sich schon denken kann, hängt die Effizienz dieser Vorgehensweise stark von der Qualität der Startwellenfunktion ab. In der Praxis wird diese meist durch eine einfache Extended-Hückel-Rechnung, eventuell mit anschließender CNDO-Rechnung⁵ (oder ähnlichem) bestimmt, was dann eine bereits „voroptimierte“ Elektronendichte liefert. Zudem schränkt man in der Praxis die räumlichen Freiheitsgrade der Elektronen insofern ein, dass man einen endlich großen *Basissatz* zur Berechnung der Orbitale zugrunde legt, der kein vollständiges Funktionensystem ist und die Orbitale ψ als Linearkombinationen dieser Basisfunktionen darstellt (*Linear Combination of Atomic Orbitals-(LCAO)-Methode*), also

$$\psi_i = \sum_{\nu=1}^K C_{\nu i} \phi_{\nu}, \quad (2.19)$$

mit K = Anzahl der Basisfunktionen und $\{\phi_{\nu}\}$ als Menge der Basisfunktionen (ϕ_{ν} nicht mit $\phi(t)$ aus Gl. (2.3) verwechseln!). Eingesetzt in die Hartree-Fock-Gleichungen (2.13) erhält man nach Multiplikation mit ϕ_{μ}^* von links und anschließender Integration über den gesamten Orts-Spin-Raum im Fall eines RHF-Ansatzes die *Roothaan-Hall-Gleichungen*

$$\sum_{\nu=1}^K C_{\nu i} F_{\mu\nu} = \epsilon_i \sum_{\nu=1}^K C_{\nu i} S_{\mu\nu}, \quad (2.20)$$

wobei

$$F_{\mu\nu} = \int_{\mathbb{R}^3} d\mathbf{r} \phi_{\mu}^*(\mathbf{r}) \hat{f}(\mathbf{r}) \phi_{\nu}(\mathbf{r}) \quad (2.21)$$

$$S_{\mu\nu} = \int_{\mathbb{R}^3} d\mathbf{r} \phi_{\mu}^*(\mathbf{r}) \phi_{\nu}(\mathbf{r}) \quad (2.22)$$

Gleichung (2.20) lässt sich als Matrixgleichung zur Bestimmung der Entwicklungskoeffizienten $\{\mathbf{C}_i\}$ (wobei der Vektor \mathbf{C}_i die Entwicklungskoeffizienten des i -ten Orbitals enthält) und der Orbitalenergien $\{\epsilon_i\}$ schreiben:

$$\mathbf{F}\mathbf{C}_i = \epsilon_i \mathbf{S}\mathbf{C}_i, \quad (2.23)$$

was man wiederum in ein gewöhnliches Matrixeigenwertproblem umformen kann (nicht vorgeführt). Die *Fockmatrix* \mathbf{F} und *Überlappmatrix* \mathbf{S} sind durch die oben angegebenen Matrixelemente $F_{\mu\nu}$ bzw. $S_{\mu\nu}$ definiert.

⁵Complete Neglect of Differential Overlap, semiempirisches Verfahren.

2.1.3 Basissätze

Als Basissatz für die Berechnung einzelner Moleküle verwendet man normalerweise eine nichtorthogonale Basis atomzentrierter Funktionen, die an Atomorbitale erinnern. Während einige Programme (z. B. ADF [26]) die theoretisch zu bevorzugenden Slaterfunktionen (Slater Type Orbitals, STOs) mit einfach exponentiellem Anteil benutzen, nutzt die Mehrzahl der Quantenchemieprogramme kartesische Gaußfunktionen (Gaussian Type Orbitals, GTOs); die allgemeine Form *primitiver Gaußfunktionen* lautet:

$$g(x, y, z) = Nx^{n_x}y^{n_y}z^{n_z}e^{-\alpha(x^2+y^2+z^2)} \quad (2.24)$$

Dabei sind $n_x, n_y, n_z \in \mathbb{N}_0$ natürliche Zahlen, die die Winkelabhängigkeit und damit den Drehimpuls der Basisfunktion bestimmen. Den Nachteil des falschen Grenzverhaltens für $r \rightarrow 0$ und $r \rightarrow \infty$ gleicht man dadurch aus, dass man *kontrahierte Gaußfunktionen* benutzt, die eine so gewählte Linearkombination von L primitiven Gaußfunktionen (L typischerweise drei bis sechs) darstellen, dass eine Slaterfunktion möglichst gut angenähert wird:

$$\phi_\mu(\mathbf{r}) = \sum_{k=1}^L d_{\mu k} g_k(\mathbf{r}) \quad (2.25)$$

Der Grund, warum GTOs gegenüber STOs im allgemeinen bevorzugt werden, liegt in der einfacheren mathematischen Handhabung dieser Funktionen. So müssen im Laufe einer quantenchemischen Rechnung oft Integrale über Produkte von Basisfunktionen berechnet werden (Ein- und Zweielektronenintegrale), die man in einer GTO-Basis analytisch ausrechnen kann. Man spart sich also zeitraubende und eventuell ungenaue numerische Integrationen.

Je nachdem, wieviele und welche Orbitale einem Atom zur Verfügung gestellt werden, werden verschiedene Qualitäten von Basissätzen unterschieden. *Minimalbasen* enthalten nur eine Kontraktion für jedes im freien Atom besetzte Raumorbital, sowie für jedes unbesetzte Valenzorbital. Ein typisches Beispiel ist der Basissatz STO-3G, bei dem jedes Basisorbital aus einem kontrahierten GTO, das seinerseits aus drei primitiven Gaußfunktionen zusammengestzt ist, besteht. Bessere Ergebnisse erzielt man aber mit den (*double-, triple-, ...*) ζ -*Basissätzen*. In einer double- ζ -Basis beispielsweise wird jedes Atomorbital durch zwei kontrahierte GTOs repräsentiert; die Anzahl der Funktionen wird somit verdoppelt. Sehr beliebt sind in diesem Zusammenhang sogenannte *split valence* Basissätze, wo nur die Valenzorbitale in double-(triple-, ...) ζ -Qualität vertreten sind. Beispiel für einen double- ζ -Basissatz ist 6-31G, dessen Rumpfatomorbitale jeweils aus einer mit sechs primitiven GTOs kontrahierten Gaußfunktion bestehen, und die Valenzorbitale je durch eine aus drei primitiven GTOs linearkombinierte Funktion *und* eine einfache primitive Gaußfunktion beschrieben werden. Schließlich kann man noch *Polarisations-* und

diffuse Funktionen zum Basissatz hinzufügen, die man benötigt, um polare Moleküle (→ Polarisationsfunktionen) und Moleküle mit weit in den Raum reichender Elektronendichte (→ diffuse Funktionen), z. B. Anionen, gut beschreiben zu können. Da beides oft für angeregte Zustände der Fall ist, ist die Verwendung dieser Funktionen insbesondere dann angezeigt. Als Beispiel für einen Basissatz mit Polarisationsfunktionen sei die 6-31G*-Basis genannt, die für alle Atome außer die der ersten Periode (H, He) neben den zuvor genannten Funktionen noch einen Satz mit Orbitalen mit höherem Drehimpuls als der höchste in 6-31G vorkommende enthält, vertreten mit einer primitiven Gaußfunktion pro Atomorbital (also für Hauptgruppenelemente einen Satz d-Orbitale, für Nebengruppenelemente einen Satz f-Orbitale). Basissätze mit diffusen Funktionen beinhalten einen zusätzlichen Satz an Valenzorbitalen mit kleinem Exponenten in der Exponentialfunktion, z. B. die 6-31+G-Basis.

2.1.4 Elektronenkorrelation: CI und MCSCF

Man kann die Hartree-Fock-Näherung so verstehen, dass die exakte Elektronen-Elektron-Wechselwirkung durch ein effektives Potential ersetzt wird, so dass jedes Elektron nur noch ein gemitteltes Feld der übrigen Elektronen spürt. Dabei wird vernachlässigt, dass die Bewegung der Elektronen nicht voneinander unabhängig ist, sondern korreliert. Die exakte Energie des Systems liegt dadurch immer tiefer als durch die Hartree-Fock-Theorie vorhergesagt, was auch im Einklang mit dem Variationsprinzip steht. Den Unterschied zwischen tatsächlicher und Hartree-Fock-Energie nennt man *Korrelationsenergie*:

$$E_{corr} = E_{exakt} - E_{HF} \quad (2.26)$$

Um die Korrelationsenergie und damit verbundene Änderungen in der Elektronenverteilung zumindest näherungsweise erfassen zu können, sind mehrere Ansätze erdacht worden, darunter CI (Konfigurationswechselwirkung), Møller-Plesset-Störungstheorie, MCSCF (multikonfigurationales SCF), MRCI (Multireferenz-CI), und nicht zuletzt dichtefunktionaltheoretische Methoden, auf die im Kapitel 2.2 näher eingegangen wird. An dieser Stelle soll erst einmal nur CI und MCSCF besprochen werden.

Da der Hartree-Fock-Operator, wie schon erwähnt, hermitesch ist, bilden seine Eigenfunktionen ein vollständiges Orthonormalsystem, d. h. insbesondere, dass auch die Menge aller davon abgeleiteten Slaterdeterminanten (also aufgebaut aus den kanonischen Hartree-Fock-Orbitalen φ_k) ein vollständiges Funktionensystem für den N -Teilchenraum bilden. Die *exakte* elektronische Wellenfunktion (und zwar sowohl die für den Grundzustand, als auch die aller angeregten Zustände) muss sich

Quantenchemische Methoden

also als Linearkombination von Slaterdeterminanten schreiben lassen:⁶

$$\Phi = c_0 \Phi_0 + \sum_a \sum_r c_a^r \Phi_a^r + \sum_{a < b} \sum_{r < s} c_{ab}^{rs} \Phi_{ab}^{rs} + \sum_{a < b < c} \sum_{r < s < t} c_{abc}^{rst} \Phi_{abc}^{rst} + \dots \quad (2.27)$$

Dabei bedeutet Φ_0 die Grundzustandsdeterminante (die sogenannte *Referenz*), Φ_a^r eine „einfach angeregte“ Slaterdeterminante, bei der ein Elektron aus dem ursprünglich besetzten Orbital a in das virtuelle Orbital r gesetzt wurde. Entsprechend bezeichnet Φ_{ab}^{rs} eine „zweifach angeregte“ Konfiguration usf. Die Entwicklungskoeffizienten $\{\mathbf{c}_i\}$ (i bezeichnet den elektronischen Zustand, der Vektor \mathbf{c}_i enthält die entsprechenden Entwicklungskoeffizienten) werden über lineare Variationsrechnung bestimmt [25, 27], was ähnlich wie bei den Roothaan-Hall-Gleichungen auf ein Matrixeigenwertproblem führt:

$$\mathbf{H}\mathbf{c}_i = E_i \mathbf{c}_i, \quad (2.28)$$

mit

$$H_{ij} = \langle \Phi_i | \hat{H} | \Phi_j \rangle \quad (2.29)$$

Gleichung (2.28) wird oft noch etwas umgeformt auf⁷

$$(\mathbf{H} - E_0 \mathbf{1}) \mathbf{c}_i = (E - E_0) \mathbf{c}_i \quad (2.30)$$

wobei $E_0 := \langle \Phi_0 | \hat{H} | \Phi_0 \rangle$ ist. Durch die Diagonalisierung der CI-Matrix erhält man dann Grund- und angeregte Zustände des Systems.

Berücksichtigt man bei dieser Rechnung alle (bei dem verwendeten Basissatz) möglichen angeregten Slaterdeterminanten, spricht man von einem *full CI*, was aber nur für sehr kleine Moleküle bzw. Basissätze durchführbar ist. In der Praxis wird meist nur ein Teil der Konfigurationen berücksichtigt; beispielsweise neben der Grundzustandsdeterminante nur einfach angeregte Konfigurationen (*Configuration Interaction with Singles*, CIS), oder einfach und zweifach angeregte Konfigurationen (*Configuration Interaction with Singles and Doubles*, CISD), etc.

Anhand des CI-Bildes lassen sich auch die Begriffe *statische Korrelation* und *dynamische Korrelation* gut erklären. Besteht die CI-Entwicklung aus nur einer führenden Konfiguration, so beschreiben die übrigen Konfigurationen die dynamische Korrelation. Statische Korrelation liegt vor, wenn zwei oder mehr Konfigurationen mit Gewichtungsfaktoren derselben Größenordnung die CI-Reihe anführen; diese müssen demzufolge energetisch nahe beieinander liegen und dieselbe Symmetrie besitzen. Wie man daraus ableiten kann, lassen sich Zustände mit starker statischer Korrelation prinzipiell nur unzureichend durch (R)HF beschreiben, da

⁶Es sei nur nebenbei angemerkt, dass neben den kanonischen Hartree-Fock-Orbitalen natürlich auch andere – u. U. besser geeignete – Funktionen verwendet werden können, beispielsweise Kohn-Sham-Orbitale oder natürliche Orbitale.

⁷Diese Form wird in Kapitel 2.4 verwendet.

2.1 Standard-Quantenchemie

hier ja stets nur eine Konfiguration berücksichtigt wird. Umgekehrt liefert (R)HF bei Zuständen, die nur dynamische Korrelation aufweisen, meist schon qualitativ richtige Wellenfunktionen.

Weil der Hamiltonoperator in (2.11) nicht von Spinkoordinaten abhängt, muß sich die exakte Wellenfunktion als Produkt von Raum- und Spinwellenfunktion schreiben lassen, und die exakte Wellenfunktion muss Eigenfunktion zu den Operatoren \hat{S}_z und \hat{S}^2 sein. Für eine Slaterdeterminante ist das aber nicht allgemein erfüllt, sondern nur, wenn a) die Slaterdeterminante vom R(O)HF-Typ ist, und b) alle ungepaarten Elektronen parallelen Spin haben. UHF-Wellenfunktionen sind hingegen keine Eigenfunktion zu \hat{S}^2 (es sei denn, das UHF-Ergebnis stimmt mit dem RHF-Ergebnis überein), und die Abweichung des $\langle \hat{S}^2 \rangle$ -Erwartungswerts vom $\langle \hat{S}^2 \rangle$ -Sollwert kann als Gradmesser für die *Spinverunreinigung* und damit als Indiz für die „Physikalität“ der Wellenfunktion genommen werden; bei Abweichungen größer als 0,1 sollten die Ergebnisse besonders kritisch begutachtet werden. Um diesen Problemen von vorneherein zu entgehen, verwendet man für CI-Rechnungen meistens Konfigurationen vom R(O)HF-Typ, die entweder schon von Haus aus Eigenfunktionen zu \hat{S}^2 sind, oder durch kurze Linearkombinationen zu solchen gemacht werden können. Man spricht von *spinadaptierten Konfigurationen* (Spin-Adapted Configurations, SACs) oder von *Konfigurationszustandsfunktionen* (Configuration State Functions, CSFs). Wenn man die CI-Entwicklung in solchen CSFs vornimmt, verringert sich auch gleich die Anzahl der zu betrachtenden Konfigurationen, da immer nur CSFs gleicher Multiplizität und gleicher irreduzibler Darstellung der molekularen Punktgruppe in eine CI-Entwicklung eingehen können. In der Praxis kommen dennoch neben CI-Entwicklungen mit Konfigurationszustandsfunktionen auch solche mit UHF-Referenzwellenfunktionen, z. B. UCIS [28, 29], und Slaterdeterminanten [30] vor.

Neben den CI-Koeffizienten $\{c_i\}$ ist es möglich, gleichzeitig die Orbitale, aus denen die Konfigurationen aufgebaut werden, derart zu optimieren, dass die Energie minimal wird, was insofern sinnvoll ist, weil die Hartree-Fock-Orbitale im allgemeinen nicht optimal für die CI-Entwicklung sind. Dieser Ansatz führt auf die *Multi-configuration Self-Consistent Field*-Methode, kurz MCSCF. Die meisten MCSCF-Rechnungen werden als *Complete Active Space Self-Consistent Field*-Berechnungen (CASSCF) durchgeführt. Bei CASSCF schränkt man die Anzahl der Konfigurationen nicht dadurch ein, dass man eine bestimmte „Anregung“ bezüglich der Referenzdeterminante angibt, wie das bei CIS, CISD, ... der Fall ist, sondern einen Satz von m Orbitalen – den *aktiven Raum* – definiert, innerhalb dessen alle möglichen Konfigurationen durch Verteilen einer bestimmten Zahl n *aktiver Elektronen* ermittelt werden ($\rightarrow \text{CASSCF}(n, m)$). Orbitale außerhalb des aktiven Raums sind entweder immer doppelt besetzt (*inaktive Orbitale*) oder immer unbesetzt (*externe Orbitale*). CASSCF wird oft verwendet, um Reaktionsmechanismen zu verfolgen und angeregte Zustände zu berechnen. Der aktive Raum wird dabei so gewählt, dass er die Orbi-

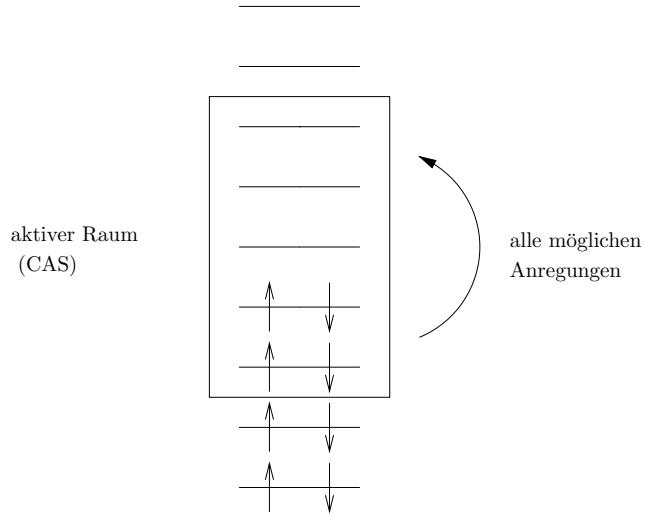


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung eines CASSCF(4,5). Im aktiven Raum werden alle möglichen Konfigurationen erzeugt.

tale enthält, die an der Reaktion am stärksten beteiligt sind, mehrheitlich also die *Grenzorbitale*. Damit erfasst man durch CASSCF weniger Korrelationseffekte der inneren Orbitale (als die zuvor genannten CI-Methoden), sondern hauptsächlich die Korrelationseffekte der Valenzorbitale, die ja auch für chemische Reaktionen und nicht zu hohe Anregungsenergien als besonders wichtig angesehen werden. Nachteil der CASSCF-Methode ist die gewisse Willkür, mit der der aktive Raum gewählt werden kann, da oft nicht klar ist – vor allem bei geringer Molekülsymmetrie – welche Orbitale wesentlich sind. Ein weiterer Nachteil ist, dass bei der Berechnung verschiedener Zustände deutlich verschiedene optimierte Orbitale erhalten werden können, was die Interpretation der Ergebnisse erschwert [31].

2.2 (Kohn-Sham-) Dichtefunktionaltheorie

Die Dichtefunktionaltheorie [32] besitzt einen anderen Ausgangspunkt als die zuvor besprochenen Hartree-Fock-basierten Methoden. Man versucht nicht mehr *a priori* eine näherungsweise Wellenfunktion aufzustellen, die von allen Elektronenkoordinaten abhängt, sondern beschränkt sich auf die Berechnung der Gesamtelektronendichte $\rho(\mathbf{r})$. Motiviert wird das durch das erste Hohenberg-Kohn-Theorem, aus dem folgt, dass sich die Energie und alle molekularen Eigenschaften eindeutig aus der Ladungsverteilung $\rho(\mathbf{r})$ ergeben [32, 33]. Das zweite Hohenberg-Kohn-Theorem stellt ein Variationsprinzip für die Dichte analog dem für die Wellenfunktion auf: die Grundzustandselektronendichte ist diejenige, die in der niedrigsten Energie re-

2.2 (Kohn-Sham-) Dichtefunktionaltheorie

sultiert [33]. Was man dazu braucht, ist das Dichtefunktional der Energie $E[\rho(\mathbf{r})]$; leider ist dieses aber nicht bekannt.

Den Durchbruch der Dichtefunktionaltheorie brachte die Theorie von Kohn und Sham [34], die das kinetische Energiefunktional $T[\rho(\mathbf{r})]$ näherungsweise durch das eines *wechselwirkungsfreien* N -Teilchensystems beschrieben. Dabei wird davon ausgegangen, dass das wechselwirkungsfreie Referenzsystem dieselbe Dichte $\rho(\mathbf{r})$ besitzt wie das reale N -Elektronensystem, wenn nur das *externe* Einteilchenpotential $v_s(\mathbf{r}_i)$ geeignet gewählt wird:⁸ Der Referenzhamiltonoperator schreibt sich dann als:

$$\hat{H}_s = \sum_{i=1}^N -\frac{1}{2}\Delta_i + \sum_{i=1}^N v_s(\mathbf{r}_i) \quad (2.31)$$

Das wechselwirkungsfreie Referenzsystem hat den Vorteil, dass seine *exakte* Wellenfunktion als Slaterdeterminante (2.12) geschrieben werden kann (vgl. Abschnitt 2.1.2), und das Energiefunktional bekannt ist. Die Energie in einem solchen System ist

$$E_s[\rho] = T_s[\rho] + \int_{\mathbb{R}^3} v_s(\mathbf{r})\rho(\mathbf{r})d\mathbf{r}, \quad (2.32)$$

mit

$$T_s[\rho] = \sum_{i=1}^N \langle \varphi_i^{(s)} | -\frac{1}{2}\Delta_i | \varphi_i^{(s)} \rangle \quad (2.33)$$

und

$$\rho(\mathbf{r}) = \sum_{s=-\frac{1}{2}}^{\frac{1}{2}} \sum_{i=1}^N |\varphi_i^{(s)}(\mathbf{x})|^2 \quad (2.34)$$

(s ist die Spinkoordinate).

Für die Gesamtenergie des *realen* Systems bekommt man den Ausdruck

$$E[\rho] = T_s[\rho] + \underbrace{\frac{1}{2} \int_{\mathbb{R}^3} \int_{\mathbb{R}^3} \frac{\rho(\mathbf{r})\rho(\mathbf{r}')}{|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|} d\mathbf{r} d\mathbf{r}'}_{J[\rho]} + \int_{\mathbb{R}^3} v(\mathbf{r})\rho(\mathbf{r})d\mathbf{r} + E_{xc}[\rho] \quad (2.35)$$

Die beiden Integralterme beschreiben die klassische Coulombwechselwirkung der Elektronenverteilung $\rho(\mathbf{r})$ (inklusive Selbstwechselwirkung), und die Wechselwirkung mit dem externen Potential $v(\mathbf{r})$; $E_{xc}[\rho]$ ist das *Austausch-Korrelationsfunktional* der Kohn-Sham-Theorie und ist definiert über

$$E_{xc}[\rho] = (T[\rho] - T_s[\rho]) + (V_{ee}[\rho] - J[\rho]), \quad (2.36)$$

⁸Dass das immer möglich ist, ist keineswegs selbstverständlich (Problem der v - bzw. v_s -Repräsentabilität der Dichte ρ) [35–37], vgl. auch Kapitel 2.4.

Quantenchemische Methoden

mit $V_{ee}[\rho]$ als exaktem Elektron-Elektron-Wechselwirkungsfunktional, so dass (2.35) formal exakt ist. Die Bestimmungsgleichungen für die Kohn-Sham-Orbitale $\varphi^{(s)}$ (die *Kohn-Sham-Gleichungen*), die zur minimalen Energie E gehören, werden durch Anwendung des Variationsprinzips für Dichten auf (2.35) erhalten. Sie lauten:

$$\left\{ -\frac{1}{2}\Delta_i + v_s(\mathbf{r}_i) \right\} \varphi_k^{(s)}(\mathbf{x}_i) = \epsilon_k^{(s)} \varphi_k^{(s)}(\mathbf{x}_i), \quad (2.37)$$

mit

$$v_s(\mathbf{r}) = v(\mathbf{r}) + \frac{\delta J[\rho(\mathbf{r})]}{\delta \rho(\mathbf{r})} + \frac{\delta E_{xc}[\rho(\mathbf{r})]}{\delta \rho(\mathbf{r})} \quad (2.38)$$

$$= v(\mathbf{r}) + \int_{\mathbb{R}^3} \frac{\rho(\mathbf{r}')}{|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|} d\mathbf{r}' + v_{xc}[\rho](\mathbf{r}), \quad (2.39)$$

$v_{xc}[\rho](\mathbf{r})$ heißt *Austausch-Korrelationspotential*.⁹ Seine Form ist nicht genau bekannt, aber in den letzten Jahren konnten sehr gute Näherungen dafür entwickelt werden, worauf aber im Rahmen dieser Arbeit nicht näher eingegangen werden kann. Grob gesagt, spaltet man im allgemeinen das Austausch-Korrelationspotential in eine Summe aus *Austausch-* und *Korrelationspotential* auf, für die man unterschiedliche Näherungen machen kann, wodurch die verschiedenen DFT-Methoden zustande kommen. Auf Grund dieser Näherungen sind DFT-Rechnungen auch *nicht* mehr variationell, d. h. die berechnete Energie kann kleiner als der exakte Wert sein. Als besonders erfolgreich in der Vorhersage molekularer Eigenschaften zeigte sich das von Becke et al. entwickelte B3LYP-Funktional, das drei empirisch bestimmte Parameter enthält [38]. Ein weiteres Funktional von Becke et al. ist BHLYP [39], das ebenso wie B3LYP zu den *Hybridfunktionalen* gehört, die in v_{xc} einen skalierten Hartree-Fock-Austauschterm beinhalten; bei BHLYP ist der Skalierungsfaktor 0,5. Außerdem zeigt die Erfahrung, dass die Qualität der DFT-Berechnungen im Gegensatz zu den klassischen *ab initio* Methoden nur wenig von der Größe des Basissatzes abhängt, sobald man mindestens Split-Valence-Basen mit Polarisierungsfunktionen wie SV(P) [40] oder 6-31G* verwendet; größere Basen bringen meist nur noch marginale Verbesserungen [31, 41].

Abschließend noch ein paar Bemerkungen zur Berechnung offenschaliger Moleküle im Rahmen der Dichtefunktionaltheorie: Während für geschlossenschalige

⁹Für die Energie E_s des Referenzsystems gilt somit bei der durch v_s erzeugten Dichte ρ [34]:

$$\begin{aligned} E_s[\rho] &= \sum_{i=1}^N \epsilon_i^{(s)} \\ &= E[\rho] + \frac{1}{2} \int_{\mathbb{R}^3} \int_{\mathbb{R}^3} \frac{\rho(\mathbf{r})\rho(\mathbf{r}')}{|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|} d\mathbf{r} d\mathbf{r}' - E_{xc}[\rho] + \int_{\mathbb{R}^3} v_{xc}(\mathbf{r})\rho(\mathbf{r}). \end{aligned}$$

2.3 Zeitabhängige Dichtefunktionaltheorie

Systeme die Raumorbitale analog zur RHF-Theorie als gleich angesetzt werden (*Restricted-Kohn-Sham-(RKS)-Methode*), behandelt man bei offenschaligen Systemen die α - und β -Elektronendichte getrennt (für die entsprechende Theoreme gelten wie für die Gesamtdichte, z. B. ist die Energie ein Funktional $E[\rho_\alpha, \rho_\beta]$), was zu unterschiedlichen Raumorbitalen für α - und β -Elektronen führt (*Unrestricted-Kohn-Sham-(UKS)-Methode*). Damit wird es möglich, Phänomene wie *Spinpolarisation* in offenschaligen Molekülen zu beschreiben. Eine zur ROHF-Methode analoge ROKS-Theorie ist implementiert worden, z. B. im Programmpaket Gaussian [42], jedoch wird von deren Benutzung in der Literatur im allgemeinen abgeraten [43], was zum Teil daran liegt, dass der Hauptvorteil von ROHF, nämlich Eigenfunktionen zu \hat{S}^2 zu liefern, im Rahmen der Kohn-Sham-Theorie weitgehend wegfällt. Tatsächlich weisen UKS-Rechnungen (zumindest bei Verwendung moderner Funktionale wie B3LYP) in der Regel nur sehr geringe Spinverunreinigungen auf und sind daher offensichtlich gut geeignet, offenschalige Moleküle zu beschreiben [31]. Hierbei bleibt allerdings anzumerken, dass $\langle \hat{S}^2 \rangle$ -Erwartungswerte von UKS-Wellenfunktionen in der Regel (und auch in dieser Arbeit) vollkommen analog zu UHF aus den KS-Orbitalen ausgerechnet werden, was strenggenommen nicht richtig ist [43–45], da man so nur $\langle \hat{S}^2 \rangle$ des wechselwirkungsfreien Referenzsystems ausrechnet, nicht aber $\langle \hat{S}^2 \rangle$ des realen Systems; eigentlich hätte man ein Funktional für $\langle \hat{S}^2 \rangle$ aufzustellen. Der gemachte Fehler ist aber klein, wie numerische Testrechnungen in der Literatur gezeigt haben [44]. Die Berechnung von Singulett-Biradikalen, welche ja im Rahmen der Standard-Quantenchemie mindestens einen Zweitdeterminantenansatz benötigen, um qualitativ richtig beschrieben zu werden, ist auch im KS-Formalismus nicht trivial: Da in Singulettsystemen die Spindichte $\rho_\alpha - \rho_\beta$ stets überall Null sein muss [31], sollten solche Moleküle prinzipiell im Rahmen der RKS-Theorie berechenbar sein. Es zeigt sich jedoch, dass die heute zu Verfügung stehenden Energiefunktionale dazu *nicht* geeignet sind; die Energien werden überschätzt. Dafür liefert aber die UKS-Methode in diesen Fällen für gewöhnlich erstaunlich gute Ergebnisse [45–47]. Der Preis dafür ist, dass die Spinsymmetrie gebrochen wird, man also unphysikalische Spindichten $\neq 0$ bekommt.

2.3 Zeitabhängige Dichtefunktionaltheorie

Die Dichtefunktionaltheorie von Kohn und Sham ist ebenso wie die Hartree-Fock-Theorie zunächst einmal darauf ausgelegt, elektronische *Grundzustände* zu beschreiben. In beiden Fällen kann man die Methoden derart erweitern, dass man den jeweils energetisch niedrigsten Zustand jeder Multiplizität und irreduziblen Darstellung der molekularen Punktgruppe berechnen kann. Zwar kann man prinzipiell die KS-Orbitale genauso wie die HF-Orbitale für CI-Rechnungen verwenden, was aber

Quantenchemische Methoden

den Nachteil hat, dass man die implizit enthaltene Korrelation nicht berücksichtigt.¹⁰

Andererseits lässt sich argumentieren, dass nach dem ersten Hohenberg-Kohn-Theorem die Grundzustandsdichte das externe Potential v und damit den Hamiltonoperator des Systems definiert. Damit sind aber auch alle angeregten Zustände als Funktionale der Grundzustandsdichte anzusehen, und die Frage ist, wie dieses Funktional aussieht. In diese Richtung geht die Berechnung angeregter Zustände im Rahmen der sogenannten *zeitabhängigen Dichtefunktionaltheorie* (*Time-Dependent DFT*, TD-DFT), die im folgenden kurz dargestellt werden soll.

Ausgangspunkt ist die zeitabhängige Schrödingergleichung (2.1) mit dem nun zeitabhängigen Hamiltonoperator $\hat{H}(t) = \hat{T} + \hat{W} + \hat{v}(t)$, mit \hat{T} als kinetischem Energieoperator, \hat{W} als dem Wechselwirkungsoperator der Teilchen des Systems (beide explizit zeitunabhängig) und dem zeitabhängigen externen Potential $\hat{v}(t)$. Im weiteren sei vorausgesetzt, dass $\hat{v}(t)$ ein multiplikativer, spinunabhängiger Operator ist (also $\hat{v}(t) = v(t) \cdot \mathbb{1}$), der für $t < t_0$ zeitunabhängig ist, und sich um $t = t_0$ in eine Taylor-Reihe entwickeln lässt. Unter diesen Annahmen gilt das Runge-Gross-Theorem, nämlich dass dann das externe Potential bis auf einen rein zeitabhängigen Summanden $C(t)$ durch die Dichte $\rho(\mathbf{r}, t)$ bestimmt ist [49], und alle Erwartungswerte $\langle \hat{O} \rangle(t)$ ein Funktional von $\rho(\mathbf{r}, t)$ sind, solange \hat{O} keine Ableitung nach t enthält. Das Runge-Gross-Theorem entspricht somit dem ersten Hohenberg-Kohn-Theorem im zeitabhängigen Fall. Durch Annahme eines wechselwirkungsfreien Referenzsystems, das bei geeignet gewähltem externen Potential $v_s(\mathbf{r}, t)$ die gleiche Dichtefunktion $\rho(\mathbf{r}, t)$ liefert wie das reale System, kann man die *zeitabhängigen Kohn-Sham-Gleichungen* herleiten [49, 50]:

$$\left\{ -\frac{1}{2}\Delta_i + v_s(\mathbf{r}_i, t) \right\} \varphi_k^{(s)}(\mathbf{x}_i, t) = i \frac{\partial}{\partial t} \varphi_k^{(s)}(\mathbf{x}_i, t), \quad (2.40)$$

wobei

$$v_s(\mathbf{r}, t) = v(\mathbf{r}, t) + \int_{\mathbb{R}^3} \frac{\rho(\mathbf{r}', t)}{|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|} d\mathbf{r}' + v_{xc}[\rho](\mathbf{r}, t). \quad (2.41)$$

Für das zunächst unbekannte zeitabhängige Austausch-Korrelationspotential $v_{xc}[\rho](\mathbf{r}, t)$ wird eine adiabatische Näherung durchgeführt:

$$v_{xc}[\rho(\mathbf{r}', t')](\mathbf{r}, t) \approx v_{xc}[\rho(\mathbf{r}', t)](\mathbf{r}), \quad (2.42)$$

das heißt, statt des explizit zeitabhängigen Austausch-Korrelationspotentials, das zugleich ein Funktional der zeitabhängigen Dichte ist, verwendet man das zeitunabhängige Austausch-Korrelationspotential (vgl. Kapitel 2.2) mit der Dichte zur Zeit t ; v_{xc} hängt jetzt nur noch implizit über die Dichte von t ab. Durch diese Näherung

¹⁰Tatsächlich eignen sich KS-Orbitale für CI-Rechnungen wohl sogar besser als die HF-Orbitale, was u. a. den i. a. kompakteren virtuellen Orbitalen zugeschrieben wird [37, 48].

2.3 Zeitabhängige Dichtefunktionaltheorie

werden sämtliche Relaxationseffekte der Elektronenverteilung vernachlässigt und angenommen, dass sich die Elektronendichte instantan an das äußere Feld v bzw. v_s anpasst. Sie ist insofern ähnlich zur adiabatischen Näherung innerhalb der Born-Oppenheimer-Näherung.

Als nächsten Schritt überlegt man sich einen Zusammenhang zwischen der zeitabhängigen Störung $v_1(\mathbf{r}, t) := v(\mathbf{r}, t) - v_0(\mathbf{r})$ und der damit induzierten Dichteänderung; damit ist es möglich, dynamische Polarisierbarkeiten $\alpha(\omega)$ (mit ω = Frequenz des äußeren elektrischen Feldes) von Molekülen auszurechnen, aber auch Anregungsenergien, bei denen $\alpha(\omega)$ Polstellen besitzt, wie folgende Gleichung für die mittlere Polarisierbarkeit $\bar{\alpha}(\omega) := \frac{1}{3}(\alpha_{xx} + \alpha_{yy} + \alpha_{zz})$ zeigt [50, 51]:

$$\bar{\alpha}(\omega) = \sum_i \frac{f_i}{\omega_i^2 - \omega^2} \quad (2.43)$$

Die Summe läuft dabei über alle Zustände i des Moleküls; f_i bezeichnet die Oszillatorstärke des Übergangs $0 \rightarrow i$,

$$f_i = \frac{2}{3}(E_i - E_0)|\langle \Psi_0 | \mathbf{r} | \Psi_i \rangle|^2, \quad (2.44)$$

die Anregungsenergie ist durch ω_i gegeben. Die Gleichungen, die man schließlich erhält sollen hier nicht wiedergegeben werden; letztendlich läuft es darauf hinaus, ein Matrixeigenwertproblem mit den Eigenwerten ω_i^2 zu lösen [50–53]; dabei zeigt sich, dass die Anregungsenergien im wesentlichen durch die KS-Orbitalenergiedifferenzen bestimmt werden. Die Oszillatorstärken f_i können aus den Eigenvektoren berechnet werden [50, 54], und die angeregten Zustände lassen sich ebenfalls mit Hilfe der Eigenvektoren näherungsweise als CIS-artige Wellenfunktionen darstellen, wodurch die Klassifizierung der angeregten Zustände möglich wird [50].

In dieser Arbeit werden neben Grundzustandsspektren auch Anregungsenergien aus dem tiefsten Triplett-Zustand berechnet werden. In diesem Fall hat man zwei Möglichkeiten: Einerseits kann man die Triplett-Wellenfunktion, die durch eine U-(unrestricted)-Determinante repräsentiert wird, als Referenzzustand nehmen, was im folgenden als UTD-DFT bezeichnet wird. Ein Nachteil dabei ist, dass die angeregten Zustände nicht mehr eindeutig als Singulett oder Triplett identifiziert werden können (analog zu UCIS). Andererseits besteht die Möglichkeit, *zwischen angeregten Zuständen* aus einer TD-DFT-Rechnung mit der R-(restricted)-Determinante des *Singulett-Grundzustands*, Anregungsenergien und Oszillatorstärke zu berechnen (im folgenden als RTD-DFT bezeichnet). So ist es im Prinzip möglich, auch Spektren angeregter Zustände zu berechnen.

Neuere Entwicklungen gehen unter anderem dahin, TD-DFT auch zur Geometrieeoptimierung angeregter Zustände mit analytischen Gradienten zu nutzen [55, 56], verbunden mit einem Rechenaufwand ähnlich zu entsprechenden CIS-Optimierungen. Der Vorteil ist, dass TD-DFT offensichtlich deutlich besser als CIS

geeignet ist, angeregte Zustände zu beschreiben [57, 58]. Außerdem können sogar weitere Eigenschaften angeregter Zustände, wie beispielsweise das Dipolmoment, ausgerechnet werden [57].

2.4 Multireferenz-DFT

Wie schon in Abschnitt 2.2 angedeutet, eignet sich die KS-Dichtefunktionaltheorie, zumindest mit den heutigen Funktionalen, nicht in jedem Fall. Problematisch sind hauptsächlich Moleküle bzw. Zustände mit starker statischer Korrelation. Man kann zeigen, dass sich nicht alle „sinnvollen“ Dichten durch eine einzige KS-Slaterdeterminante beschreiben lassen [59–61], selbst wenn man das exakte Funktional kennen würde. Hingegen lassen sich solche problematischen Systeme durch eine CI-artige Entwicklung nach KS-Determinanten beschreiben [36, 62, 63]. Ein weiteres (kleineres) Problem ist die Beschränkung der heutigen TD-DFT-Implementationen auf die adiabatische Näherung (Gl. (2.42)), was u. a. die Ergebnisse bei hohen Anregungsenergien verfälschen kann. In beiden Fällen ist die *DFT-Multi-Referenz-CI*- (DFT-MRCI)-Methode von Grimme und Waletzke hilfreich [64] und stellt somit eine Alternative sowohl zur Grundzustandsberechnung als auch zur Berechnung angeregter Zustände dar. Dabei handelt es sich um ein semiempirisches Hybridverfahren, das seine Ursprünge in konventionellem CI und TD-DFT besitzt.

Grundidee des Verfahrens ist, die in den KS-Orbitalen schon implizit vorhandene dynamische Korrelation weiterhin zu nutzen, und gleichzeitig die statische Korrelation durch eine (kurze) CI-Reihe aufzufangen. Dazu stellt man zunächst die CI-Matrix [25, 27] der spinadaptierten KS-Konfigurationen¹¹ mit einem im folgenden näher zu spezifizierenden Hamiltonoperator \hat{H}^{DFT} auf. Im folgenden soll zunächst die einfachere Dichtefunktional-Singles-CI-(DFT-SCI)-Methode [48] erläutert werden, auf dem das DFT-MRCI-Verfahren aufbaut. Ausgehend von den Ausdrücken mit exaktem Hamiltonoperator \hat{H} wurden für die Matrixelemente der CI-Matrix die folgenden Ansätze gemacht:

$$\langle \Phi_a^r | \hat{H}^{DFT} - E_0 | \Phi_a^r \rangle = \epsilon_r^{(s)} - \epsilon_a^{(s)} - c_1 J_{ar} + 2K_{ar} + \Delta(K_{ar}, \epsilon_a^{(s)}) \quad (2.45)$$

$$\langle \Phi_0 | \hat{H}^{DFT} | \Phi_a^r \rangle = 0 \quad (2.46)$$

$$\langle \Phi_a^r | \hat{H}^{DFT} | \Phi_b^s \rangle = -c_1 (\psi_a^{(s)} \psi_b^{(s)} | \psi_r^{(s)} \psi_s^{(s)}) + 2 (\psi_a^{(s)} \psi_r^{(s)} | \psi_b^{(s)} \psi_s^{(s)}) \quad (2.47)$$

Hierbei ist

$$(ab|cd) := \int_{\mathbb{R}^3} \int_{\mathbb{R}^3} d\mathbf{r}_1 d\mathbf{r}_2 a^*(\mathbf{r}_1) b(\mathbf{r}_1) \frac{1}{|\mathbf{r}_1 - \mathbf{r}_2|} c^*(\mathbf{r}_2) d(\mathbf{r}_2)$$

¹¹Die KS-Orbitale hat man aus einer vorangegangenen RKS-Rechnung erhalten.

ein Zweielektronenintegral in Mullikenschreibweise (Chemiker-Notation),

$$\begin{aligned} J_{ar} &:= (\psi_a^{(s)} \psi_a^{(s)} | \psi_r^{(s)} \psi_r^{(s)}) \\ K_{ar} &:= (\psi_a^{(s)} \psi_r^{(s)} | \psi_a^{(s)} \psi_r^{(s)}) \end{aligned}$$

sind das Coulomb- bzw. Austauschintegral zwischen den KS-Orbitalen $\psi_a^{(s)}$ und $\psi_r^{(s)}$, und E_0 ist die DFT-Energie der Grundzustandsdeterminante; Δ ist eine empirische Funktion des Austauschintegrals K_{ar} und der Orbitalenergie $\epsilon_a^{(s)}$ und dient im wesentlichen dazu, für Zustände mit kleinem Austauschintegral bessere Ergebnisse zu erhalten. Die Form von Δ ist

$$\Delta(K, \epsilon) = -0.025\epsilon + c_2 \exp(-c_3 K^4).$$

Die drei Parameter c_1, c_2, c_3 wurden an experimentelle Daten angepasst [48].

Die DFT-MRCI-Methode [64] stellt eine Weiterentwicklung von DFT-SCI dar, so dass nun auch höhere Anregungen der Referenzdeterminante erlaubt sind. Dabei bleiben die wesentlichen Eigenschaften der DFT-SCI-Methode erhalten: auch hier werden die Diagonalelemente der CI-Matrix durch KS-Orbitalenergiedifferenzen und skalierte Coulombintegrale ausgedrückt, und eine zusätzliche Korrektur für die Austauscherme vorgenommen (diese allerdings in etwas anderer Form als bei DFT-SCI). Die Außendiagonalelemente werden unter Verwendung des exakten Hamiltonoperators berechnet und in Abhängigkeit der Energiedifferenz der beteiligten Zustände skaliert:

$$\langle \Phi | \hat{H}^{DFT} | \Phi' \rangle = \langle \Phi | \hat{H} | \Phi' \rangle p_1 e^{-p_2 \Delta E^4}, \quad (2.48)$$

wodurch Kopplungen zwischen Konfigurationen mit stark unterschiedlicher Energie unterbunden werden, was Sinn macht, da die dynamische Korrelation schon weitgehend durch die Diagonalelemente abgedeckt ist, und im wesentlichen statische Korrelation durch die CI-Entwicklung beschrieben werden soll. Durch Testrechnungen wurde jedoch festgestellt, dass Matrixelemente zwischen Zuständen, die sich nur im Spinkopplungsmuster unterscheiden, besser ohne Skalierung ausgerechnet werden, also

$$\langle \Phi | \hat{H}^{DFT} | \Phi' \rangle = \langle \Phi | \hat{H} | \Phi' \rangle \quad (2.49)$$

in diesen Fällen.

Der weitere Algorithmus der Multireferenz-DFT-Rechnungen kann am einfachsten anhand von Abb. 2.2 verstanden werden: Nach einer Grundzustandsrechnung mit dem R-BHLYP-Funktional, werden die benötigten Ein- und Zweielektronenintegrale berechnet und abgespeichert. Das BHLYP-Funktional wird verwendet, weil sich gezeigt hat, dass die damit erhaltenen Ergebnisse den geringsten Fehler zu empirischen Daten aufweisen. Die Zweielektronenintegrale werden semi-direkt über die *Resolution of Identity*-(RI)-Methode ausgewertet, um die 4-Index-Transformation von der AO- in die MO-Basis zu umgehen und erst während der CI-Rechnung „on

Quantenchemische Methoden

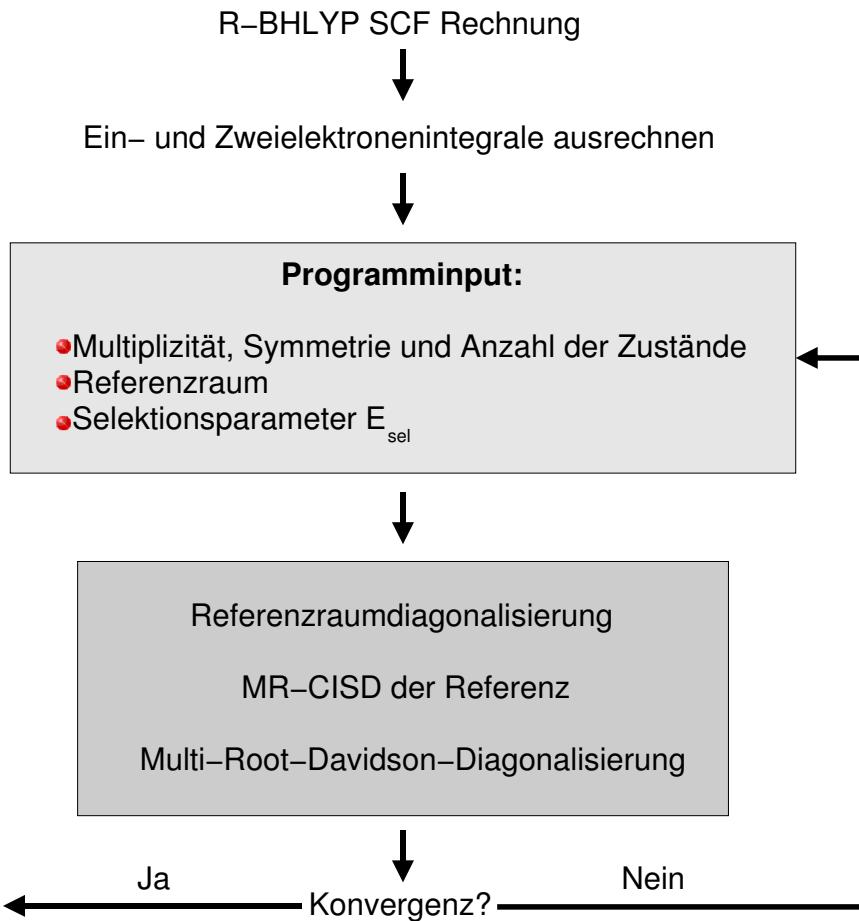


Abbildung 2.2: Schema des Ablaufs einer Multireferenz-DFT-Rechnung. Es sind nur die wichtigsten Eingabeparameter angegeben.

the fly“ dann wirklich ausgerechnet [64]. Nach diesen vorbereitenden Schritten wird beim ersten Durchlauf des Programms durch Angabe eines Satzes von m Orbitalen, n Elektronen und der maximalen Anregung l (meist 2) bezüglich der Grundzustandskonfiguration ein erster „Guess“ für den Referenzraum bestimmt,¹² der im folgenden noch weiter optimiert wird. Im Referenzraum wird dann ein CISD durchgeführt, wobei die Besetzungszahlen der Rumpforbitale und die von energetisch hoch liegenden virtuellen Orbitalen eingefroren werden können; bei einer maximalen Anregung im Referenzraum von beispielsweise zwei bezüglich der Grundzustandskonfiguration erhält man so bis zu vierfach angeregte Konfigurationen. Alle erzeugten CSFs mit unerwünschter Multiplizität und/oder Symmetrie werden verworfen; zudem wird eine weitere drastische Verringerung der Konfigurationen durch eine einfache Energieabschätzung erreicht: liegt die Summe der Orbitalenergieunterschiede zwischen

¹²Man spricht von einem *Restricted Active Space*, kurz RAS(n, m, l).

2.5 Umgebungseinflüsse: Reaktionsfeldmethoden

einer Konfiguration und der Grundzustandskonfiguration über dem höchsten Energiedifferenzwert des Referenzraumes zuzüglich einem Schwellwert E_{sel} , dann wird die Konfiguration nicht weiter berücksichtigt. CSFs mit hoher Energie werden dadurch herausgefiltert, was damit in Einklang steht, dass im wesentlichen statische Korrelation durch die CI-Reihe beschrieben werden soll. Anschließend erfolgt die iterative Diagonalisierung der CI-Matrix mit Hilfe des Davidson-Algorithmus [65, 66]. Mit dem erhaltenen Ergebnis startet man wieder eine DFT-MRCI-Rechnung, wobei diesmal der Referenzraum sich aus allen Konfigurationen zusammensetzt, deren Gewicht c_i^2 über einem in der Eingabedatei spezifizierten Wert liegt. Das Verfahren wird solange wiederholt, bis sich der so bestimmte Referenzraum nicht mehr wesentlich ändert und somit Konvergenz desselben erreicht worden ist. Weitere Details können der Dokumentation des Programms entnommen werden [67]. Gegenwärtig ist das Programm auf die Behandlung von Systemen mit gerader Elektronenzahl beschränkt.

2.5 Umgebungseinflüsse: Reaktionsfeldmethoden

Neben der Berechnung angeregter Zustände ist im Rahmen dieser Arbeit auch der Einfluss des Proteins bzw. eines Lösungsmittels auf die chemischen Eigenschaften eines darin befindlichen Moleküls (des „Solute“) von Bedeutung. Prinzipiell gibt es für diese Problematik zwei Ansätze: Zum einen kann man explizit Molekül(rest)e in die quantenchemische Rechnung mit aufnehmen, wobei man aber auf relativ wenige beschränkt ist, da sonst der Rechenaufwand zu groß würde. Außerdem setzt dieses Vorgehen voraus, dass im wesentlichen die direkte Wechselwirkung zwischen Solute und den nächsten Nachbarn der molekularen Umgebung den Einfluss auf das Solute bestimmt, und langreichweitige Wechselwirkungen vernachlässigt werden können. Dem entgegengesetzt ist der Ansatz, die Umgebung durch ein polarisierbares strukturloses Kontinuum zu ersetzen, wobei die Umsetzung dieser Methode in verschiedenen Weisen und Abstraktionsgraden möglich ist. Im folgenden soll ein kurzer Überblick über die wichtigsten Verfahren gegeben werden.

Der einfachste Ansatz ist der von Onsager [68]. Dabei wird das gelöste Molekül in einen kugelförmigen Hohlraum gesetzt, der von einem Medium mit einer relativen Dielektrizitätszahl $\epsilon > 1$ umgeben ist. Das Dipolmoment des Solutes induziert ein parallel dazu ausgerichtetes elektrisches Feld, das *Reaktionsfeld*, das umgekehrt wieder die Elektronenverteilung im Solute beeinflusst. Dem Hamiltonoperator des Moleküls muss dazu nur ein Term mit dem Reaktionsfeld hinzugefügt werden:

$$\hat{H} = \hat{H}_0 + \hat{H}_{RF}, \quad (2.50)$$

wobei \hat{H}_0 der Hamiltonoperator des Solutes im Vakuum ist, und \hat{H}_{RF} die Wechselwirkungsenergie des Moleküls mit dem Reaktionsfeld angibt; im Falle eines Dipols

Quantenchemische Methoden

$\boldsymbol{\mu}$ im Reaktionsfeld \mathbf{E}_R gilt einfach:

$$\hat{H}_{RF} = -\boldsymbol{\mu} \cdot \mathbf{E}_R. \quad (2.51)$$

Das Reaktionsfeld ist proportional zu $\boldsymbol{\mu}$, und der Proportionalitätsfaktor hängt von der Dielektrizitätskonstante und dem Radius a_0 des Hohlraums ab [68, 69]:

$$\mathbf{E}_R = \frac{2(\varepsilon - 1)}{2\varepsilon + 1} \frac{\boldsymbol{\mu}}{a_0^3} \quad (2.52)$$

Gleichzeitig muss Energie zur Polarisation des Kontinuums aufgebracht werden. Es zeigt sich, dass diese gerade $-\frac{1}{2}\langle\Phi|\hat{H}_{RF}|\Phi\rangle$ ist, so dass sich die elektrostatische Gesamtenergie (Molekül + Umgebung) im Gleichgewicht zu

$$E_{el} = \langle\Phi|\hat{H}_0 + \frac{1}{2}\hat{H}_{RF}|\Phi\rangle \quad (2.53)$$

$$= \langle\Phi|\hat{H}_0|\Phi\rangle - \frac{1}{2}\boldsymbol{\mu} \cdot \mathbf{E}_R, \quad (2.54)$$

ergibt¹³ [69, 71], wobei Gleichung (2.53) *allgemein* auch für die nachfolgenden Modelle gilt [71, 72]. Der zusätzliche Potentialterm kann in den SCF-Zyklus integriert werden, und die SCF-Energie gibt die elektrostatische Gesamtenergie an.

Hauptproblem des Onsager-Modells ist die Wahl des Hohlraumradius (vor allem für nicht kugelförmige Moleküle), insbesondere weil die Ergebnisse relativ stark von der Wahl desselben abhängen [73]. Der bisweilen beobachtete Erfolg bei der Anwendung dieses Modells ist in diesen Fällen wohl hauptsächlich auf Fehlerkompen-sationen zurückzuführen [74]. Es ist daher notwendig, die „molekulare Oberfläche“ (*Molecular Surface* (MS)) realistischer zu erfassen. Im wesentlichen sind dabei zwei Methoden gängig, nämlich die Moleküloberfläche auf Grund einer Isoelektronendich-tefläche zu bestimmen, oder aufbauend auf ein „Kalottenmodell“ zu beschreiben. In beiden Fällen ergibt sich das Problem, dass das elektrische Feld innerhalb dieser geo-metrischen Gebilde nicht mehr analytisch gegeben ist. Neben der Molekülform sollte die Ladungsverteilung des Moleküls realistischer modelliert werden, das heißt neben dem Dipolmoment sollten auch höhere Multipolmomente berücksichtigt werden.¹⁴

Beim *Polarizable Continuum Model* (PCM) wird die Polarisation der Umgebung durch eine Ladungsverteilung auf der Hohlraumoberfläche dargestellt. Für beliebige Moleküle/Ladungsverteilungen innerhalb des Hohlraums gilt [71, 73, 75]

$$\sigma(\mathbf{r}) = -\frac{\varepsilon - 1}{4\pi\varepsilon} \mathbf{E}_{in}(\mathbf{r}) \cdot \mathbf{n}(\mathbf{r}), \quad (2.55)$$

¹³Für geladene Moleküle mit Ladung Q kommt noch der Term $-\frac{\varepsilon-1}{2\varepsilon} \frac{Q^2}{a_0}$ hinzu [70].

¹⁴Für ein neutrales Molekül ohne permanentes Dipolmoment ergibt sich im Onsager-Modell beispielsweise keine elektrostatische Wechselwirkung mit der Umgebung.

2.5 Umgebungseinflüsse: Reaktionsfeldmethoden

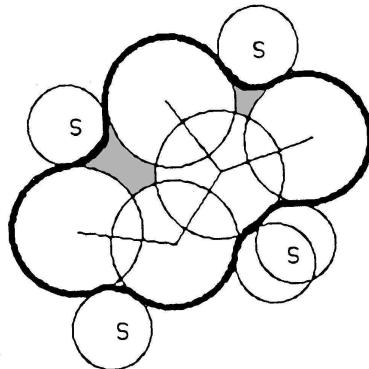


Abbildung 2.3: Modell der Moleküloberfläche, genauer der *Solvent Excluding Surface* (nach [77]). Die Atome des Moleküls werden durch Kugeln modelliert, über die eine weitere Kugel S rollt, die vom Durchmesser einem Lösungsmittelmolekül entspricht. Im GEPOL-Formalismus (siehe Text) werden die Bereiche, die zwar nicht zu einem Atom gehören, aber trotzdem nicht für das Lösungsmittel erreichbar sind (im Bild grau unterlegt), durch weitere, nicht atomzentrierte Kugeln dargestellt.

wo $\sigma(\mathbf{r})$ die Ladungsdichte auf der Oberfläche, $\mathbf{E}_{in}(\mathbf{r})$ die elektrische Feldstärke auf der Innenseite der Hohlraumoberfläche, und $\mathbf{n}(\mathbf{r})$ der (nach „außen“ zeigende) Normalenvektor auf die Oberfläche ist. Die Ladungsverteilung $\sigma(\mathbf{r})$ wird durch eine diskrete Punktladungsverteilung $\{q_i\}$ angenähert. Bedingt durch numerische Ungenauigkeiten und der Tatsache, dass ein Teil der Elektronendichte außerhalb des Hohlraums liegt, erfüllen die Oberflächenladungen q_i in der Regel nicht das Gauß'sche Gesetz, nach dem

$$\sum_i q_i = -\frac{\varepsilon - 1}{\varepsilon} Q \quad (2.56)$$

gelten sollte (mit Q = Ladung des Moleküls). Daher werden diese auf den richtigen Wert renormiert, wobei hier mehrere Möglichkeiten der Durchführung existieren. Am gebräuchlichsten ist die Multiplikation aller Ladungen mit einem gemeinsamen Faktor [72, 75], oder die explizite Berücksichtigung der Ladungsdichte außerhalb der Lösungsmittelhöhle durch Addition einer zweiten Ladungsverteilung auf der Oberfläche, und zwar entsprechend der dortigen Elektronendichte [76], was bei PCM-Rechnungen, vor allem für Anionen, deutlich bessere Ergebnisse liefert.

Auch bei der Größe und Form des Lösungsmittelkäfigs gibt es, wie schon gesagt, mehrere Möglichkeiten. Wie sich gezeigt hat, erhält man mit Hohlräumen, die indirekt von den van-der-Waals-Radien der beteiligten Atome abgeleitet sind, die besten Ergebnisse, während Methoden aufbauend auf Isoelektronendichteflächen ungenauer sind und oft an Konvergenzproblemen leiden [78]. In dieser Arbeit wurde der *Generating POLyhedra*-(GEPOL)-Algorithmus zur Bestimmung der Moleküloberfläche (Abb. 2.3) verwendet [77, 79, 80]. Hierbei werden um die Atome

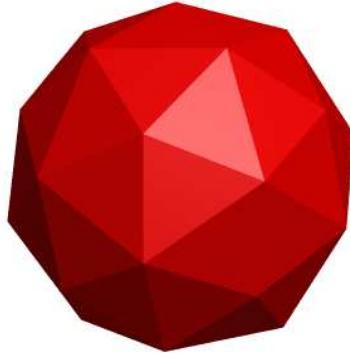


Abbildung 2.4: Pentakisdodekaeder

des Moleküls Kugeln mit bestimmten Radien gelegt; Bereiche, die auf Grund des nichtverschwindenden Volumens der Lösungsmittelmoleküle von diesen nicht erreicht werden können, werden durch Hinzufügen weiterer Kugeln modelliert. Bei dem verwendeten *United Atom Model for Hartree-Fock-* (UAHF)-Verfahren [78] zur Bestimmung der Kugelradien, wird neben dem van-der-Waals-Radius auch Hybridisierung, Anzahl und Art der Nachbaratome, und der formale Ladungszustand des Atoms berücksichtigt; um Wasserstoffatome werden keine extra Kugeln gelegt. Auf die erhaltene Moleküloberfläche werden die Ladungen $\{q_i\}$ platziert, wozu zunächst die Oberfläche jeder Kugel durch Projektion der Seitenflächen eines einbeschriebenen Pentakisdodekaeders (Abb. 2.4) in 60 gleichseitige Kugeldreiecke aufgeteilt wird. Die Oberflächenladungen werden auf die Mittelpunkte der Dreiecke („Tesserae“) gesetzt; Punkte einer Kugel, die sich innerhalb einer anderen befinden, werden dabei natürlich nicht berücksichtigt.

Ähnlich zum PCM-Verfahren ist das *COnductor-like Screening MOdel* (COSMO) [81, 82]. Der wesentliche Unterschied zu PCM ist, dass das Dielektrikum durch einen elektrischen Leiter ($\varepsilon \rightarrow \infty$) ersetzt wird. Die entsprechende Randbedingung ist, dass das elektrische Potential auf der Hohlraumoberfläche verschwindet, was letztendlich auf einfache Formeln als bei PCM führt. Um auch Dielektrika zu erfassen, fordert man zusätzlich, dass das Gauß'sche Gesetz (2.56) erfüllt wird. Das erreicht man, indem man einfach alle Oberflächenladungen mit $(\varepsilon - 1)/\varepsilon$ multipliziert. Dies entspricht praktisch der oben erwähnten Reskalierung mit einem gemeinsamen Faktor bei PCM [82]. Der damit verbundene relative Fehler ist kleiner als $1/\varepsilon$. Das COSMO-Modell ist daher eher für starke Dielektrika geeignet. Wegen der ohnehin schwächeren Polarisierungseffekte in Lösungsmitteln kleiner Dielektrizitätskonstante sind die absoluten Fehler auch in diesen Fällen noch akzeptabel.

Kapitel 3

Ergebnisse der quantenchemischen Rechnungen

3.1 Grundzustandsrechnungen

Um Aussagen über die Reaktivität und Eigenschaften des in den LOV-Domänen vorkommenden Chromophors FMN zu gewinnen, wurden zunächst Grundzustandsrechnungen für Lumiflavin und zwei weitere Modellverbindungen (Isolumazin und 8-Methyl-isolumazin) in verschiedenen Redoxzuständen durchgeführt. In Abbildung 3.1 und 3.2 sind die in dieser Arbeit vorkommenden Flavin-Modelle zusammengefasst. Die betrachteten Redoxzustände leiten sich von der *oxidierten Form*, auch *Chinonform* genannt, durch Addition eines H-Atoms (→ *radikalische Form*, *halbreduzierte Form*, *Semichinonform*) bzw. zwei H-Atomen (→ *reduzierte Form*, *Hydrochinonform*, *Leukoform*) ab. Von der oxidierten Form sind auch die an N1 und N5 protonierten Derivate untersucht worden.

Als Methoden kamen Hartree-Fock (HF) und Dichtefunktionaltheorie (DFT) mit dem B3LYP-Funktional, jeweils in Verbindung mit dem 6-31G*-Basissatz, zum Einsatz. Die Moleküle wurden geometrieeoptimiert; dass tatsächlich ein Minimum vorliegt, wurde durch eine anschließende Frequenzanalyse überprüft. Als Programmpaket diente Gaussian 98 [42]. Grafiken wurden mit Molekel [83] erstellt.

Grundzustandsrechnungen zu Flavinen waren auch schon vorher in der Literatur bekannt. Es handelt sich dabei sowohl um die umfangreichen semiempirischen Rechnungen von Hall et al. [84–86], als auch Rechnungen unterschiedlicher Autoren auf Hartree-Fock-Niveau [87–89] und mit Dichtefunktionaltheorie [90]; HF/6-31G*-Rechnungen an Lumiflavin in verschiedenen Redoxstufen sind bereits von Zheng und Mitarbeitern [89] durchgeführt worden.

Die oxidierte Form der Flavine **1a**, **2a** bzw. Isolumazine **3a**, **4a** (*Chinonform*) ist erwartungsgemäß planar (natürlich abgesehen von den Methylgruppen). Gle-

Ergebnisse der quantenchemischen Rechnungen

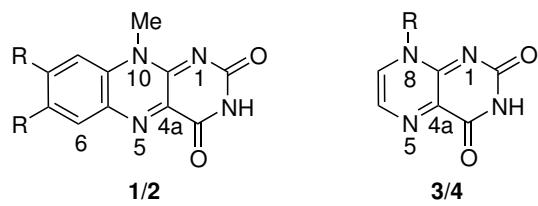


Abbildung 3.1: Verwendete Modellkomponenten für FMN: Lumiflavin **1** ($\text{R}=\text{Me}$), 10-Methyl-isoalloxazin **2** ($\text{R}=\text{H}$), Isolumazin ($\text{R}=\text{H}$) **3** und 8-Methyl-isolumazin ($\text{R}=\text{Me}$) **4**. Die Numerierung der Atome ist ebenfalls angegeben.

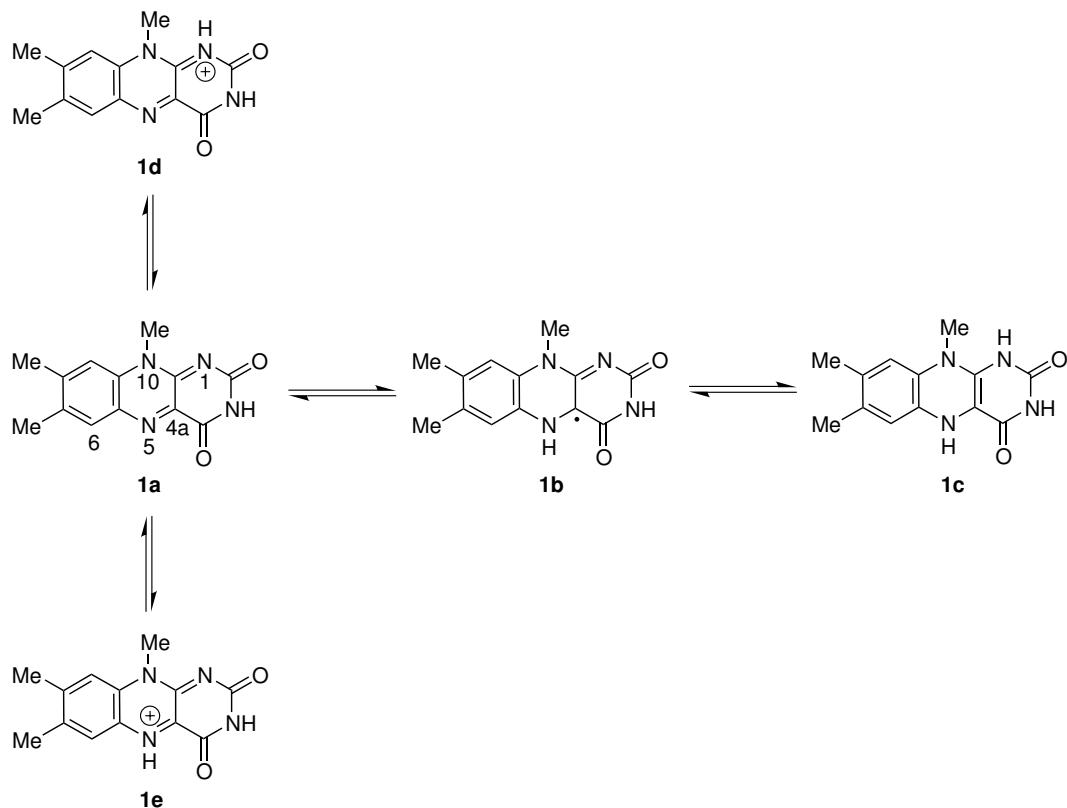


Abbildung 3.2: Verschiedene Redox- und Protonierungszustände von Lumiflavin mit in dieser Arbeit benutzten Kurzbezeichnungen: oxidiertes Lumiflavin (Chinonform) **1a**, Lumiflavin-Radikal (halbreduziertes Lumiflavin, Semichinonform) **1b**, reduziertes Lumiflavin (Hydrochinonform, Leukoform) **1c**, an N1 protonierte Chinonform **1d** und an N5 protonierte Chinonform **1e**. Für die übrigen in Abbildung 3.1 dargestellten Verbindungen gelten entsprechende Konventionen.

3.1 Grundzustandsrechnungen

Molekül	$E(\text{HF}) [\text{E}_h]$	$\Delta [\text{E}_h]$	$E(\text{B3LYP}) [\text{E}_h]$	$\Delta [\text{E}_h]$
1a	-866,8485110	:=0	-872,1145601	:=0
1b	-867,4324137	-0,5839027	-872,7123816	-0,5978215
1c	-868,0096650	-1,1611540	-873,3141729	-1,1996128
1d	-867,2255176	-0,3770066	-872,4929561	-0,3783960
1e	-867,1959463	-0,3474353	-872,4790573	-0,3644972
3a	-597,0788584	:=0	-600,5110232	:=0
3b	-597,6583007	-0,5794423	-601,1068418	-0,5958186
3c	-598,2394181	-1,1605597	-601,7085006	-1,1974774
3d	-597,4415890	-0,3627306	-600,8718698	-0,3608466
3e	-597,4114426	-0,3325842	-600,8556954	-0,3446722
4a	-636,1114433	:=0	-639,8254642	:=0
4b	-636,6884015	-0,5769582	-640,4190935	-0,5936293
4c	-637,2674944	-1,1560511	-641,0179198	-1,1924556

Tabelle 3.1: Energien und Energiedifferenzen zur Chinonform (in Hartree E_h) bei den jeweils entsprechenden optimierten Geometrien. Der verwendete Basissatz ist 6-31G*.

ches gilt für die halb reduzierten, radikalischen Moleküle (*Semichinonform*), während die reduzierten Formen (*Hydrochinonform*) um die N5/N10- bzw. N5/N8-Achse geknickt sind. Der Energieunterschied zwischen der vollständig geometrieeoptimierten und der planaren Struktur beträgt für reduziertes Lumiflavin 26,8 kJ/mol (0,277 eV, RHF/6-31G*) bzw. 8,4 kJ/mol (0,087 eV, RB3LYP/6-31G*). Diese Zahlen können gleichzeitig als (oberer) Schätzwert für die Aktivierungsenergie der zugehörigen Inversion genommen werden, die demnach im selben Bereich wie die Rotationsbarriere in Ethan (12,2 kJ/mol oder 0,126 eV) bzw. die Inversionsbarriere von Ammoniak (24,5 kJ/mol oder 0,254 eV) liegt. Die SCF-Energien der jeweils voll optimierten Geometrien sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst. Wie man sieht, sind die Energieunterschiede Δ zwischen oxidierte, radikalischer und reduzierter Form der Vergleichsmoleküle innerhalb einer Methode (HF oder B3LYP) für die Vergleichsmoleküle ähnlich, wogegen die Differenzen Δ zwischen Hartree-Fock und B3LYP deutlich größer ausfallen. Entsprechendes gilt, wenn man die Mulliken-Ladungen auf den Atomen vergleicht (Tabelle 3.2 bis 3.3). Die Hartree-Fock-basierten Ladungen sind in der Regel betragsmäßig größer als die DFT-basierten Ladungen, was nicht ungewöhnlich ist, da DFT generell zu „ausgeglicheneren“ Ladungsverteilungen als HF führt. Eine auffällige Ausnahme hiervon bildet die Ladung am Atom C4a, die in allen Redoxzuständen bei B3LYP deutlich positiver ist als bei HF.

In Tabelle 3.4 sind die mit RHF/6-31G* bzw. RB3LYP/6-31G* erhaltenen Grenzorbitale für Lumiflavin und Isoalloxazin dargestellt, auf die im Laufe dieser Arbeit noch öfter Bezug genommen werden wird. Wie man sieht, ist das HOMO

Ergebnisse der quantenchemischen Rechnungen

Atom	1a		3a		4a	
	HF	B3LYP	HF	B3LYP	HF	B3LYP
N1	-0,756	-0,604	-0,717	-0,579	-0,746	-0,599
O2	-0,577	-0,483	-0,574	-0,481	-0,579	-0,484
N3	-0,928	-0,683	-0,930	-0,684	-0,929	-0,683
O4	-0,553	-0,473	-0,549	-0,469	-0,553	-0,472
C4a	+0,044	+0,184	+0,063	+0,194	+0,055	+0,184
N5	-0,496	-0,515	-0,441	-0,426	-0,438	-0,426
C5a/C6	+0,174	+0,254	-0,070	-0,012	-0,073	-0,014
N10/N8	-0,840	-0,595	-0,816	-0,618	-0,711	-0,452

Atom	1b		3b		4b	
	HF	B3LYP	HF	B3LYP	HF	B3LYP
N1	-0,760	-0,611	-0,727	-0,586	-0,752	-0,604
O2	-0,585	-0,497	-0,587	-0,496	-0,590	-0,498
N3	-0,931	-0,691	-0,932	-0,691	-0,931	-0,690
O4	-0,627	-0,544	-0,625	-0,544	-0,630	-0,549
C4a	+0,082	+0,238	+0,081	+0,231	+0,074	+0,223
N5	-0,888	-0,783	-0,788	-0,658	-0,782	-0,655
C5a/C6	+0,360	+0,383	+0,040	+0,050	+0,038	+0,048
N10/N8	-0,867	-0,619	-0,863	-0,660	-0,752	-0,487

Atom	1c		3c		4c	
	HF	B3LYP	HF	B3LYP	HF	B3LYP
N1	-0,938	-0,729	-0,942	-0,728	-0,938	-0,724
O2	-0,606	-0,507	-0,602	-0,503	-0,605	-0,505
N3	-0,939	-0,703	-0,939	-0,703	-0,937	-0,702
O4	-0,603	-0,524	-0,600	-0,522	-0,603	-0,524
C4a	+0,077	+0,212	+0,052	+0,207	+0,057	+0,200
N5	-0,854	-0,773	-0,789	-0,674	-0,791	-0,674
C5a/C6	+0,334	+0,348	+0,051	+0,050	+0,053	+0,049
N10/N8	-0,729	-0,583	-0,821	-0,679	-0,686	-0,504

Tabelle 3.2: Mullikenladungen für oxidierte, radikalische und reduzierte Flavine an ausgewählten Atomen, Numerierung nach Abbildung 3.1. Wo mehrere Atomnummern angegeben sind, bezieht sich die erste auf Lumiflavin, die zweite auf 8-Methylisolumazin und Isolumazin.

3.1 Grundzustandsrechnungen

Atom	1d		1e		3d		3e	
	HF	B3LYP	HF	B3LYP	HF	B3LYP	HF	B3LYP
N1	-0,991	-0,771	-0,709	-0,569	-0,968	-0,755	-0,642	-0,519
O2	-0,520	-0,424	-0,490	-0,406	-0,502	-0,404	-0,467	-0,382
N3	-0,946	-0,704	-0,928	-0,691	-0,949	-0,707	-0,930	-0,691
O4	-0,484	-0,404	-0,549	-0,474	-0,463	-0,383	-0,529	-0,453
C4a	+0,017	+0,168	+0,203	+0,286	+0,057	+0,194	+0,230	+0,310
N5	-0,459	-0,489	-0,790	-0,722	-0,398	-0,387	-0,702	-0,605
C5a/C6	+0,191	+0,273	+0,286	+0,363	-0,011	+0,035	-0,031	+0,047
N10/N8	-0,825	-0,593	-0,857	-0,611	-0,806	-0,631	-0,833	-0,624

Tabelle 3.3: Mullikenladungen für protonierte, oxidierte Flavine an ausgewählten Atomen, Numerierung nach Abbildung 3.1. Wo mehrere Atomnummern angegeben sind, bezieht sich die erste auf Lumiflavin, die zweite auf 8-Methylisolumazin und Isolumazin.

für die beiden Verbindungen sehr ähnlich, ebenso das LUMO.¹ Bei der Spindichte der Semichinonform (Tabelle 3.5) fällt auf, dass UB3LYP im Gegensatz zu UHF praktisch keine negative Spindichte vorhersagt, was der Realität eher entsprechen dürfte. Zum einen weisen die UHF-Ergebnisse nämlich deutliche Spinverunreinigung auf, die bei UB3LYP nicht auftritt, zum anderen werden experimentelle Hyperfeinkopplungsparameter [91, 92] besser wiedergegeben. In Tabelle 3.6 sind zusätzlich mit einer größeren Basis (EPR-II) berechnete UB3LYP-Werte angegeben, die kürzlich veröffentlicht worden sind [91]. Der EPR-II-Basisatz [93] ist für die Berechnung von Hyperfeinkopplungskonstanten optimiert und stellt eine double- ζ -Basis mit einem Satz an Polarisationsfunktionen und einem erweiterten Satz an s-Orbitalen (um kernnahe Elektronendichte besser zu beschreiben) dar. Zudem beziehen sich diese Daten auf ein Lumiflavinradikal mit Aminosäureresten als Umgebung [91]. Trotzdem unterscheiden sich die Zahlen von den UB3LYP/6-31G*-Werten in der Gasphase nur wenig.

Außerdem kann man an den DFT-Spindichten schon erkennen, dass das Semichinonradikal im wesentlichen aus einer Besetzung des LUMO des oxidierten Flavins (vgl. Abbildung 3.4) hervorgeht. Eine nähere Betrachtung des SOMO bestätigt dies, dasselbe Resultat liefert eine ROHF-Rechnung (nicht gezeigt). Entsprechend kann man die Veränderungen der Mulliken-Ladungen qualitativ durch das zusätzlich besetzte Molekülorbital verstehen.

Insgesamt lässt sich feststellen, dass die schrittweise Vereinfachung des Lumiflavins über 8-Methyl-isolumazin nach Isolumazin qualitativ wenig an der elektronischen Struktur der untersuchten Redox- und Protonierungszustände zu ändern scheint, und Isolumazin somit als Modellsubstanz, zumindest in den bisher betrachteten Fällen, dienen kann.

¹Das gleiche gilt auch für HOMO und LUMO von 10-Methylisoalloxazin und 8-Methylisolumazin.

Ergebnisse der quantenchemischen Rechnungen

Molekül	Methode	HOMO	LUMO
1a	HF		
1a	B3LYP		
3a	HF		
3a	B3LYP		

Tabelle 3.4: Mit Hartree-Fock bzw B3LYP berechnete Grenzorbitale für (oxidiertes) Lumiflavin und Isoalloxazin. Der verwendete Basissatz ist 6-31G*

3.1 Grundzustandsrechnungen

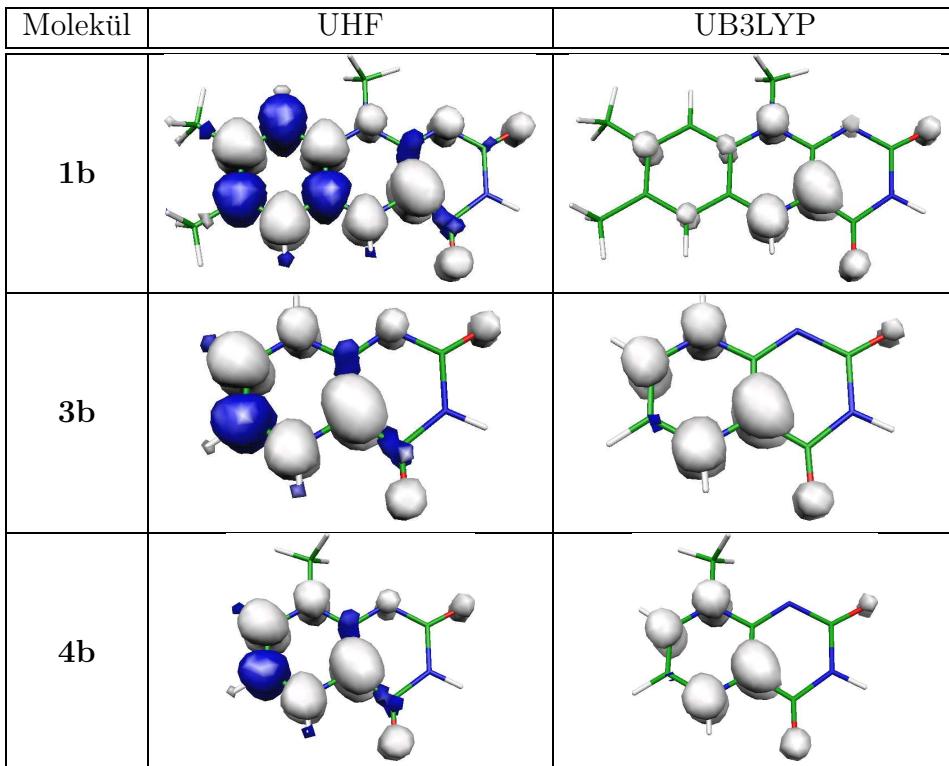


Tabelle 3.5: Spindichten der Semichinonformen (Basis 6-31G*). Die hellen Flächen stellen positive, die dunklen negative Spindichte dar.

	UHF/6-31G*	UB3LYP/6-31G*	UB3LYP/EPR-II	Experiment
$\langle \hat{S}^2 \rangle$	1,2846	0,7575	$\approx 0,75$	0,75
N1	11,4	1,7	0,1	1,3
N3	-1,0	-0,1	-1,0	0,8
N5	39,4	14,8	13,6	22,1
N10	7,1	7,7	7,6	11,7
H5	-50,6	-23,7	-21,4	-18,8
H6	-65,3	-5,4	-6,4	-5,7

Tabelle 3.6: Vergleich berechneter Hyperfeinkopplungsparameter (in MHz) mit experimentellen Werten für das Lumiflavin-Radikal **1b** im Protein *Anabaena* Flavodoxin. Die experimentellen und UB3LYP/EPR-II-Daten sind aus [91] entnommen; für den Erwartungswert des \hat{S}^2 -Operators, $\langle \hat{S}^2 \rangle$, ist dort kein genauer Wert angegeben. Die Zuordnung der experimentellen Werte zu N1 bzw. N3 ist nicht sicher und könnte auch umgekehrt sein.

3.2 Berechnung angeregter Zustände, Absorptionsspektren

3.2.1 Triplet-Zustände

Da bekannt ist, dass der (tiefste) Tripletzustand eine wesentliche Rolle bei der Photochemie der Flavine spielt [94–97], soll dieser als nächstes besprochen werden. Außerdem wird der Tripletzustand von FMN im Photozyklus von Phototropin als Zwischenprodukt angesehen (siehe Einleitung). Bei den Rechnungen in diesem Abschnitt handelt es sich wieder um UHF/6-31G*- und UB3LYP/6-31G*-Rechnungen für die oxidierte Form der Moleküle in Abbildung 3.1. Die Geometrien sind für den Tripletzustand reoptimiert worden, und es wurde sichergestellt, dass keine imaginäre Eigenfrequenz auftaucht.

Die Struktur im Tripletzustand T_1 ist weiterhin planar und Bindungs-längenänderungen bleiben unter 0,1 Å (die größte Änderung erfährt die (C4a–N5)-Bindung mit einer Verlängerung um 0,066 bis 0,087 Å, je nach betrachtetem Molekül und Rechenmethode). Die beobachteten Veränderungen kann man leicht durch die Elektronendichtevertteilung im T_1 -Zustand verstehen. In Abbildung 3.8 ist die Differenzelektronendichte zwischen T_1 und S_0 sowohl für Lumiflavin **1a** als auch Isolumazin **3a** dargestellt, wobei deutliche Unterschiede zwischen UHF und UB3LYP zu Tage treten; zum selben Ergebnis kommt man, wenn man die Mulliken-Ladungen zwischen T_1 und S_0 vergleicht (siehe Tabelle 3.2 und 3.9). So sagt UB3LYP beispielsweise eine Zunahme der Elektronendichte an N5 und eine Abnahme an N1 voraus, UHF jedoch eine Abnahme an N5 und fast keine Änderung an N1. Vergleicht man die UB3LYP-Differenzdichte mit den Grenzorbitalen in Abbildung 3.4, kommt man zum Schluss, dass in diesem Fall der T_1 -Zustand sich durch einen HOMO-LUMO-Übergang vom Grundzustand ableitet. Tatsächlich leidet die UHF-Lösung auch wieder an deutlicher Spinkontamination (z. B. $\langle \hat{S}^2 \rangle = 2,5744$ für Lumiflavin; bei UB3LYP ist der entsprechende Wert $\langle \hat{S}^2 \rangle = 2,0214$). In den folgenden Abschnitten wird weiterhin gezeigt werden, dass sich T_1 auch mit anderen Methoden als HOMO-LUMO-($\pi\pi^*$)-Übergang charakterisieren lässt, was ebenfalls für die qualitativ richtigere Beschreibung durch UB3LYP spricht. Die Ladungsänderungen für N1

Molekül	$E(\text{UHF}) [\text{E}_h]$	$\Delta [\text{E}_h]$	$E(\text{UB3LYP}) [\text{E}_h]$	$\Delta [\text{E}_h]$
1a (T_1)	-866,7713633	0,0771477	-872,0426204	0,0719397
3a (T_1)	-596,9968411	0,0820173	-600,4403280	0,0706952

Tabelle 3.7: Energien für den niedrigsten Tripletzustand T_1 der oxidierten Moleküle bei der optimierten T_1 -Geometrie. Angegeben sind auch die Energiedifferenzen zum Grundzustand S_0 .

3.2 Berechnung angeregter Zustände, Absorptionsspektren

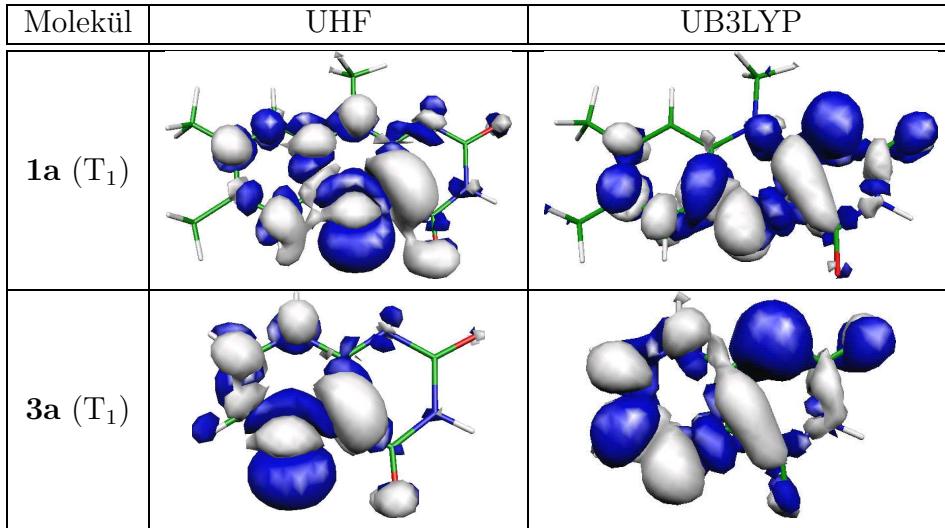


Tabelle 3.8: Elektronendichtedifferenz zwischen T_1 und S_0 bei der Geometrie des Grundzustands. Die hellen Flächen zeigen positive (d. h. größere Elektronendichte in T_1), dunkle negative Dichte (d. h. größere Elektronendichte in S_0) an.

und N5 relativ zu S_0 stimmen außerdem qualitativ mit denen von Song überein [98], der semiempirische Rechnungen auf CI-Pariser-Pople-Parr-Niveau durchgeführt hat; in diesen Rechnungen wurden jedoch nur die π -Elektronen explizit berücksichtigt. Auf Grund seiner Rechnungen sagte Song zudem eine veränderte Basizität voraus: Während im Grundzustand N1 basischer als N5 ist, ist im Triplettzustand die Lage umgekehrt.

Um das etwas genauer zu untersuchen, wurden die (Gasphasen-) Protonenaffinitäten im T_1 mit B3LYP/6-31G* für Isolumazin berechnet. Für ein Molekül A ist die Protonenaffinität PA als die Energie definiert, die bei Bildung von $A-\text{H}^\oplus$ frei wird, also $PA = E(A) - E(A-\text{H}^\oplus)$. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.10 zusammengefasst; angegeben sind die Differenzen zwischen den „SCF-Energien“ E und den Nullpunktsenergien E_0 , wo zusätzlich Änderungen bei den Schwingungsenergien berücksichtigt werden. Die Nullpunktsenergie ist dabei definiert als Summe aus E und der Nullpunktsschwingungsenergie $E_{vib}^{(0)} := \sum_{i=1}^{3N-6} \frac{1}{2} h\nu_i$ mit N als Anzahl der Atome; die Frequenzen sind nicht skaliert worden. Der Triplettzustand wird als basischer als der Grundzustand vorhergesagt, was auch experimentell beobachtet wird: der Grundzustand von Lumiflavin weist einen pK_a -Wert von ca. 0 auf, der pK_a -Wert für Triplett-Flavin beträgt 4,4 [99]. Nebenbei sei angemerkt, dass im Triplettzustand nur das an N5 protonierte Molekül weiterhin planar ist (im Grundzustand sind sowohl die an N1 als auch an N5 protonierten Moleküle planar).

Die Spindichte im T_1 -Zustand (Abbildung 3.11) ist qualitativ ähnlich zur Spindichte der Semichinonform, lediglich eine erhöhte Spindichte an N1 und im Benzolring von **1a** fällt auf. Die größte Spindichte ergibt sich an den Atomen N1, C4a

Ergebnisse der quantenchemischen Rechnungen

Atom	1a (T_1)		3a (T_1)	
	HF	B3LYP	HF	B3LYP
N1	-0,765	-0,545	-0,728	-0,514
O2	-0,589	-0,462	-0,588	-0,450
N3	-0,932	-0,681	-0,933	-0,682
O4	-0,607	-0,474	-0,603	-0,460
C4a	-0,019	+0,195	-0,005	+0,191
N5	-0,423	-0,590	-0,326	-0,473
C5a/C6	+0,286	+0,320	-0,008	+0,060
N10/N8	-0,873	-0,578	-0,865	-0,623

Tabelle 3.9: Mullikenladungen im T_1 -Zustand an ausgewählten Atomen, Numerierung nach Abbildung 3.1. Wo mehrere Atomnummern angegeben sind, bezieht sich die erste auf Lumiflavin **1a**, die zweite auf Isolumazin **3a**.

	S_0		T_1	
	$-\Delta E$ [eV]	$-\Delta E_0$ [eV]	$-\Delta E$ [eV]	$-\Delta E_0$ [eV]
3d	9,82	9,47	9,21	8,89
3e	9,38	9,03	10,13	9,75

Tabelle 3.10: DFT B3LYP/6-31G*-Protonenaffinitäten $PA = -\Delta E$ bzw. $PA = -\Delta E_0$ an den Atomen N1 and N5 für Isolumazin **3d**, **3e** (Gasphase).

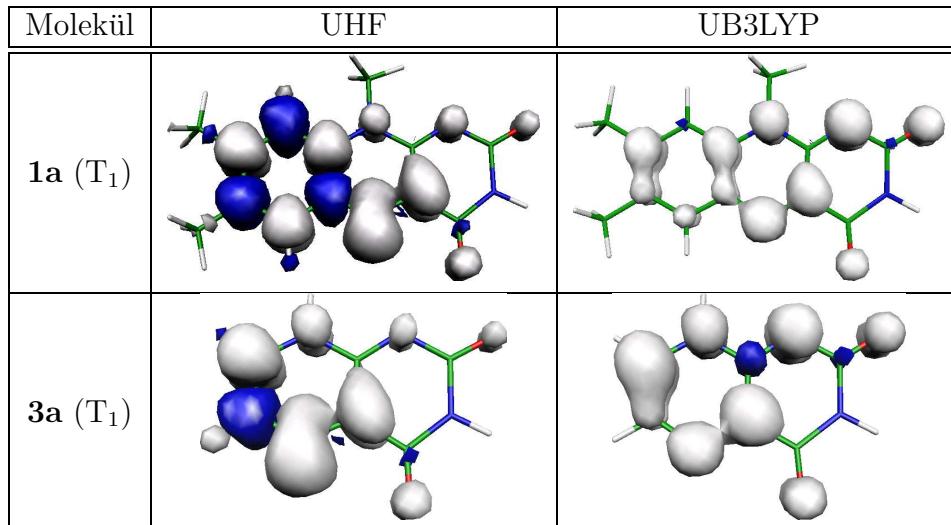


Tabelle 3.11: Triplet-(T_1)-Spindichte. Die hellen Flächen zeigen positive, die dunklen negative Spindichte an.

3.2 Berechnung angeregter Zustände, Absorptionsspektren

und N5. Leider liegen nur wenige experimentelle Daten über die Spinverteilung in Triplet-Flavinen vor, was die Vergleichsmöglichkeiten einschränkt; EPR-Messungen an verschiedenen flavinartigen Systemen zufolge [100], befinden sich tatsächlich die größten Spindichten an N1 und N5. Auch die Atome C7 und C8 in Flavinen weisen eine gewisse Spindichte auf. Da die Aussagen in [100] auf Grund von relativen Veränderungen des EPR-Spektrums in Abhängigkeit des Protonierungszustands und durch Substituentenvariation an den Ringatomen gemacht worden sind, ist insbesondere die Spindichte an C4a nicht bekannt, weil hier kein substituierbarer Rest vorhanden ist. Somit ist die berechnete B3LYP-Spindichte in guter Übereinstimmung mit experimentellen Daten. Die UHF-Spindichte weist wiederum relativ große negative Werte auf, erscheint zugleich wegen der größeren Spinverunreinigung (analog zum Semichinonradikal) aber auch weniger sinnvoll zu sein.

Zusammenfassend kann man sagen, dass der T_1 -Zustand sowohl Elektrophilen (vgl. stärkere Basizität) als auch Radikalen gegenüber (kann als Biradikal aufgefasst werden) erhöhte Reaktivität aufweisen sollte; in beiden Fällen ist (zumindest nach der Frontier-MO-(FMO)-Theorie [27]) besonders N5 als „Angriffspunkt“ wahrscheinlich. Bei radikalischen Reaktionen könnten aber auch die Atome N1 und C4a eine Rolle spielen. Des Weiteren lässt sich der T_1 -Zustand als typischer HOMO-LUMO- $(\pi\pi^*)$ -Zustand beschreiben. Alle zuvor beschriebenen Eigenschaften lassen sich qualitativ damit erklären.

3.2.2 Angeregte Zustände: Modell Uracil

Höher angeregte Zustände müssen im allgemeinen mit anderen Methoden beschrieben werden, außerdem muss man meist größere Basissätze als für den Grundzustand verwenden, weil angeregte Zustände beispielsweise oft „diffuser“ sind. Um zu testen, welche Methoden und Basissätze für die hier betrachteten Flavine geeignet sind, wurden CIS, zeitabhängige Dichtefunktionaltheorie (TD-DFT) und Multireferenz DFT (DFT-MRCI, Kapitel 2.4) auf das flavinverwandte Uracil, Abbildung 3.3, angewendet. Uracil ist klein genug für eine systematische Studie, und außerdem existieren mehrere experimentelle Spektren, mit denen verglichen werden kann. Methoden, die das experimentelle Spektrum angemessen nachbilden konnten, wurden als geeignet für die Berechnung der angeregten Zustände erachtet.

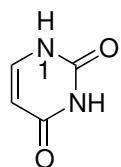


Abbildung 3.3: Uracil

Ergebnisse der quantenchemischen Rechnungen

	/6-31G*	/6-31+G*	CIS /cc-pVTZ	/aug-cc-pVTZ	exp.
$1^1A' \rightarrow 1^3A'$	3,44	3,44	3,44	3,43	
$2^3A'$	5,68	5,70	5,72	5,72	
$1^3A''$	5,71	5,75	5,74	5,74	
$1^1A''$	6,29	6,32	6,33	6,32	
$2^1A'$	6,67	6,49	6,47	6,35	5,08
:	:	:	:	:	
$3^1A'$	8,62	8,20	8,47	8,19	6,05
Basisfunktionen	128	160	296	460	
Zeit	12'	26'	14h 52'	102h 32'	

Tabelle 3.12: Vertikale CIS-Anregungsenergien in eV für Uracil mit verschiedenen Basissätzen bei der B3LYP/6-31G*-optimierten Grundzustandsgeometrie (nicht alle berechneten Übergänge sind angegeben). Experimentell beobachtete Übergänge sind fett gedruckt. Die Zeiten beziehen sich auf die benötigte Rechenzeit auf einem Pentium 3 Prozessor mit 733 MHz. Die experimentellen Werte sind Ref. [101] entnommen.

CIS und TD-DFT wurden in Verbindung mit Basissätzen, angefangen von split valence ohne Polarisations- und diffuse Funktionen (6-31G, 80 Basisfunktionen), bis hin zu aug-cc-pVTZ (460 Basisfunktionen), benutzt. Es sind jeweils die zehn niedrigsten Singulett- und zehn tiefsten Triplettzustände bei der optimierten B3LYP/6-31G*-Grundzustandsgeometrie, also S_0 , ausgerechnet worden. Zusätzlich wurde die DFT-MRCI-Methode bei Verwendung der SV(P)-Basis [40] (die von ähnlicher Qualität wie eine 6-31G*-Basis ist) verwendet. Bei CIS und TD-DFT wurden die Standardkonvergenzkriterien für Energie und Wellenfunktion für Einzelpunktrechnungen verwendet (siehe Gaussian 98 Handbuch [42]), Konvergenzkriterium bei DFT-MRCI ist $5 \cdot 10^{-6} E_h$. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 3.12 und 3.13 zusammengefasst.

Experimentelle Spektren von Uracil sind mehrfach veröffentlicht worden, die meisten davon sind in Lösungsmitteln, vor allem Wasser, aufgenommen worden. Das Absorptionsspektrum zeigt in diesen Fällen eine strukturlose Bande bei ca. 260 nm ($\approx 38500 \text{ cm}^{-1}$ oder 4,77 eV), gefolgt von einer zweiten Bande ähnlicher Intensität bei 210 nm ($\approx 47600 \text{ cm}^{-1}$ oder 5,90 eV) [102]. Gasphasenspektren von Uracil sind ebenfalls bekannt, sind aber auch relativ breit und denen in Lösung ähnlich [101, 103], jedoch mit einer Blauverschiebung versehen; die langwelligste Absorption besitzt ein Maximum bei etwa 244 nm ($\approx 41000 \text{ cm}^{-1}$ oder 5,08 eV) gefolgt von einer Bande bei 205 nm ($\approx 48800 \text{ cm}^{-1}$ oder 6,05 eV), die als Schulter eines intensiveren Übergangs bei 187 nm ($\approx 53500 \text{ cm}^{-1}$ oder 6,63 eV) auftritt.²

²In Düsenstrahlexperimenten konnte zwar auch ein hochauflösendes Floureszenz-Anregungsspektrum erhalten werden, mit einem 0-0-Übergang bei 35288 cm^{-1} ($\approx 4,375 \text{ eV}$), der als ($n \rightarrow \pi^*$)-Übergang interpretiert wurde [104] und damit dem ($1^1A' \rightarrow 1^1A''$)-Übergang in den Tabellen 3.12 und 3.13 entsprechen würde, jedoch wurde später nachgewiesen, dass es sich anscheinend dabei nicht um Uracil, sondern ein unter den Messbedingungen entstandenes Produkt handelt [103].

3.2 Berechnung angeregter Zustände, Absorptionspektren

	TD-B3LYP										DFT-MRCI /SV(P)	exp.
	/6-31G	/6-311G	/SV(P)	/6-31G*	/6-31G**	/6-31+G*	/cc-pVDZ	/cc-pVTZ	/aug-cc-pVTZ			
$1^1A' \rightarrow 1^3A'$	3,43	3,44	3,43	3,42	3,42	3,42	3,42	3,40	3,38	3,66		
$1^3A''$	4,23	4,25	4,24	4,27	4,25	4,32	4,23	4,27	4,26	4,25		
$1^1A''$	4,65	4,67	4,65	4,67	4,66	4,71	4,63	4,66	4,64	4,45		
$2^3A'$	4,67	4,67	4,73	4,74	4,74	4,75	4,71	4,73	4,71	4,97		
$2^1A'$	5,31	5,28	5,31	5,31	5,30	5,20	5,27	5,20	5,11	5,48	5,08	
$3^3A'$	5,33	5,34	5,46	5,43	5,43	5,37	5,44	5,41	5,34	5,74		
$2^3A''$	5,50	5,51	5,52	5,55	5,54	5,57	5,49	5,53	5,49	5,71		
$3^3A''(*)$	6,99	6,27	6,53	6,90	6,93	5,67	6,43	6,23	5,58	6,87		
$2^1A''(*)$	7,21	6,42	6,70	7,13	7,15	5,75	6,60	6,37	5,64	7,03		
$3^1A''$	5,81	5,81	5,79	5,82	5,81	5,83	5,76	5,78	5,74	5,90		
$3^1A'$	6,01	5,98	5,98	5,99	5,98	5,93	5,92	5,91	5,85	6,06	6,05	
$4^3A'$	5,85	5,86	5,94	5,94	5,93	5,91	5,92	5,93	5,87	6,28		
$4^3A''$	6,01	6,01	6,04	6,04	6,03	6,04	6,00	6,02	5,96	6,46		
$4^1A''$	6,17	6,18	6,22	6,22	6,21	6,19	6,19	6,20	6,12	6,51		
$5^3A''(*)$	—	—	—	7,69	7,69	6,41	—	—	6,25	7,75		
$4^1A''(*)$	—	7,13	7,37	—	—	6,27	7,28	7,08	6,27	—		
$5^3A''$	6,38	6,39	6,44	6,47	6,46	6,43	6,44	6,44	6,37	6,79		
$5^1A'$	6,63	6,60	6,72	6,68	6,68	6,51	6,68	6,56	6,39	6,81	6,63	
$6^1A'$	7,62	—	7,37	7,65	7,65	—	7,65	—	—	7,60		
Basisfunktionen	80	116	120	128	140	160	132	296	460	120		
Zeit	1h 15'	2h 15'	2h 52'	3h 26'	3h 53'	6h 23'	7h 17'	27h 03'	140h 14'	\approx 0h 5'		

Tabelle 3.13: Vertikale TD-B3LYP- und DFT-MRCI-Anregungsenergien in eV für Uracil mit verschiedenen Basissätzen bei der B3LYP/6-31G*-optimierten Grundzustandsgeometrie. Zustände mit (*) zeigen starke Basissatz-abhängigkeit, die dominierenden (sichtbaren) Übergänge sind fett gedruckt. Die Zeiten beziehen sich auf die benötigte Rechenzeit auf einem Pentium 3 Prozessor mit 733 MHz. Die experimentellen Werte sind Ref. [101] entnommen.

Ergebnisse der quantenchemischen Rechnungen

	TD-B3LYP /6-31G*	/aug-cc-pVTZ	DFT-MRCI /SV(P)
$1^1A' \rightarrow 1^1A''$	0,0001	0,0000	0,0005
2 $^1A'$	0,1156	0,1227	0,2554
$2^1A''(*)$	0,0001	0,0021	0,0001
$3^1A''$	0,000	0,0000	0,0000
3 $^1A'$	0,0421	0,0331	0,0703
$4^1A''$	0,0000	0,0004	0,0002
$4^1A'(*)$	—	0,0353	—
5 $^1A'$	0,1058	0,1072	0,1933

Tabelle 3.14: Oszillatorstärken für einige Singulett-Singulett-Übergänge aus Tabelle 3.13 (Bezeichnungen wie dort).

Die Ergebnisse der Rechnungen zeigen, dass die mit CIS erhaltenen Anregungsenergien stets größer als die mit TD-B3LYP oder DFT-MRCI berechneten sind, und zwar unabhängig vom gewählten Basissatz. Nur die Energiedifferenz zwischen Grundzustand und dem niedrigsten Triplettzustand $1^3A'$ ($\equiv T_1$) ist relativ ähnlich (ca. 3,4 eV) und passt auch gut zu der Energiedifferenz ΔE , die man mit UB3YLP/6-31G* für den T_1 -Zustand bei der Grundzustandsgeometrie bekommt, nämlich 3,65 eV, was insbesondere mit dem DFT-MRCI-Resultat übereinstimmt. Der T_1 -Zustand geht bei allen Methoden aus einem HOMO-LUMO-Übergang hervor (vgl. auch Tabelle 3.4); der entsprechende spineraubte Übergang $1^1A' \rightarrow 2^1A'$ gehört offensichtlich zur langwelligen Absorptionsbande von Uracil. CIS überschätzt selbst mit der größten verwendeten Basis (aug-cc-pVTZ) diesen Übergang um etwa 1,3 eV, wohingegen TD-B3LYP und DFT-MRCI wesentlich kleinere Abweichungen vom Experiment zeigen. Dieser Trend verschärft sich weiter, wenn man zu höheren Anregungsenergien geht.

Bei niedrigerer Energie als dem eben beschriebenem ($1^1A' \rightarrow 2^1A'$)-Übergang befindet sich noch der wenig intensive ($1^1A' \rightarrow 1^1A''$)-Übergang, der als ($n \rightarrow \pi^*$)-Übergang klassifiziert werden kann. Das zugehörige n-Orbital ist in Abbildung 3.4 dargestellt und ist hauptsächlich an den beiden Sauerstoffatomen O2 und O4 lokalisiert. Generell sind alle berechneten Übergänge in A'' -Zustände um etwa den Faktor 1000 schwächer als ($A' \rightarrow A'$)-Übergänge, siehe Tabelle 3.14. Die DFT-MRCI-Oszillatorstärken sind übrigens durchweg um etwa den Faktor 2 größer als die TD-DFT-Oszillatorstärken.

Auffallend ist weiterhin die geringe Basissatzabhängigkeit für TD-B3YLP für die meisten, auch höher angeregten Zustände. Diese Eigenschaft wurde auch bei DFT-MRCI beobachtet [105], ist in der hier vorliegenden Arbeit jedoch nicht näher untersucht worden. Demzufolge werden Grundzustand und angeregte Zustände durch die Erweiterung der Basis in der Energie etwa gleich stark abgesenkt, und die zusätzlichen Basisfunktionen sollten wenig an den jeweiligen Übergängen beteiligt

3.2 Berechnung angeregter Zustände, Absorptionsspektren

sein. Dennoch bleibt als grundlegender Trend eine gewisse Rotverschiebung bei Vergrößerung der Basis festzustellen (vgl. Tabelle 3.13 und Abbildung 3.5).

Einige Anregungsenergien hängen im Gegensatz dazu stark davon ab, ob diffuse Funktionen im Basissatz vorhanden sind, oder nicht (in Tabelle 3.13 mit (*) gekennzeichnet). Die Betrachtung der beteiligten Orbitale zeigt, dass dies stets angeregte Zustände mit „Rydberg-artigem“ Charakter sind, das heißt, Elektronendichte wird in relativ weit von den Kernen entfernte Orbitale transferiert. Andererseits besitzen diese Übergänge nur eine kleine Oszillatormoment, und stellen auch nicht die niedrigsten angeregten Zustände dar, die für die Reaktivität des angeregten Flavins die relevanten sein dürften.

In Abbildung 3.5 sind mit den berechneten TD-B3LYP-Daten simulierte Absorptionsspektren für drei getestete Basissätze dargestellt. Eine homogene Verbreiterung der Linien wurde durch Multiplikation mit (normierten) Gaußverteilungen erreicht:

$$A(\tilde{\nu}) \sim \sum_i \frac{f_i}{\sigma \sqrt{2\pi}} e^{-1/2((\tilde{\nu} - \tilde{\nu}_i)/\sigma)^2} \quad (3.1)$$

Die Standardabweichung σ für alle Übergänge i mit der Wellenzahl $\tilde{\nu}_i$ und Oszillatormoment f_i wurde hier auf 1300 cm^{-1} gesetzt, wodurch Effekte wie Verbreiterung durch Schwingungs- und Rotationsniveaus, endliche Lebensdauer und nichtvertikale Übergänge, etc. grob nachgeahmt werden sollen.

Zusammenfassend für diesen Abschnitt lässt sich feststellen, dass sowohl die Anregungsenergien von TD-B3LYP als auch DFT-MRCI wesentlich besser mit dem Experiment übereinstimmen als die CIS-Ergebnisse. Außerdem zeigt sich TD-DFT als „relativ stabil“ gegenüber Variationen des Basissatzes, deutliche Probleme traten nur bei außerordentlich diffusen angeregten Zuständen auf, die kleinere Basen prinzipiell nicht beschreiben können. Da die Rechenzeit für CIS und TD-DFT etwa mit der dritten Potenz der Anzahl der Basisfunktionen zunimmt, erscheint es sinnvoll, im folgenden die angeregten Zustände von Flavin ohne solche diffusen Funktionen

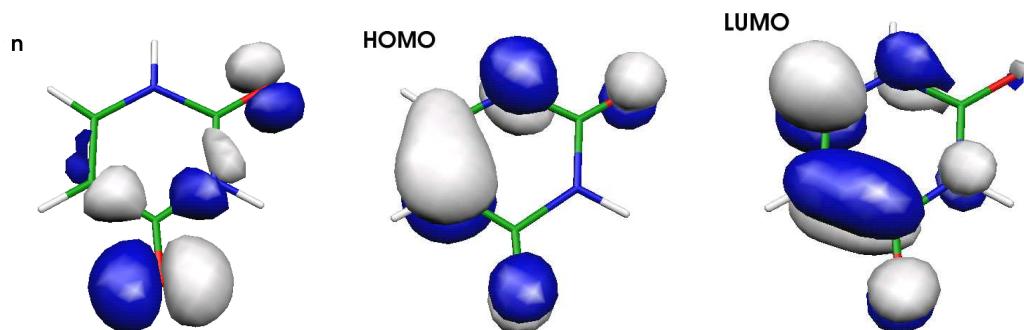


Abbildung 3.4: B3LYP/6-31G*-Grenzorbitale von Uracil. Das n-Orbital ist HOMO-1.

Ergebnisse der quantenchemischen Rechnungen

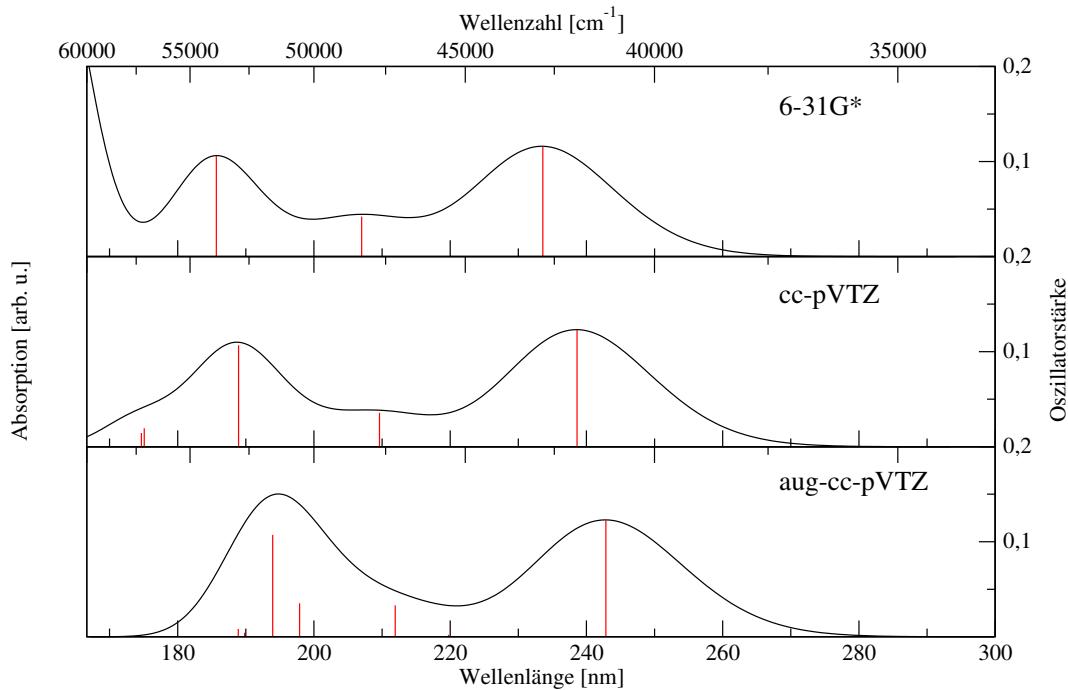


Abbildung 3.5: Mit TD-B3LYP und verschiedenen Basissätzen berechnete Absorptionsspektren für Uracil. Die Oszillatiorstärken beziehen sich auf das Linienspektrum (in rot), die verbreiterten Spektren sind daraus durch Multiplikation mit Gaußverteilungen entstanden, siehe Text.

zu berechnen, vgl. Tabelle 3.12 und 3.13. Damit ist die Basis 6-31G* ein guter Kompromiss zwischen Genauigkeit und Schnelligkeit der Rechnungen.

3.2.3 Angeregte Zustände von Lumiflavin

In diesem Abschnitt soll das Absorptionsspektrum von Lumiflavin **1a** diskutiert werden. Neben TD-DFT wurde wieder CIS und DFT-MRCI verwendet. Außerdem ist bei den zeitabhängigen DFT-Rechnungen diesmal auch das BHLYP-Funktional ausgetestet worden, das bei DFT-MRCI die Referenzorbitale liefert, siehe Kapitel 2.4. Da vertikale Anregung vorausgesetzt wird, ist die verwendete Geometrie die (mit B3LYP/6-31G*) optimierte Grundzustandsgeometrie.

Die erhaltenen Anregungsenergien sind in Tabelle 3.15 zusammengefasst. Wie erwartet, sind die CIS-Anregungsenergien deutlich zu hoch. Wenn man die TD-DFT-Resultate untereinander vergleicht, sieht man, dass erstens, der Wechsel der Basis von 6-31G* nach SV(P) keine großen Auswirkungen hat (wie erwartet), zweitens hingegen, der Wechsel des Funktionalen von B3LYP nach BHLYP eine deutliche Anhebung der Anregungsenergien bewirkt. Offensichtlich ist dies eine Folge des

3.2 Berechnung angeregter Zustände, Absorptionsspektren

	CIS / 6-31G*	TD-B3LYP / 6-31G*	TD-B3LYP / SV(P)	TD-BHLYP / SV(P)	DFT-MRCI / SV(P)	exp.
$1^1A' \rightarrow 1^3A'$	2,41	2,07	2,07	1,96	2,23	
$1^3A''$	3,61	2,76	2,70	3,09	2,86	
2 $1^1A'$	4,33	3,04	3,04	3,51	2,96	2,78
$2^3A'$	3,35	2,84	2,85	2,66	3,08	
$2^3A''$	–	2,94	2,93	3,89	3,13	
$2^1A''$	4,70	3,09	3,07	4,30	3,14	
$1^1A''$	–	3,30	3,26	3,86	3,30	
$3^3A'$	–	3,35	3,34	3,69	3,59	
$3^3A''$	–	3,61	3,57	4,62	3,74	
$4^3A'$	–	3,62	3,61	3,82	3,80	
$3^1A''$	–	3,84	3,80	5,04	3,81	
3 $1^1A'$	5,19	3,86	3,87	4,38	3,90	3,35
$4^1A'$	–	4,00	3,99	5,12	4,05	
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	
5 $1^1A'$	6,09	4,91	4,72	5,42	4,89	4,59

Tabelle 3.15: Berechnete Anregungsenergien für Lumiflavin mit verschiedenen Methoden (in eV) bei der optimierten B3LYP/6-31G*-Grundzustandsgeometrie. Zustände, die das Spektrum in Abbildung 3.6 dominieren, sind fett gedruckt. Die experimentellen Werte sind Ref. [106] entnommen und beziehen sich auf Lumiflavin in Wasser bei Raumtemperatur.

größeren Anteils an „exaktem“ Austausch in BHLYP (50%) verglichen mit B3LYP (20%); CIS entspricht einem exakten Austausch von 100%, und liefert noch höhere Anregungsenergien. Die BHLYP-basierte DFT-MRCI-Methode berechnet wiederum Energien, die mit TD-B3LYP vergleichbar sind. für

Wie bei Uracil sind bei Lumiflavin nur die ($A' \rightarrow A'$)-Übergänge intensiv, Anregungen in A'' -Zustände sind viel schwächer. Interessanterweise sind bei Lumiflavin die Reihenfolge der niedrigsten Singulettzustände vertauscht: im Gegensatz zu Uracil ist hier der niedrigste angeregte Zustand von A' -Symmetrie, und entspricht dem HOMO-LUMO-($\pi \rightarrow \pi^*$)-Übergang. Der ($1^1A' \rightarrow 1^1A''$)-Übergang entspricht dem zu Uracil analogen ($n \rightarrow \pi^*$)-Übergang; das beteiligte n-Orbital sieht qualitativ bei Lumiflavin aus wie bei Uracil [58].

Für Lumiflavin, oder ähnliche Moleküle wie Riboflavin und FMN, konnten in der Literatur keine Gasphasenspektren gefunden werden, was an der geringen Flüchtigkeit im Vergleich zu Uracil liegen mag. Somit kann man nur mit Lösungsspektren oder Spektren proteingebundener Flavine vergleichen. In Wasser besteht das Absorptionsspektrum bis 240 nm aus drei Banden: zwei charakteristischen Banden bei 446 nm ($\approx 22400 \text{ cm}^{-1}$ oder 2,78 eV) und bei 370 nm ($\approx 27000 \text{ cm}^{-1}$ oder 3,35 eV), denen eine intensive Bande bei 270 nm ($\approx 37000 \text{ cm}^{-1}$ oder 4,59 eV) folgt [106]; Spektren für Riboflavin bzw. FMN sehen praktisch genauso aus. Diese Zahlen stehen in guter Übereinstimmung mit den in Abbildung 3.6 dargestellten berechneten Spektren. Die Verbreiterung wurde wiederum durch eine Überlagerung mit Gaußkurven erreicht; die Berechnung des Extinktionskoeffizienten

Ergebnisse der quantenchemischen Rechnungen

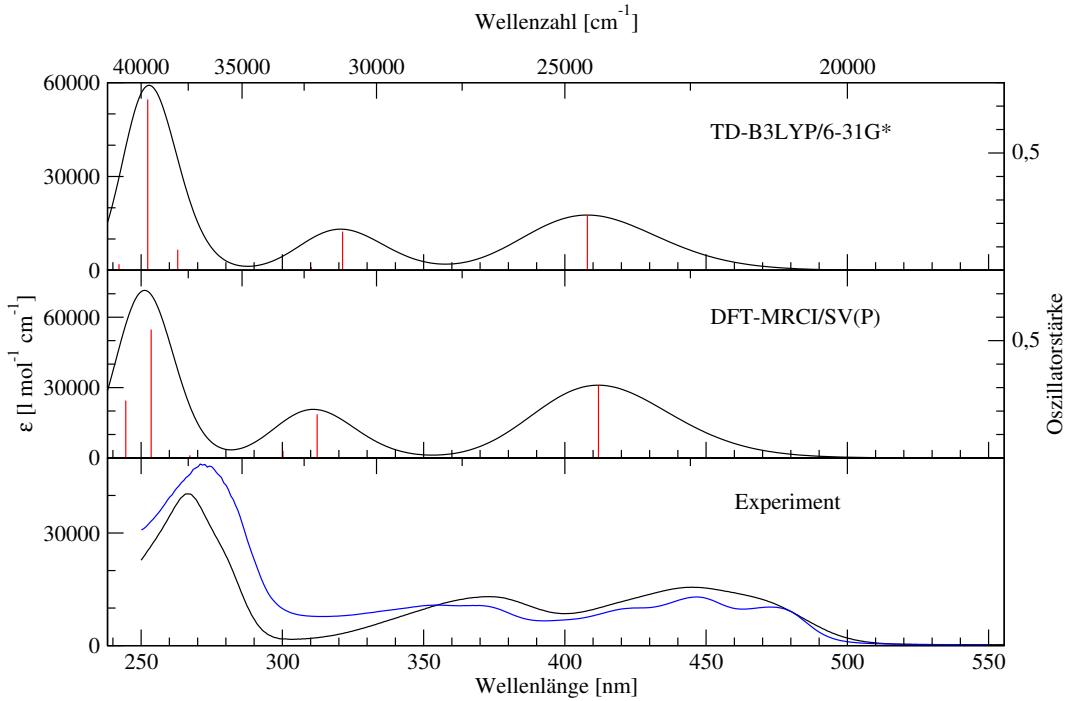


Abbildung 3.6: Berechnete Absorptionsspektren für Lumiflavin. Die Oszillatorenstärken beziehen sich auf das Linienspektrum (in rot), die verbreiterten Spektren sind aus Gl. (3.2) mit $\sigma = 1000 \text{ cm}^{-1}$ berechnet. Das experimentelle Spektrum (schwarz) gehört zu FMN in Wasser bei Raumtemperatur [107]. Das in blau gezeichnete Spektrum ist das der LOV1-Domäne bei Raumtemperatur [19]; für dieses Spektrum wurde ε nicht bestimmt.

ε erfolgte gemäß (vgl. [108])

$$\varepsilon(\tilde{\nu}) = \sum_i \frac{f_i}{\kappa} \frac{1}{\sigma \sqrt{2\pi}} e^{-1/2((\tilde{\nu}-\tilde{\nu}_i)/\sigma)^2}, \quad (3.2)$$

mit

$$\kappa = \frac{4m_e c^2 \varepsilon_0 \ln 10}{N_A e^2} = 4,318998 \cdot 10^{-10} \text{ mol m}^{-1}. \quad (3.3)$$

Die so berechneten Extinktionskoeffizienten fallen im Vergleich zum Experiment etwas zu groß aus, qualitativ wird das Spektrum aber richtig beschrieben. Außerdem sind die berechneten Übergänge relativ zum Experiment (analog zu Uracil) blauverschoben, was zum Teil an der verwendeten Basis liegt, zum Teil darauf zurückzuführen ist, dass das Lösungsmittel das experimentelle Spektrum vermutlich etwas rotverschiebt (siehe vorangegangener Abschnitt).

Andere experimentelle Befunde stimmen ebenfalls mit der Theorie überein. So beobachtet man bei Absorptionsspektren von FMN in einer Proteinumgebung oder

3.2 Berechnung angeregter Zustände, Absorptionsspektren

von in Ethanol gelöstem Lumiflavin bzw. Riboflavin bei tiefen Temperaturen (ca. 80 K) eine Schwingungsfeinstruktur im Spektrum [16, 109, 110]. Die Bande des niedrigsten Übergangs ($\text{HOMO} \rightarrow \text{LUMO}$ bzw. $S_0 \rightarrow S_1$) spaltet in drei Peaks auf, die ca. 1250 bis 1300 cm^{-1} auseinander liegen, Abbildung 3.6. Dieser Energieabstand entspricht (C-N)- und (C-C)-Schwingungen des Ringgerüsts von Lumiflavin [111], und demzufolge sollte hauptsächlich dort die Anregung lokalisiert sein, was in Einklang mit den theoretischen Ergebnissen steht (vgl. Tabelle 3.4). Wegen der relativ großen Delokalisation von HOMO und LUMO weicht das Dipolmoment im ersten angeregten Zustand (10,5 D) wenig vom Grundzustand (9,0 D, jeweils DFT-MRCI-Werte) ab, was konsistent mit Dipolmessungen an FMN, FAD und N(3)-Methyl-N(10)-isobutyl-7,8-dimethyl-isoalloxazin ist [110], wo der S_1 etwa 1 D polarer als der Grundzustand ist.

Triplet-Spektrum: Im folgenden soll das Triplet-Absorptionsspektrum von Lumiflavin besprochen werden. Dies ist von besonderem Interesse, da es einerseits weniger intensiv untersucht worden ist als das (Singulett-) Grundzustandsspektrum, andererseits wurde bei der Untersuchung der Photoreaktion von Phototropin mit Blitzlichtphotolyse (und auch bei vielen anderen Photoreaktionen von Flavinen) ein kurzlebiges Intermediat detektiert, das als Triplet-Flavin interpretiert worden ist [19, 20]. Die Frage ist, ob die bisher besprochenen Verfahren dieses Spektrum nachbilden können oder nicht.

Neben den (Differenz-)Spektren in Proteinen, existieren auch Lösungsspektren von Triplet-Flavinen in der Literatur [112, 113], vgl. Abbildung 3.7. Das Spektrum weist eine breite Bande bei ca. 690 nm auf, die Maxima bei 715 nm ($\approx 14000 \text{ cm}^{-1}$ oder 1,73 eV) und 660 nm ($\approx 15200 \text{ cm}^{-1}$ oder 1,88 eV) besitzt, die wahrscheinlich eine Schwingungsfeinstruktur darstellen [113]. Es folgen eine schwächere Bande bei 494 nm ($\approx 20200 \text{ cm}^{-1}$ oder 2,51 eV), eine intensiverer Übergang bei 377 nm ($\approx 26500 \text{ cm}^{-1}$ oder 3,29 eV) und eine sehr starke Bande bei 270 nm ($\approx 37000 \text{ cm}^{-1}$ oder 4,59 eV). Verglichen mit dem Singulettspktrum ist das Tripletspektrum also stark rotverschoben.

In Tabelle 3.16 sind die bei der UB3LYP/6-31G*-optimierten T_1 -Geometrie berechneten Anregungsenergien aufgelistet, in Abbildung 3.7 sind die dazugehörigen (verbreiterten) Spektren aufgetragen. Wegen fehlender experimenteller Extinktionskoeffizienten kann nur qualitativ verglichen werden.

Wie man sieht, wird die ungefähre Lage der Übergänge durch alle Methoden richtig wiedergegeben, allerdings stimmt nur das UTD-B3LYP-Spektrum auch von den Peakintensitäten her mit dem gemessenen überein, wenn auch die einzelnen Banden bei etwas höherer Energie erscheinen, genau wie das für das Grundzustandspektrum der Fall war. RTD-B3LYP und DFT-MRCI passen hingegen weniger gut zum Experiment. Weiterhin sind die Oszillatorstärken bei RTD-B3YLP auffallend

Ergebnisse der quantenchemischen Rechnungen

	UTD-B3LYP /6-31G*	RTD-B3LYP /6-31G*	DFT-MRCI /SV(P)	exp.
$1^3A' \rightarrow 2^3A'$	1,00	0,94	0,99	
$1^3A''$	0,98	0,98	1,02	
$2^3A''$	1,00	1,09	1,03	
$3^3A'$	1,60	1,45	1,54	
$3^3A''$	1,69	1,64	1,64	
$4^3A'$	1,91	1,86	1,85	
5 $^3A'$	2,30	2,20	2,17	1,73; 1,88
$4^3A''$	2,25	2,29	2,20	
6 $^3A'$	2,90	2,69	2,65	$\left. \begin{array}{l} 2,78 \\ \end{array} \right\}$
7 $^3A'$	3,00	2,96	2,79	
$5^3A''$	3,26	3,11	3,13	
8 $^3A'$	3,55	3,23	3,25	3,29

Tabelle 3.16: Mit verschiedenen Methoden berechnete Triplett-Triplett-Anregungsenergien für Lumiflavin (in eV). Die experimentellen Daten beziehen sich auf FMN in wässriger Lösung [112].

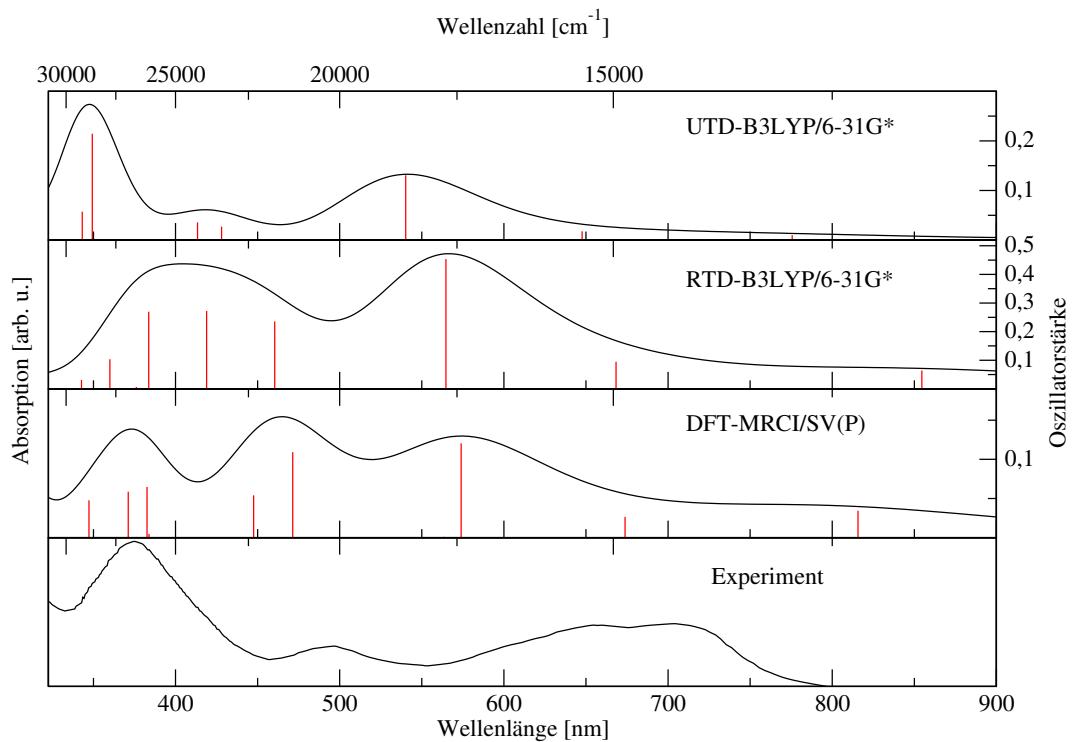


Abbildung 3.7: Berechnete Triplett-Absorptionsspektren für Lumiflavin. Die Verbreiterung erfolgte durch Anwendung von Gl. (3.1) mit $\sigma = 1000 \text{ cm}^{-1}$. Das experimentelle Spektrum ist [112] entnommen.

3.2 Berechnung angeregter Zustände, Absorptionsspektren

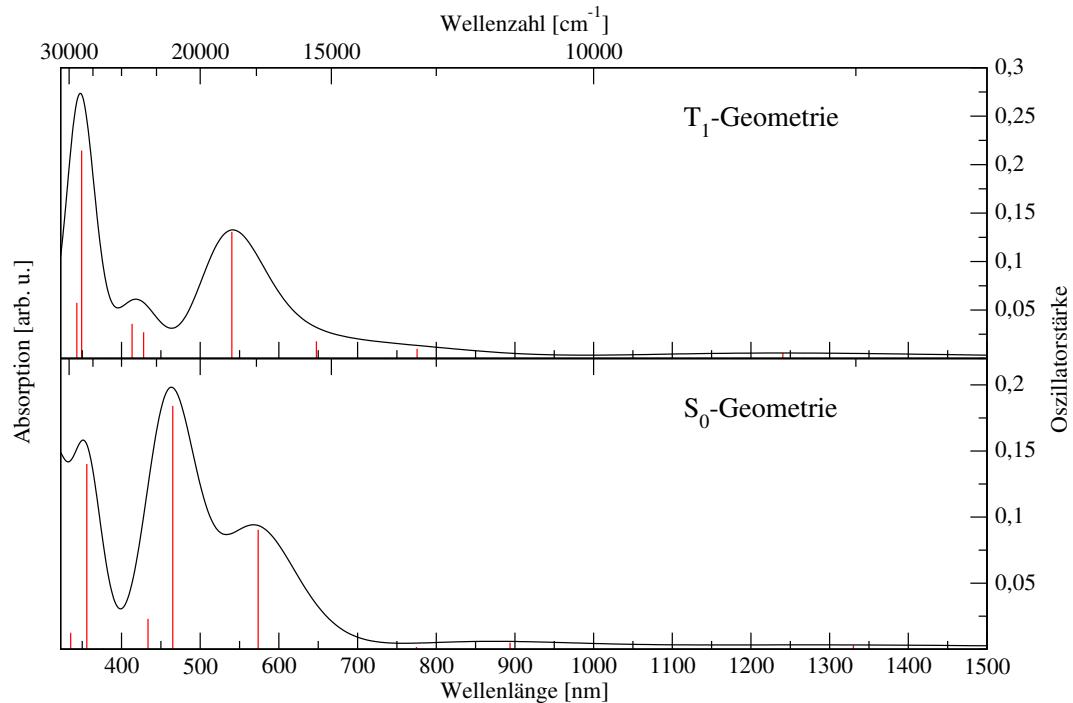


Abbildung 3.8: Mit TD-UB3LYP/6-31G* berechnetes Triplet-Absorptionsspektrum für Lumiflavin bei der T_1 - und S_0 -Geometrie. Verbreiterung nach Gl. (3.1) mit $\sigma = 1000 \text{ cm}^{-1}$.

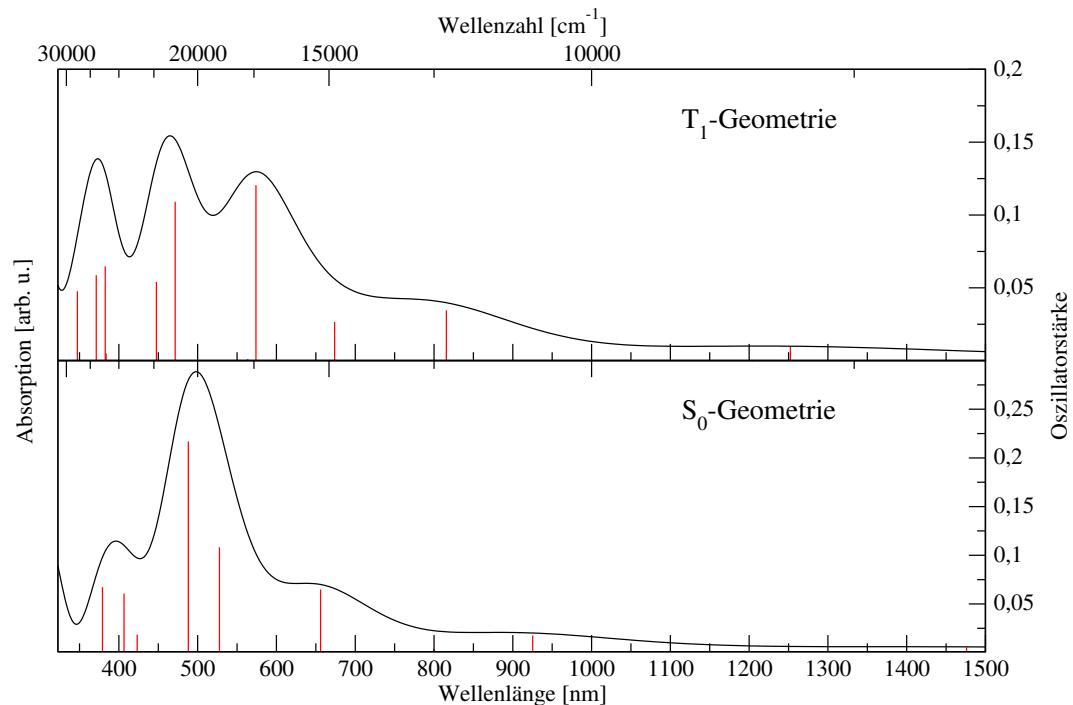


Abbildung 3.9: Mit DFT-MRCI/SV(P) berechnetes Triplet-Absorptionsspektrum für Lumiflavin bei der T_1 - und S_0 -Geometrie. Verbreiterung nach Gl. (3.1) mit $\sigma = 1000 \text{ cm}^{-1}$.

Ergebnisse der quantenchemischen Rechnungen

größer als bei den anderen beiden Methoden. Es soll in diesem Zusammenhang nicht verschwiegen werden, dass in neueren Gaussian 98-Versionen (ab Rev. A.10) die Berechnung von Übergangsmomenten zwischen angeregten Zuständen mit TD-HF und TD-DFT deaktiviert worden ist, weil „nicht alle Terme korrekt berechnet werden“ [114]³ Insofern sind die berechneten RTD-B3LYP-Oszillatorstärken fragwürdig. Die DFT-MRCI-Methode liefert aber ebenfalls keine gute Übereinstimmung mit dem Experiment, wenn auch die Größenordnung der Oszillatorstärken besser mit UTD-B3LYP übereinstimmt; sie ist aber auch noch nie vorher zur Berechnung von Triplett-Triplett-Absorptionsspektren verwendet worden, obwohl das prinzipiell kein Problem sein sollte [105]. Vergleicht man die Anregungsenergien in Tabelle 3.16, sieht man, dass sich die Energien nicht sehr stark zwischen den verschiedenen Verfahren unterscheiden, so dass die unterschiedliche Form der Absorptionsspektren in Abbildung 3.7 im wesentlichen auf die verschiedenen Oszillatorstärken zurückzuführen ist.

Die UTD-B3LYP-Rechnungen bestätigen die Interpretation der Doppelbande um 690 nm als Schwingungsfeinstruktur. Außerdem bleibt festzuhalten, dass diese Bande *nicht* dem ($T_1 \rightarrow T_2$)-Übergang zuzuordnen ist, sondern der Anregung in einen höheren Triplettzustand, vgl. Tabelle 3.16. Die bei tieferer Energie liegenden Übergänge sind so schwach, dass sie wohl experimentell nicht beobachtet wurden, zumal die Detektorempfindlichkeit im roten Bereich im allgemeinen stark abfällt.

Schließlich wurde wegen der beobachteten Differenzen noch die Abhängigkeit des Triplett-Absorptionsspektrums von der verwendeten Geometrie untersucht. Zu diesem Zweck sind UTD-B3YLP- und DFT-MRCI-Rechnungen bei der Grundzustandsgeometrie (S_0) durchgeführt worden. In Abbildung 3.8 und 3.9 sind die erhaltenen Spektren gezeigt (zusätzlich ist der in Abbildung 3.7 weggelassene, wenig intensive langwellige Teil des Spektrums abgebildet). Trotz der nur kleinen Abweichungen in den Geometrien sind die Unterschiede in den Spektren bei beiden Methoden sehr ausgeprägt. Daraus lässt sich schließen, dass geringe Verzerrungen des Moleküls, wie sie beispielsweise in einer Proteinumgebung auftreten könnten, ausreichen, um die Absorption deutlich zu ändern.

3.2.4 Angeregte Zustände von Isolumazin

In Tabelle 3.17 und 3.18 sind die mit TD-B3LYP/6-31G* und DFT-MRCI/SV(P) erhaltenen Anregungsenergien für das Grundzustandsspektrum und das Tripletspektrum zusammengefasst. Außerdem wurde grob der Einfluss von Wasserstoffbrücken an den Atomen O2, H3 und O4 untersucht, die in wässriger Lösung und Proteinen auftreten können. Die verwendeten Geometrien sind wieder die B3LYP/6-31G*-

³Die Berechnung der Oszillatorstärken bezüglich der Referenzwellenfunktion ist davon nicht betroffen.

3.2 Berechnung angeregter Zustände, Absorptionsspektren

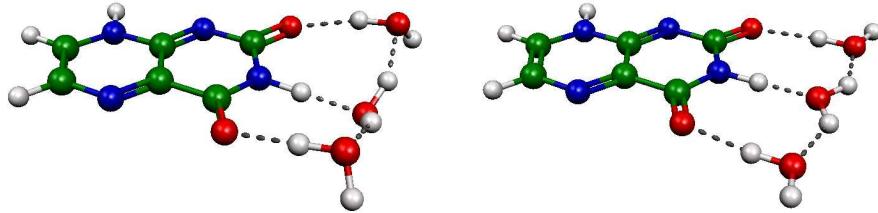


Abbildung 3.10: Im Grundzustand B3LYP/6-31G*-optimierte Geometrien von Isolumazin **3a** mit drei Wassermolekülen, die jeweils eine Wasserstoffbrücke zu **3a** ausbilden; links: C_1 -Symmetrie, rechts: C_s -Symmetrie. Die entsprechenden Triplettgeometrien sind ähnlich und daher nicht gezeigt. Farbgebung: C = grün, N = blau, O = rot, H = weiß.

	TD-B3LYP	DFT-MRCI	DFT-MRCI (3 H ₂ O, C_1 -sym.)	DFT-MRCI (3 H ₂ O, C_1 -sym.)
1 $^1A'$ → 1 $^1A''$	3,09	3,17	3,05	3,18
2 $^1A'$	3,34	3,19	3,21	3,17
2 $^1A''$	3,26	3,38	3,48	3,31
3 $^1A''$	3,91	3,94	4,02	4,00
3 $^1A'$	4,01	4,09	4,10	3,86
4 $^1A''$	4,58	4,66	4,49	4,69
5 $^1A''$	4,74	4,90	4,91	5,02
4 $^1A'$	4,83	5,01	5,00	4,96

Tabelle 3.17: Berechnete Singulett-Anregungsenergien für Isolumazin **3a** in eV bei der jeweiligen B3LYP/6-31G*-Geometrie, siehe Text. Dominante Übergänge sind fett gedruckt.

	UTD-B3LYP	DFT-MRCI	DFT-MRCI (3 H ₂ O, C_1 -sym.)	DFT-MRCI (3 H ₂ O, C_s -sym.)
1 $^3A' \rightarrow 1 ^3A''$	1,04	1,10	0,97	
2 $^3A''$	1,11	1,19	1,23	
1 $^3A'$	1,66	1,61	1,56	1,46
3 $^3A''$	1,75	1,81	1,84	
2 $^3A'$	2,05	2,05	2,04	2,04
4 $^3A''$	2,39	2,43	2,28	
3 $^3A'$	2,63	2,64	2,58	2,60
4 $^3A'$	3,17	3,13	3,06	3,11

Tabelle 3.18: Berechnete Triplett-Anregungsenergien für Isolumazin **3a** in eV bei der jeweiligen UB3LYP/6-31G*-Geometrie, siehe Text. Dominante Übergänge sind fett gedruckt.

Ergebnisse der quantenchemischen Rechnungen

bzw. UB3YLP/6-31G*-optimierten Strukturen für den S_0 bzw. T_1 . Die Rechnungen wurden analog den vorigen durchgeführt. Für Isolumazin mit drei Wassermolekülen sind jeweils zwei verschiedene Geometrien verwandt worden, und zwar einmal die vollständig optimierte Struktur (mit C_1 -Symmetrie) und andererseits eine Konfiguration, bei der alle Atome in einer Ebene liegen (C_s -Symmetrie), siehe Abbildung 3.10. Damit soll ein Eindruck vom Einfluss der Anordnung der Lösungsmittelmoleküle gewonnen werden.

Als Haupteffekt der „Solvatation“ erkennt man im Mittel eine kleine Rotverschiebung vor allem der ($A' \rightarrow A'$)-Übergänge im Grundzustandsspektrum. Bei der C_s -Konfiguration beträgt die Rotverschiebung etwa 400 cm^{-1} für die ($1^1A' \rightarrow 4^1A'$)-Anregung und ca. 100 cm^{-1} für die langwellige Bande bei 26000 cm^{-1} ($1^1A' \rightarrow 2^1A'$). Der größte Effekt tritt für den ($1^1A' \rightarrow 3^1A'$)-Übergang auf, der sich um ca. 1900 cm^{-1} verschiebt. Gleichzeitig stellt man fest, dass bei der C_1 -Anordnung der Moleküle praktisch keine Änderung der Energien zu verzeichnen ist, und die nicht sichtbaren ($A' \rightarrow A''$)-Übergänge sowohl mit einer Erhöhung als auch Eniedrigung der Anregungsenergie, zum Teil abhängig von der Anordnung der Wassermoleküle, reagieren können. Insgesamt scheint sich der sichtbare Teil des Spektrums aber durch die zusätzlichen Wassermoleküle etwas rotzuverschieben, was konsistent mit den Beobachtungen an Uracil ist (siehe Abschnitt 3.2.2).

Im Fall des Triplettspektrums gelten im wesentlichen die gleichen Feststellungen wie für das Singulettsspektrum. Außerdem bleibt zu bemerken, dass sich im Großen und Ganzen durch die zusätzlichen Wassermoleküle weder die Reihenfolge, noch die relativen Intensitäten der Übergänge ändern.

3.2.5 Adduktsspektrum

Nach dem ersten beobachteten, kurzlebigen Intermediat entsteht im Photozyklus von Phototropin eine weitere, relativ langlebige Spezies, die als FMN-Cysteinyladdukt gedeutet worden ist, siehe Einleitung. Auch das Absorptionsspektrum von entsprechenden Modellen wurde mit TD-B3LYP/6-31G* berechnet. Als Modellmoleküle dienten dabei das Isolumazin-Mercaptyladdukt und das 10-Methyl-isoalloxazin-Mercaptyladdukt, Abbildung 3.11. Die Rechnungen sind wieder bei der optimierten Grundzustandsgeometrie der Moleküle durchgeführt worden.⁴

Die theoretischen Spektren sind wieder etwas blauverschoben, sonst aber in guter Übereinstimmung mit dem Experiment. Insbesondere zeigt sich, dass der zusätzliche

⁴Wie man erkennt, sind mehrere Konformere für die Stellung der SCH_3 -Gruppe relativ zum Ringgerüst möglich. Für die gezeigten Ergebnisse wurde stets diejenige genommen, wo diese Gruppe über dem mittleren Ring der Isoalloxazineinheit steht, wie das auch in den Kristallstrukturen der Adduktform von LOV-Domänen der Fall ist [17,18]. Da die anderen Konformere einfach durch eine Rotation um die ($\text{C}4\text{a}-\text{S}$)-Bindung entstehen, sind deren Eigenschaften, inklusive der Spektren, dem verwendeten Rotamer sehr ähnlich und daher nicht gezeigt.

3.2 Berechnung angeregter Zustände, Absorptionsspektren

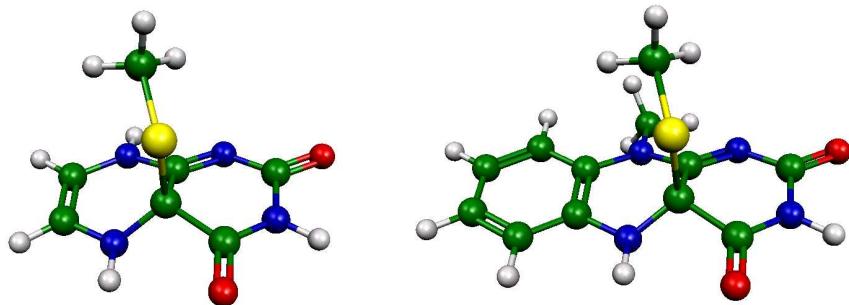


Abbildung 3.11: Verwendete Geometrien von Isolumazin-Mercaptyladdukt und 10-Methyl-isoalloxazin-Mercaptyladdukt.

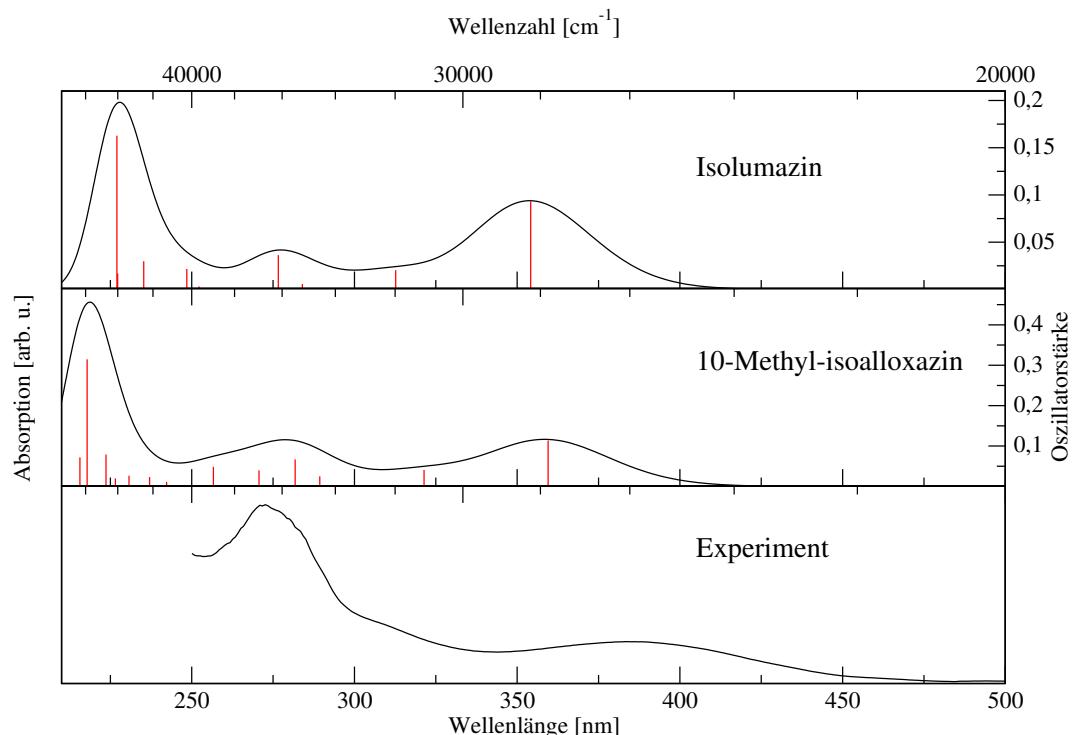


Abbildung 3.12: Berechnete TD-B3YLP/6-31G*-Absorptionsspektren für die Adduktformen von Isolumazin **3a** und 10-Methyl-isoalloxazin **2a**. Die Verbreiterung erfolgte unter Verwendung von Gl. (3.1) mit $\sigma = 1000 \text{ cm}^{-1}$. Das experimentelle Spektrum ist das der Adduktform der LOV1-Domäne von *Chlamydomonas reinhardtii* [19].

Ergebnisse der quantenchemischen Rechnungen

Benzolring in 10-Methyl-isoalloxazin nur wenig Einfluss auf das Spektrum hat. Die drei beobachteten Banden bei ca. 390 nm, 310 nm (Schulter) und 270 nm bestehen außerdem aus mehreren Übergängen, die insgesamt die tatsächliche Intensitätsverteilung ergeben.

3.3 Modellierung der Adduktbildung

Die in den vorigen Kapiteln genannten experimentellen und theoretischen Daten legen folgende Reaktionsschritte für die Adduktbildung in Phototropin nahe: Nach der Anregung von FMN und anschließender innerer Umwandlung (engl. *Internal Conversion*, IC), erfolgt ein Interkombinationsübergang (engl. *Inter System Crossing*, ISC) in den tiefsten Tripletzustand, von wo aus die Addition der Cystein-Einheit stattfindet. Dieses Szenario wird im weiteren als Arbeitshypothese angenommen.

Die nachfolgenden Betrachtungen zielen ihr Augenmerk hauptsächlich auf zwei Dinge: Zum einen wird die Energetik der Addition untersucht. Den experimentellen Daten zufolge sollte die Dunkelform (im folgenden oft kurz Edukt(form) genannt) energetisch günstiger sein als die Adduktform des Proteins, da letztere sich innerhalb einiger Minuten zu ersterer regeneriert, siehe Abbildung 1.3. Zweitens kann man erwarten, dass die Addition vom Tripletzustand aus gesehen exotherm (genauer: exergon) ist,⁵ weil die Additionsreaktion relativ schnell und mit hoher Quantenausbeute abläuft [19, 115, 116]. Beides ist nur möglich, wenn die Reaktion thermodynamische Triebkraft besitzt, und die Aktivierungsenergie nicht zu hoch ist. Da andererseits die Aktivierungsenergie nicht negativer sein kann als die Reaktionsenergie, kann man Reaktionen mit stark positiver Reaktionsenergie als unwahrscheinlich ausschließen. Zudem gilt nach dem Hammond-Postulat, dass, je exothermer/endothermer eine Reaktion ist, desto ähnlicher ist der Übergangszustand dem Edukt/Produkt. Diese Überlegungen bilden die Grundlage für die nächsten Abschnitte. Weiterhin wird versucht werden, ein Bild vom Reaktionsmechanismus zu bekommen.

3.3.1 Energetik der Adduktbildung in der Gasphase

Zunächst sollen für die in Abbildung 3.13 gezeigten Reaktionen (I) bis (III) die Energetiken berechnet werden. Die Reaktionstypen (I) bis (III) unterscheiden sich, wie in der Abbildung angedeutet, lediglich im elektronischen Zustand der Flavin-Komponente in der Ausgangs- und Adduktform. Neben dem Modell für FMN ist auch das Schwefelatom mit Sauerstoff und Selen variiert worden, um eventuell Hinweise zu bekommen, warum die (Cys → Ser)-Mutante (in der Cystein durch Serin

⁵Im folgenden wird der Ausdruck „exotherm“ synonym zu „unter Energieabgabe“ verwendet, entsprechendes gilt für „endotherm“.

3.3 Modellierung der Adduktbildung

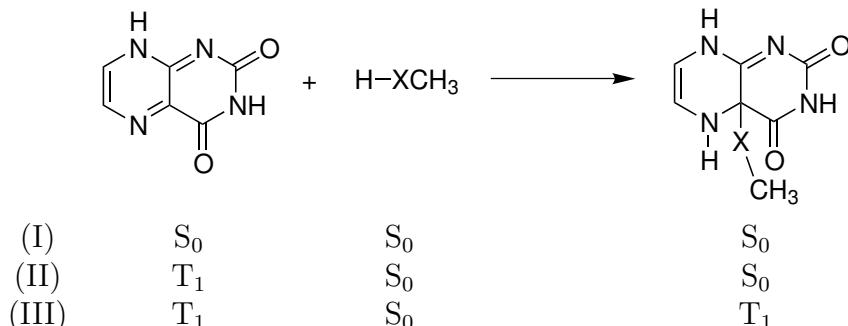


Abbildung 3.13: Betrachtete Edukt- und Produktzustände für die Additionsreaktion mit Isolumazin **3a** (zur Bezeichnung siehe Abbildung 3.1) als Modell für FMN und X=S, O, Se.

ausgetauscht ist) der LOV1-Domäne von *Chlamydomonas reinhardtii* keine Adduktbildung bei Belichtung mehr aufweist [19], siehe Einleitung. Eine Selenocystein-Mutante war ebenfalls geplant, wurde aber bisher auf Grund der überaus leichten Oxidierbarkeit des Selenocysteins bisher nicht hergestellt.

Als Rechnenmethode wurde B3LYP/6-31G* gewählt (RB3LYP für geschlossenschalige, UB3LYP für offenschalige Moleküle bzw. Zustände). Die Moleküle sind wieder in dem jeweiligen Zustand optimiert worden; zudem ist eine Frequenzrechnung durchgeführt worden. Neben den Energiedifferenzen bezüglich der SCF-Energie E , sind auch die Unterschiede in der Nullpunktsenergie E_0 berechnet worden, wobei die Frequenzen hierfür nicht skaliert worden sind. Temperatur- und Entropieeffekte wurden vernachlässigt, weil man davon ausgehen kann, dass diese Effekte wesentlich durch die hier vernachlässigte Proteinumgebung beeinflusst werden. Somit beziehen sich die in Tabelle 3.19 und 3.20 gezeigten Werte auf die Additionsreaktion in der Gasphase bei 0 Kelvin.

Unter diesen Voraussetzungen findet man, dass die Addition (I), zumindest wenn man die Nullpunktsenergien berücksichtigt, in allen Fällen endotherm ist, wobei die Ergebnisse für **2a** und **3a** ähnlicher sind als die für **3a** und **4a** (zur Bezeichnung der Moleküle vgl. Abbildung 3.1 und 3.2). Bemerkenswert ist auch, dass die Reaktion für das (realistischere) Flavinmodell **2a** am wenigsten endotherm ist. Für die Additionsreaktion in LOV-Domänen wurden experimentell Werte für ΔH im Bereich von $\approx +0,9$ bis $+1,4$ eV gemessen [115, 116], was noch deutlich höher als die hier angegebenen Werte ist und offensichtlich durch die Proteinumgebung verursacht wird. Dies wird im Abschnitt 3.3.5 näher untersucht.

Reaktion (II) ist mit einer klaren Energieabgabe verbunden, was konsistent mit der beobachteten schnellen Reaktion ist, und die Betrachtung von Reaktion (III) zeigt, dass die Adduktbildung *nicht* vollständig auf der Triplett-Hyperfläche stattfinden kann: das Addukt ist nämlich im Triplettzustand nicht stabil und zerfällt bei

Ergebnisse der quantenchemischen Rechnungen

Reaktion	2a		4a	
	ΔE [eV]	ΔE_0 [eV]	ΔE [eV]	ΔE_0 [eV]
(I)	-0,041	+0,109	+0,139	+0,273
(II)	-2,034	-1,794	-1,850	-1,607
(III)	—	—	—	—

Tabelle 3.19: Reaktionsenergien für die Additionen (I) bis (III), mit 10-Methyl-isalloxazin **2a** bzw. 8-Methyl-isolumazin **4a** als FMN-Modelle, und X=S. Für Reaktion (III) ist keine Energie angegeben, da das Produkt nicht stabil ist, siehe Text.

Reaktion	X=S		X=O		X=Se	
	ΔE [eV]	ΔE_0 [eV]	ΔE [eV]	ΔE_0 [eV]	ΔE [eV]	ΔE_0 [eV]
(I)	+0,059	+0,195	-0,072	+0,022	-0,289	-0,135
(II)	-2,208	-1,952	-1,995	-1,795	-1,864	-1,621
(III)	—	—	+0,349	+0,467	—	—

Tabelle 3.20: Reaktionsenergien für die Additionen I bis III, mit Isolumazin **3a** als Modell für FMN und variablem X. Wo keine Energie angegeben ist, ist das Addukt nicht stabil, siehe Text.

Geometrieoptimierung unter homolytischer (C4a–S)-Bindungsspaltung in zwei Radikale. Somit ist Reaktion (II) die einzige der betrachteten Möglichkeiten, die in der Gasphase eine energetische Triebkraft besitzt. Es sei nochmals darauf hingewiesen, dass im Verlauf von Reaktion (II) ein Interkombinationsübergang (ISC) stattfinden muss, was die Berechnung eines Reaktionspfads erschwert, da mindestens zwei elektronische Zustände (nämlich S₀ und T₁) berücksichtigt werden müssen.

In Tabelle 3.20 sind zusätzlich die Additionen zwischen Isolumazin **3a** und Methanol bzw. Methylselenol untersucht. Die Ergebnisse stimmen qualitativ mit denen für Methanthiol überein, und die erhaltenen Daten für X=O liegen zwischen denen von X=S und X=Se, so dass es auf dieser Stufe der Betrachtungen keinen Hinweis gibt, warum die (Cys → Ser)-Mutante nicht mit Triplett-FMN reagiert.⁶ Im Fall von Methanol ist zwar das Addukt in dem Sinne stabil, dass ein Minimum auf der Potentialfläche vorliegt, dennoch ist es mit einem Energieaufwand verbunden, und Reaktion (II) erscheint nach dem zuvor gesagten wahrscheinlicher. Im folgenden Abschnitt wird gezeigt werden, dass Serin für die Additon offensichtlich eine wesentlich höhere Aktivierungsenergie benötigt als Cystein (und Selenocystein).

⁶Die Unterschiede zwischen Cystein und Serin bezüglich der Reaktivität gegenüber Triplett-Flavin gelten nicht nur für Phototropin, sondern allgemeiner. So wird auch in wässriger flavinhaltiger Lösung bei Bestrahlung nur in Gegenwart von gelöstem Cystein, nicht aber bei Serin, eine Photoreaktion unter Bildung von Flavinradikalalen beobachtet [96]. Insofern hat die Proteinumgebung also *keinen prinzipiellen* Einfluss auf die Reaktivitätsabstufung.

3.3 Modellierung der Adduktbildung

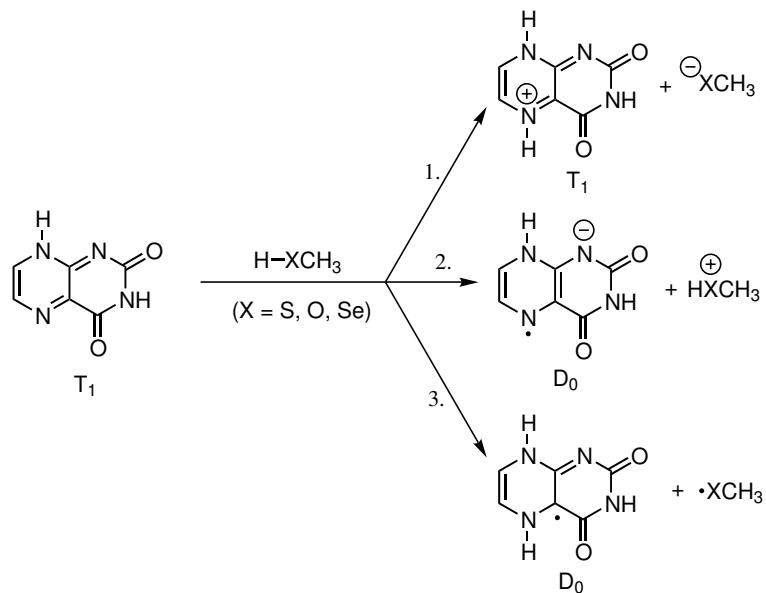


Abbildung 3.14: Grenzfälle für den Beginn der Additionsreaktion (im T_1) mit Isolumazin **3a** als Modell für FMN und $\text{X}=\text{S, O, Se}$. Angegeben ist auch jeweils der elektronische Zustand des Flavinmodells **3a**.

3.3.2 Mögliche Primärschritte zur Adduktbildung

Nun soll der Mechanismus der Adduktbildung etwas genauer untersucht werden. Als mögliche Primärschritte werden die in Abbildung 3.14 dargestellten Grenzfälle angenommen. Dabei wird nicht vorausgesetzt, dass es sich bei den rechts gezeigten „Intermediatstrukturen“ um echte Zwischenstufen handelt, sondern es soll nur angenommen werden, dass die Reaktion über einer der Strukturen, die den Fällen 1. bis 3. entsprechen, verläuft. Es soll hier abgeschätzt werden, welcher Weg für die Reaktion zu Beginn der Addition am wahrscheinlichsten ist. So könnte zunächst ein Protontransfer von der (S-H)-Gruppe zum Flavin stattfinden (Reaktion 1.). Wie in Abschnitt 3.2.1 gezeigt wurde, ist ja der Triplettzustand basischer als der Grundzustand. Als weitere Möglichkeiten werden ein Elektronentransfer (2.) und eine Wasserstoffübertragung (3.) in Erwägung gezogen. Dass das Schwefel-Atom schneller addiert als das Wasserstoffatom erscheint wegen der viel größeren „Beweglichkeit“ des letzteren und der Feststellung, dass die Adduktform im T_1 -Zustand nicht stabil ist, sehr unwahrscheinlich und wird daher nicht als zusätzliche Möglichkeit angesehen.

Außerdem wird stets von einer anfangs protonierten Cystein-Einheit (bzw. protoniertem Cystein-Modell) ausgegangen. Swartz et al. haben vorgeschlagen, dass das Cystein in Grundzustand bereits deprotoniert vorliegt [20], was aus mehreren Gründen unwahrscheinlich ist: Zum einen zeigt die Kristallstruktur von LOV-

Ergebnisse der quantenchemischen Rechnungen

Reaktion	X=S		X=O		X=Se	
	ΔE [eV]	ΔE_0 [eV]	ΔE [eV]	ΔE_0 [eV]	ΔE [eV]	ΔE_0 [eV]
1.	+1,780	+1,875	+3,239	+3,157	+1,704	+1,834
2.	+1,965	+1,939	+3,062	+2,962	+1,501	+1,489
3.	-0,759	-0,619	-0,069	-0,059	-0,956	-0,808

Tabelle 3.21: Berechnete Energiedifferenzen für Reaktionen 1. bis 3., vgl. Abbildung 3.14.

Domänen [15, 18] keine basischen Aminosäuren in Nähe der FMN-Bindungstasche, die aber nötig wären, um das Proton der (S–H)-Gruppe aufzunehmen; vielmehr ist die Umgebung von FMN und Cystein hauptsächlich durch hydrophobe Aminosäureseitenketten gekennzeichnet. In einer solchen Umgebung sollte eine (S–H)-Gruppe (deren pK_a -Wert in Wasser etwa 8 bis 9 beträgt) im wesentlichen protoniert vorliegen. Weiterhin sollte im UV/VIS-Spektrum bei Vorliegen eines Thiolats eine zusätzliche Charge-Transfer-Bande im Bereich von 500 bis 600 nm auftauchen [117], und zudem konnte inzwischen auch experimentell durch IR-Spektroskopie nachgewiesen werden, dass die Cystein-Einheit tatsächlich protoniert vorliegt [118, 119].

Die Rechnungen sind analog zu den vorangegangenen auf B3LYP/6-31G*-Niveau, für die Edukt- und Produkt-Moleküle jeweils getrennt, bei der entsprechend optimierten Geometrie durchgeführt worden. In den Fällen 1. und 2. tritt eine nicht zu vernachlässigende stabilisierende Coulomb-Wechselwirkung auf, die grob durch Addition der Coulomb-Energie zweier Punktladungen $+e$ und $-e$ im Abstand von 3,50 Å abgeschätzt worden ist. Die kürzeste Distanz zwischen Cystein und FMN in der Kristallstruktur von LOV2 [15] beträgt mit 3,58 Å etwas mehr; damit sollte die genäherte Stabilisierungsenergie eine obere Schranke darstellen, wenn man annimmt, dass zusätzliche bindende Wechselwirkungen zwischen den Fragmenten bei dieser Entfernung keine wesentliche Rolle spielen. Neben der Reaktion mit Methan-thiol HSCH_3 ist auch wieder die Reaktion mit Methanol HOCH_3 und Methylselenol HSeCH_3 untersucht worden. In Tabelle 3.21 sind die Ergebnisse präsentiert.

Trotz der stabilisierenden Ladungswechselwirkung, sind die Reaktionen 1. und 2. energetisch sehr ungünstig, während Reaktion 3. sogar mit einer Energieabgabe verbunden, und daher am wahrscheinlichsten (zumindest ohne Umgebung) ist. Für X=O fällt im übrigen die im Vergleich zu X=S, Se stets wesentlich positive Energiedifferenz auf, die man qualitativ leicht durch die ausgesprochen stärkere (X–H)-Bindung und das höhere Ionisationspotential von Methanol erklären kann. Damit kann auch die Reaktionsträgheit von Serin im Vergleich zu Cystein gegenüber Triplet-Flavin erklärt werden: Die Aktivierungsenergie wird für alle betrachteten Reaktionsmöglichkeiten wegen der eben genannten Effekte deutlich höher sein als bei Cystein. Für Selenocystein erwartet man nach den Zahlen in Tabelle 3.21 eine noch etwas gesteigerte Reaktivität.

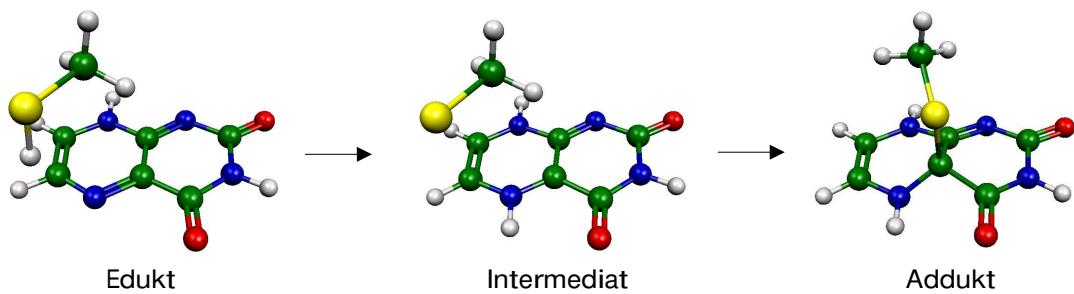


Abbildung 3.15: Verwendete Modellkomplexe mit Isolumazin **3a** als Modell für FMN.

3.3.3 Modellkomplexe in der Gasphase

Um Wechselwirkungen zwischen den Fragmenten besser zu erfassen, wurden als nächstes Modellkomplexe untersucht, in denen das FMN-Modell Isolumazin **3a** und Methanthiol wie in der Kristallstruktur von LOV2 aus Ref. [15] zueinander ausgerichtet sind (Abbildung 3.15). Dabei handelt es sich um einen „Eduktkomplex“, der den Dunkelzustand repräsentieren soll, einen Intermediatkomplex, bei dem das von HSCH_3 stammende H an N5 gebunden ist, und die Adduktform, wie sie schon in Abschnitt 3.2.5 vorgekommen ist. Als Geometrien der Fragmente wurde im Eduktmodell die optimierte T_1 -Geometrie für Isolumazin **3a** und die Grundzustandsgeometrie von HSCH_3 verwendet (die Reaktion geht ja von Triplett-Flavin aus), für das Intermediatmodell sind die auf (U)B3LYP/6-31G*-Niveau berechneten Grundzustandsgeometrien der neutralen Fragmente verwendet worden, und für das Addukt die Grundzustandsgeometrie.

Für die genannten Anordnungen sind dann ohne weitere Geometrieeoptimierung Rechnungen im Singulett-Grundzustand und im niedrigsten Triplettzustand mit verschiedenen Methoden durchgeführt worden. Dabei handelt es sich zunächst einmal um B3LYP/6-31G*, wo in jedem Fall die Wellenfunktion auf Stabilität geprüft worden ist. Es stellt sich dabei heraus, dass im Singulettzustand S_0 nur bei Eduktmodell und Adduktform RB3LYP stabile Wellenfunktionen liefert; bei der Intermediatform ist nur eine UB3LYP-Wellenfunktion stabil, die aber gemäß Tabelle 3.22 (in der die jeweilige Mullikenladung und -spindichte auf dem Cysteinmodell-Fragment für den Grundzustand S_0 aufgelistet sind⁷) die Spinsymmetrie bricht: die berechnete Spindichte am SCH_3 -Fragment ist -0,829; außerdem beträgt der $\langle \hat{S}^2 \rangle$ -Erwartungswert 0,8144 statt null. Beides spricht dafür, dass die Intermediastruktur im S_0 bira-

⁷Für CI-artige Wellenfunktionen ergibt sich die Mullikenladung q_A am Atom A einfach zu $q_A = \sum_i |c_i|^2 q_{A,i}$, wobei c_i der Koeffizient der i -ten Konfiguration, und q_{iA} die Mullikenladung auf Atom A in der i -ten Konfiguration ist. Alternativ kann man natürliche Orbitale zur Berechnung der Populationsanalyse verwenden [27].

Ergebnisse der quantenchemischen Rechnungen

	Edukt			Intermediat		
	Ladung	Spin	$\langle \hat{S}^2 \rangle$	Ladung	Spin	$\langle \hat{S}^2 \rangle$
B3LYP	-0,009	0	0	-0,166	-0,829	0,8144
CASSCF(2,2)	-0,007	0	0	-0,008	0	0
CASSCF(4,4)	-0,007	0	0	-0,008	0	0
CASSCF(8,8)	-0,008	0	0	-0,009	0	0
DFT-MRCI	+0,014	0	0	+0,027	0	0

Tabelle 3.22: Berechnete Mullikenladungen und -spindichten im Singulett-Grundzustand S_0 auf dem HSCH_3 -Fragment beim Eduktmodell und auf dem SCH_3 -Fragment beim Intermediatmodell, also jeweils auf dem nichtgebundenen Teil des Cysteinmodells, siehe Abbildung 3.15. Die Mulliken-Gesamtspindichte ist im Singulett 0. Zusätzlich ist der $\langle \hat{S}^2 \rangle$ -Wert für die Wellenfunktion angegeben.

	Edukt			Intermediat		
	Ladung	Spin	$\langle \hat{S}^2 \rangle$	Ladung	Spin	$\langle \hat{S}^2 \rangle$
B3LYP	-0,015	+0,009	2,0243	-0,028	+0,978	2,0109
CASSCF(2,2)	-0,005	+0,006	2	-0,008	+0,998	2
CASSCF(4,4)	-0,011	+0,004	2	-0,008	+0,998	2
CASSCF(8,8)	-0,013	+0,004	2	-0,007	+0,998	2
DFT-MRCI	+0,008	–	2	+0,024	–	2

Tabelle 3.23: Berechnete Mullikenladungen und -spindichten im niedrigsten Triplett-Zustand T_1 auf dem HSCH_3 -Fragment beim Eduktmodell und auf dem SCH_3 -Fragment beim Intermediatmodell, also jeweils auf dem nichtgebundenen Teil des Cysteinmodells, siehe Abbildung 3.15. Die Mulliken-Gesamtspindichte ist im Triplett 2. Zusätzlich ist der $\langle \hat{S}^2 \rangle$ -Wert für die Wellenfunktion angegeben. Die CASSCF(2,2)-Rechnung ist äquivalent zu einer ROHF-Rechnung. Für DFT-MRCI ist die Berechnung der Spindichte nicht implementiert [120].

dikalischen Charakter besitzt. Da Biradikale nicht ohne weiteres mit einem Ein-Determinantenansatz beschrieben werden dürfen, wurden weitere Rechnungen auf CASSCF- und DFT-MRCI-Niveau durchgeführt, wo es keine derartigen theoretischen Probleme gibt. Die CASSCF-Rechnungen sind mit verschiedenen aktiven Räumen angesetzt worden, und zwar als CASSCF(n, n) mit $n = 2, 4$ und 8 .⁸ Den aktiven Raum bilden stets die höchsten besetzten und die niedrigsten unbesetzten Orbitale.

⁸Da Gaussian 98 [42] Probleme bei der Konvergenz von CASSCF-Wellenfunktionen hat (die Ergebnisse sind meistens nicht vollständig konvergiert, wie ein Neustart der Rechnung mit `guess=read` zeigt), wurden die CASSCF-Rechnungen manuell so lange iteriert, bis die Energieänderung zwischen zwei aufeinanderfolgenden Durchläufen kleiner als $5 \cdot 10^{-6} \text{ E}_h$ war. Im Mittel wurden dafür 4 – 5 Läufe benötigt.

3.3 Modellierung der Adduktbildung

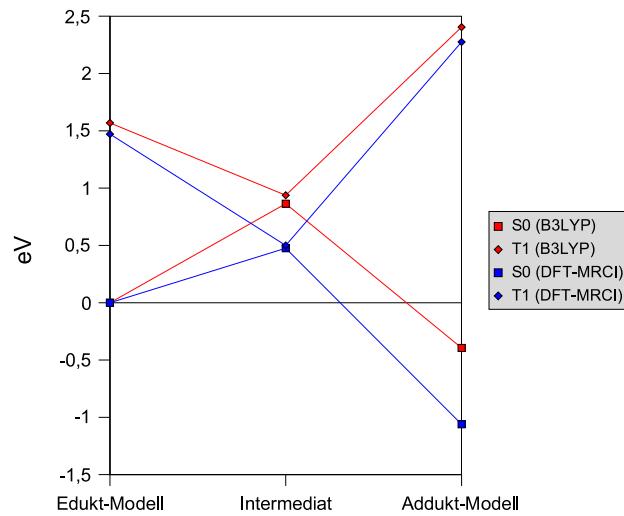


Abbildung 3.16: Energien der Komplexe nach Abbildung 3.15 nach B3LYP/6-31G* (jeweils die stabile Lösung, siehe Text) und DFT-MRCI/SV(P).

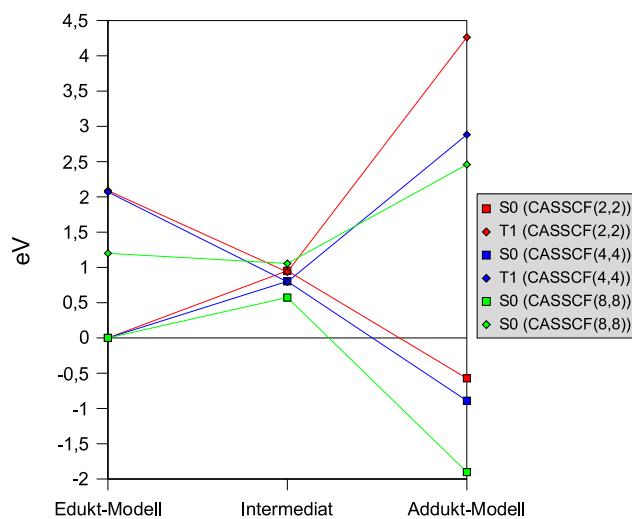


Abbildung 3.17: Energien der Komplexe nach Abbildung 3.15 nach CASSCF mit verschiedenen aktiven Räumen.

Ergebnisse der quantenchemischen Rechnungen

Zunächst einmal stellt man fest, dass die Mehrdeterminanten-Verfahren stets eine Spindichte von null im S_0 -Zustand liefern. Zweitens ist auch in diesen Fällen die Intermediatstruktur deutlich biradikalisch, wie man durch Analyse der Dichtematrix herausfindet: es gibt zwei natürliche Orbitale mit einer Besetzungszahl von ≈ 1 , während alle anderen Besetzungszahlen nahe zwei oder null sind. Für das Edukt- und das Adduktmodell findet man keine Besetzungszahlen von ungefähr 1, was insgesamt konsistent mit den Schlussfolgerungen aus der B3LYP-Rechnung ist. Weiterhin ergibt sich die Ladung auf dem SCH_3 -Teil im Intermediat als wesentlich näher an 0 als das bei UB3LYP der Fall ist, das heißt, der ionische Charakter ist für die Intermediatform bei den Mehrdeterminanten-Verfahren geringer.

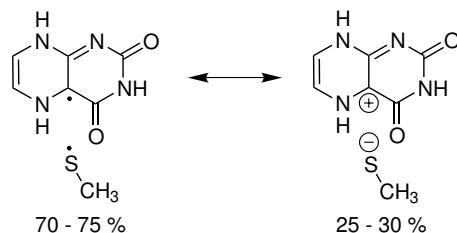
Der niedrigste Triplettzustand T_1 ist in Analogie zum Grundzustand mit UB3LYP/6-31G*, CASSCF(n, n) mit $n = 2, 4, 8$ und DFT-MRCI/SV(P) behandelt worden, und die Mullikenladung und -spindichte auf dem Fragment des Cystein-Modells bestimmt worden. Im Gegensatz zum S_0 macht UB3LYP diesmal erwartungsgemäß keine prinzipiellen Probleme, und die $\langle \hat{S}^2 \rangle$ -Werte sind vernünftig. Wie im Grundzustand sind die Fragmente sowohl in der Edukt-, als auch der Intermediatform im wesentlichen neutral; insbesondere ergibt sich somit, dass in Analogie zum vorangegangenen Abschnitt ein *Proton*-Übergang vom Cysteinmodell **HSCH₃** zum Flavinmodell **3a** energetisch ungünstig ist, und zwar sowohl in T_1 als auch in S_0 .

In den Abbildungen 3.16 und 3.17 sind die Energien der Komplexe aus Abbildung 3.15 aufgetragen. In allen Fällen (außer CASSCF(8,8)) sind die Energien des Intermediatmodells für S_0 und T_1 sehr ähnlich, wobei T_1 ein wenig höher in der Energie liegt als S_0 . Eine Ausnahme hiervon bildet nur CASSCF(2,2), wo T_1 etwas niedriger liegt. Das Ergebnis von CASSCF(8,8) kann man wahrscheinlich als Beispiel dafür ansehen, dass eine Vergrößerung des aktiven Raums keineswegs immer eine Verbesserung bringen muss. Als zuverlässigstes Verfahren wird DFT-MRCI angesehen, da hier im Vergleich zu CASSCF weitaus weniger Willkür bezüglich der „wichtigen“ Konfigurationen herrscht, siehe Kapitel 2.4. Des weiteren entnimmt man den Abbildungen 3.16 und 3.17, dass entgegen den Berechnungen an den separaten Fragmenten im vorangegangenen Abschnitt das Addukt stabiler als das Edukt vorausgesagt wird. Dies ist eigentlich auch nicht verwunderlich, weil bei den hier gemachten Rechnungen nur das Addukt bei einer voll optimierten Geometrie berechnet worden ist, und der Energieunterschied zwischen Edukt und Addukt im vorigen Abschnitt sowieso nur wenig zugunsten des Edukts war. Ein „Hauptverursacher“ für die Destabilisierung der Eduktform relativ zum Addukt dürfte die ungünstige Stellung des H-Atoms am Schwefel zum Ringgerüst sein (geringer Abstand). Wie in Abschnitt 3.3.5 gezeigt wird, ist die Energiedifferenz zwischen Dunkel- und Adduktform weitgehend durch die Proteinumgebung bestimmt.

3.3.4 Modellkomplexe in einem polarisierbaren Kontinuum

Es sind mehrere Rechnungen mit den Molekülen aus Abbildung 3.15 in verschiedenen Dielektrika durchgeführt worden. Zur Anwendung kam dabei die PCM- und (testweise) die COSMO-Methode, siehe Kapitel 2.5. Da bekannt ist, dass im Inneren von Proteinen die effektive relative Dielektrizitätszahl im Durchschnitt etwa bei 4 liegt [121], wurden Rechnungen mit $\epsilon = 3, 4, 5$ und zusätzlich $\epsilon = 78$, was etwa die Dielektrizitätskonstante von Wasser ist, durchgeführt. Als Verfahren zur Berechnung der Wellenfunktion kam wiederum B3LYP/6-31G* zum Einsatz, da PCM und COSMO weder mit CASSCF, noch mit DFT-MRCI kombiniert werden können (in Gaussian 98 nicht implementiert). Zur Bestimmung der effektiven Moleküloberfläche wurde wie in Kapitel 2.5 beschrieben vorgegangen; der „Radius des Lösungsmittels“ (vgl. Abbildung 2.3) wurde stets auf 1,385 Å gesetzt, was einem Wassermolekül entspricht.

Zunächst seien einmal nur die Dunkel- und die Intermediatform betrachtet. Wie aus den Tabellen 3.24 und 3.25 folgt, ergibt sich für die Eduktform im S₀-Zustand und die beiden Triplett-Formen durch die polarisierbare Umgebung keine wesentliche Änderung in der Elektronenverteilung zwischen dem Flavin- und dem Cystein-Fragment. Anders sieht die Sache beim Intermediatmodell im S₀ aus: hier erhöht sich deutlich die Elektronendichte am Cystein-Fragment, während gleichzeitig die Spindichte dort abnimmt. Damit nimmt also der ionische Charakter der Zwischenstufe durch das Dielektrikum auf 25 – 30 % zu, wenn man die Partialladung als Maß hierfür zugrunde legt. Anschaulich kann man das durch mesomere Grenzformeln machen:



Ebenso nimmt die Spinverunreinigung im S₀-Intermediat mit zunehmendem ϵ ab, was als weiterer Hinweis, dass der Anteil der rechten (restricted) Wellenfunktion zunimmt, interpretiert werden kann. Wie im vorigen Abschnitt festgestellt, wird die Ladungstrennung durch die Spinverunreinigung der S₀-Intermediatform wohl etwas überbetont (Tabelle 3.22), womit man spekulieren kann, dass Methoden ohne Spinverunreinigung der Wellenfunktion, wie DFT-MRCI, eine geringere Ladungstrennung ergeben würden. Das COSMO-Verfahren, das nur für $\epsilon = 4$ ausprobiert worden ist, ergibt eine etwas stärkere Polarisierung als PCM, was nach dem in Kapitel 2.5 gesagten verständlich ist.

Ergebnisse der quantenchemischen Rechnungen

In Abbildung 3.18 sind exemplarisch die Energien (einschließlich der elektrostatischen Wechselwirkung mit dem Kontinuum) aller sechs Spezies unter Verwendung von PCM für $\varepsilon = 4$ und $\varepsilon = 78$ aufgetragen. Verglichen mit den entsprechenden Gasphasenergebnissen (Abbildung 3.16) nimmt offensichtlich der energetische Abstand zwischen S_0 -Intermediat und T_1 -Intermediat etwas zu, was damit begründet werden kann, dass der S_0 -Zustand gemäß dem zuvor gesagten stärker als T_1 polarisiert wird. Außerdem wird die Eduktform im Grundzustand stärker stabilisiert als das Addukt, was dazu führt, dass bei $\varepsilon = 78$ beide Strukturen fast die gleiche Energie besitzen.

	Edukt			Intermediat		
	Ladung	Spin	$\langle \hat{S}^2 \rangle$	Ladung	Spin	$\langle \hat{S}^2 \rangle$
Gasphase	-0,009	0	0	-0,166	-0,829	0,8144
PCM($\varepsilon = 3$)	-0,012	0	0	-0,255	-0,738	0,7179
PCM($\varepsilon = 4$)	-0,013	0	0	-0,281	-0,712	0,6893
PCM($\varepsilon = 5$)	-0,013	0	0	-0,301	-0,691	0,6674
PCM($\varepsilon = 78$)	-0,015	0	0	-0,407	-0,582	0,5494
COSMO($\varepsilon = 4$)	-0,014	0	0	-0,324	-0,667	0,6404

Tabelle 3.24: Auf B3LYP/6-31G*-Niveau berechnete Mullikenladungen und -spindichten im Singulett-Grundzustand S_0 auf dem HSCH_3 -Fragment beim Eduktmodell und auf dem SCH_3 -Fragment beim Intermediatmodell, also jeweils auf dem nichtgebundenen Teil des Cysteinmodells. Die Mulliken-Gesamtspindichte ist im Singulett 0. Zusätzlich ist der $\langle \hat{S}^2 \rangle$ -Wert für die Wellenfunktion angegeben.

	Edukt			Intermediat		
	Ladung	Spin	$\langle \hat{S}^2 \rangle$	Ladung	Spin	$\langle \hat{S}^2 \rangle$
Gasphase	-0,015	+0,009	2,0243	-0,028	+0,978	2,0109
PCM($\varepsilon = 3$)	-0,018	+0,008	2,0221	-0,030	+0,977	2,0101
PCM($\varepsilon = 4$)	-0,018	+0,008	2,0217	-0,031	+0,977	2,0101
PCM($\varepsilon = 5$)	-0,018	+0,008	2,0215	-0,031	+0,977	2,0100
PCM($\varepsilon = 78$)	-0,019	+0,007	2,0205	-0,032	+0,976	2,0096
COSMO($\varepsilon = 4$)	-0,019	+0,007	2,0100	-0,033	+0,975	2,0216

Tabelle 3.25: Auf B3LYP/6-31G*-Niveau berechnete Mullikenladungen und -spindichten im niedrigsten Triplett-Zustand T_1 auf dem HSCH_3 -Fragment beim Eduktmodell und auf dem SCH_3 -Fragment beim Intermediatmodell, also jeweils auf dem nichtgebundenen Teil des Cysteinmodells. Die Mulliken-Gesamtspindichte ist im Triplet 2. Zusätzlich ist der $\langle \hat{S}^2 \rangle$ -Wert für die Wellenfunktion angegeben.

3.3 Modellierung der Adduktbildung

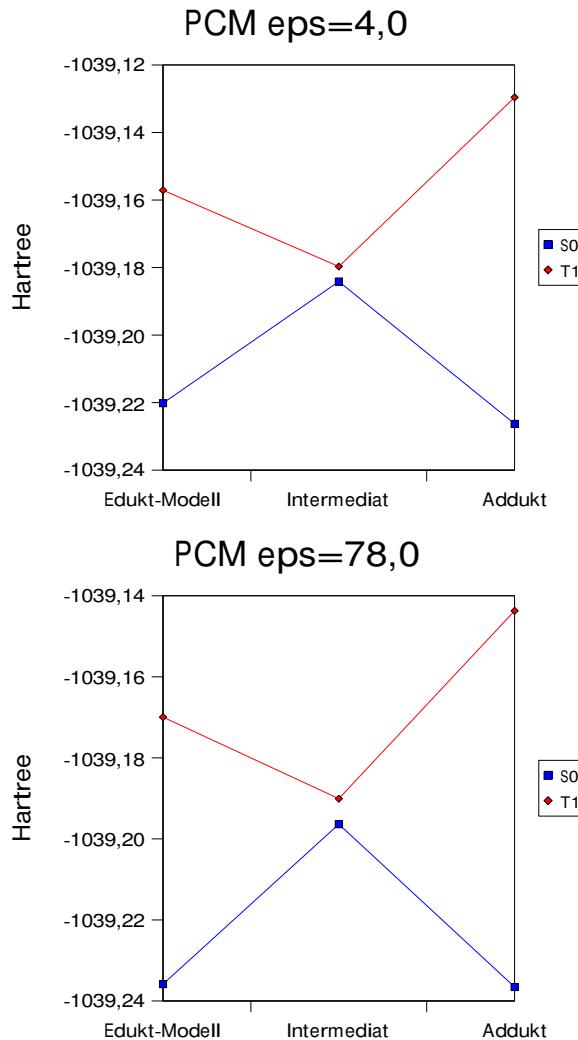


Abbildung 3.18: Energien der Komplexe nach Abbildung 3.15 nach B3LYP/6-31G* (jeweils die stabile Lösung, siehe Text) kombiniert mit PCM bei zwei verschiedenen Dielektrizitätskonstanten.

3.3.5 Energetik der Adduktbildung: Berücksichtigung von Aminosäureresten

Wie zuvor bemerkt, scheint die Energiedifferenz zwischen Dunkel- und Adduktform wesentlich durch die Proteinumgebung bestimmt zu sein. Um dies weiter zu eruieren, sind weitere, umfangreichere und detailliertere Modelle für die beiden Strukturen erstellt worden. Als Ausgangspunkt dienten die Kristallstrukturen der beiden Formen der LOV2-Domäne von *Adiantum capillus-veneris* [15, 17]. Es wurden jeweils sechs Modelle aufgestellt, wobei es sich um Modelle von FMN, und zwar Lumiflavin **1a**

Ergebnisse der quantenchemischen Rechnungen

und Isolumazin **3a**, mit Resten umgebender Aminosäuren handelt. Die Modelle mit Lumiflavin sind in den Abbildungen 3.19 bis 3.21 dargestellt. In einem weiteren Modell sind die Aminosäuren durch Wassermoleküle ersetzt, um zu testen, wie sich die Ergebnisse zum Beispiel durch Lösungsmittelmoleküle ändern.

Die Durchführung war im Einzelnen wie folgt: Zunächst sind die gewünschten Atome aus den Kristallstrukturen (PDB-Codes: 1G28 und 1JNU) ausgeschnitten worden. Nach Addition der fehlenden Wasserstoffatome und Bereinigung der erhaltenen Strukturen (Entfernen falsch addierter H-Atome), sind alle Strukturen einer Geometrieeoptimierung unterworfen worden. Im Fall der Modelle mit Wassermolekülen anstatt Aminosäureresten sind die zu FMN H-Brücken ausbildenden O-Atome bzw. (N-H)-Atomgruppen (siehe Abbildung 3.19 und 3.20) durch O bzw. (O-H) ersetzt und fehlende H-Atome hinzugefügt worden.

Um die prinzipielle Struktur der Komplexe zu erhalten, war es notwendig, die Lage mehrerer Atome während der Geometrieeoptimierung festzuhalten. Dies waren in den Modellen mit Aminosäureresten die Atome C, N, O der Aminosäurereste, das C-Atom im SCH₃-Teil, und die Atome N5 und N10 (FMN-Modell **1a**) bzw. N5 und N8 (FMN-Modell **3a**, vgl. Abbildung 3.1). In den Modellen für die Dunkelform wurde zusätzlich das S-Atom festgehalten, um ein Wegschwenken vom Alloxazinring zu vermeiden. In den Modellen mit Wassermolekülen waren jene keinen Ortsbeschränkungen unterworfen; sonst wurden die gleichen Atome fixiert wie bei den anderen Modellen. Nach einer Voroptimierung mit PM3 sind alle weiteren Rechnungen auf RB3LYP/6-31G*-Niveau (im S₀) durchgeführt worden.

Wie man aus den Abbildungen erkennt, ändern die Aminosäuren bei Adduktbildung etwas ihre relativen Lagen zum FMN. Insbesondere die Aminosäure, die in der belichteten Form eine Wasserstoffbrücke zur (N5-H)-Gruppe ausbildet (es handelt sich um einen Glutaminrest), ist in beiden Formen deutlich unterschiedlich ausgerichtet. Die beiden Konformere dieser Aminosäure kommen im wesentlichen durch Rotation um eine (C-C)-Bindung zustande (Abbildung 3.19). Allerdings könnte es sich möglicherweise auch um eine fälschliche Interpretation der Messdaten durch den Kristallographen handeln.

Zusätzlich zu diesen Aminosäureresten wurde die restliche (hydrophobe) Bindungstasche durch ein Dielektrikum mit $\varepsilon = 4$ modelliert. Zum Einsatz kam dabei wieder die PCM-Methode (mit gleichen Parametern wie im vorangegangenen Abschnitt). Es wurde auch wieder der Einfluss eines starken Dielektrikums ($\varepsilon = 78$) als Umgebung untersucht.

In Tabelle 3.26 sind die Ergebnisse zusammengefasst. Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Modellen sind in der Tat teilweise ziemlich groß: Die Ergebnisse für die Rechnungen mit den Wassermolekülen ohne polarisierbares Kontinuum erinnern an jene, die in der Gasphase für isolierte Reaktanden erhalten worden sind (vgl. Tabelle 3.19 und 3.20); die Hinzunahme des Dielektrikums führt zu einer Sta-

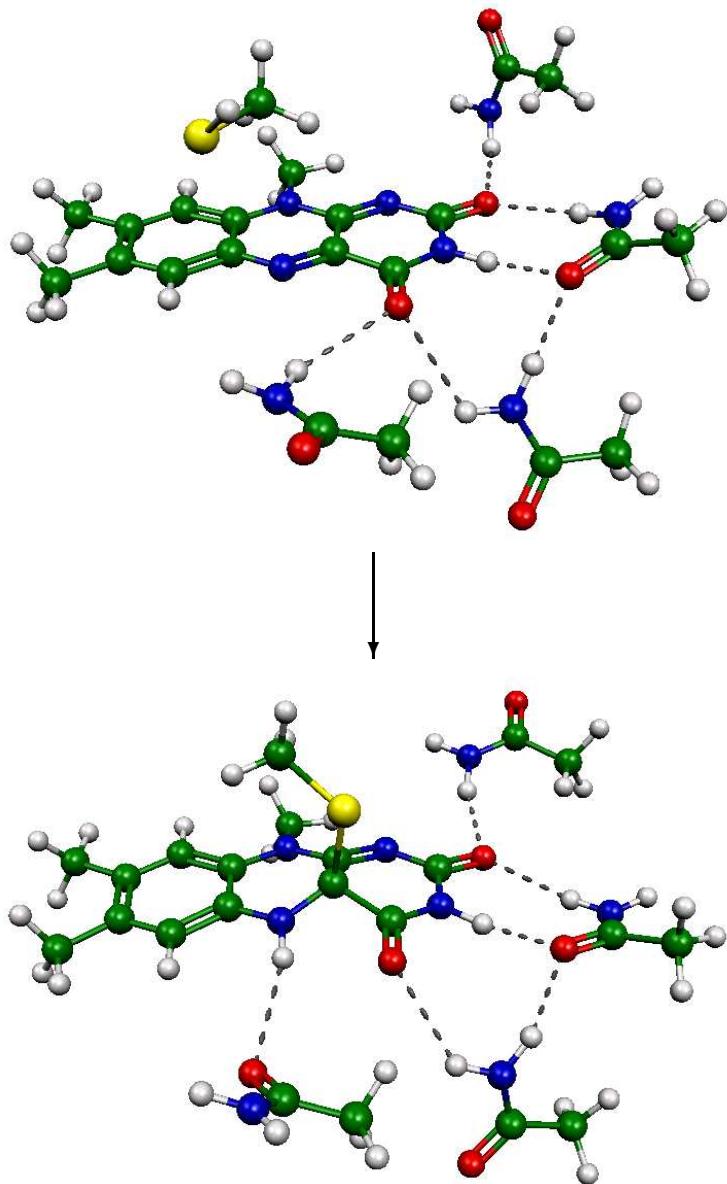


Abbildung 3.19: Auf B3LYP/6-31G*-Niveau in S_0 (partiell) optimiertes Modell für Dunkel- (oben) und Adduktform (unten) mit Lumiflavin **1a** für FMN und vier Aminosäureresten.

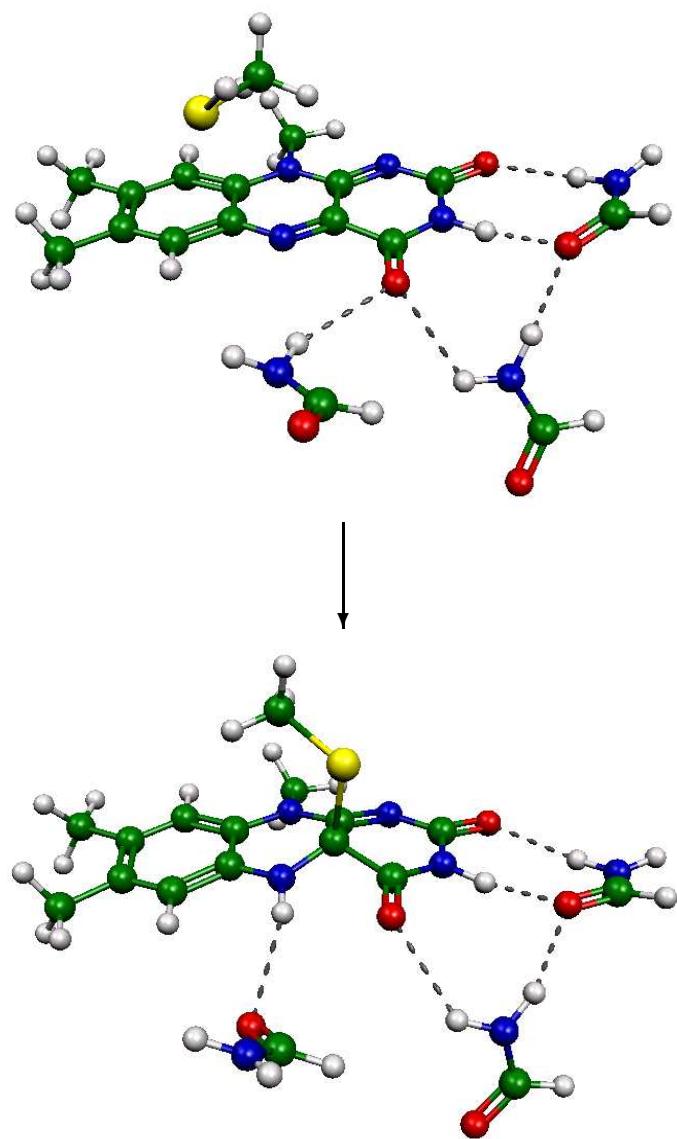


Abbildung 3.20: Auf B3LYP/6-31G*-Niveau in S_0 (partiell) optimiertes Modell für Dunkel- (oben) und Adduktform (unten) mit Lumiflavin **1a** für FMN und drei Aminosäureresten.

3.3 Modellierung der Adduktbildung

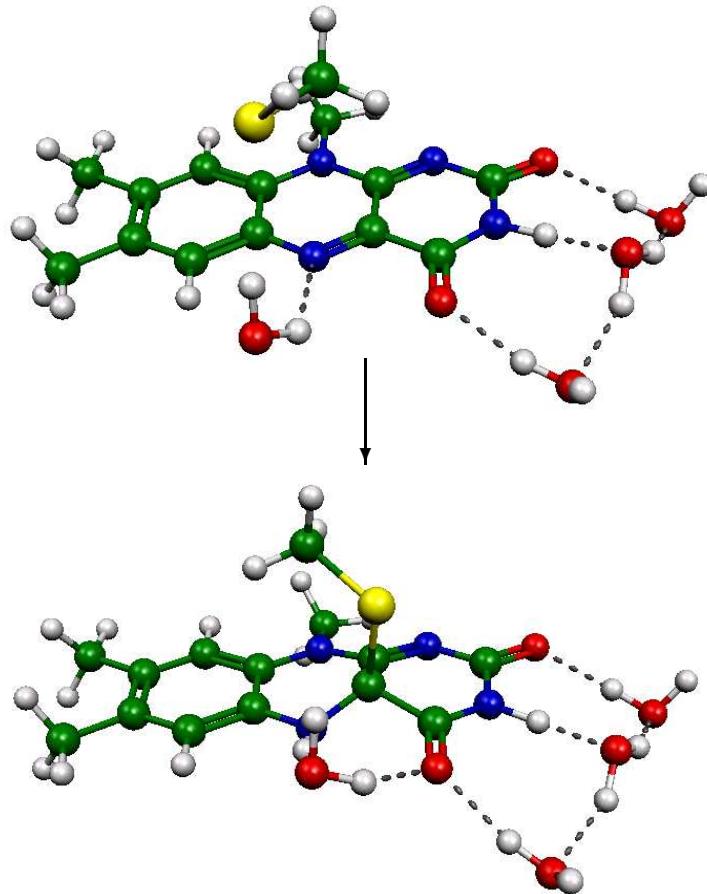


Abbildung 3.21: Auf B3LYP/6-31G*-Niveau in S_0 (partiell) optimiertes Modell für Dunkel- (oben) und Adduktform (unten) mit Lumiflavin **1a** für FMN und vier Wassermolekülen.

	Modell Lumiflavin 1a			Modell Isolumazin 3a		
	4 AS-Reste	3 AS-Reste	4 H ₂ O	4 AS-Reste	3 AS-Reste	4 H ₂ O
Gasphase	+0,439	+0,704	-0,051	+0,457	+0,719	+0,064
$\varepsilon = 4$	+0,469	+0,693	+0,061	+0,588	+0,791	+0,185
$\varepsilon = 78$	+0,440	+0,697	+0,108	+0,624	+0,804	+0,243

Tabelle 3.26: Energiedifferenzen zwischen Addukt- und Dunkelform in eV. Der experimentelle Wert für ΔH liegt zwischen +0,9 bis +1,4 eV [115, 116].

bilisierung der Dunkelform relativ zur Adduktform, wie schon im vorigen Abschnitt. Ein differenzierteres Bild liefert die Betrachtung der Modelle mit den entsprechend den Kristallstrukturen ausgerichteten Aminosäureresten. Hier hat die Hinzunahme

Ergebnisse der quantenchemischen Rechnungen

der polarisierbaren Umgebung im Falle des Lumiflavin-Modells nur sehr moderaten Einfluss auf die Energetik. Vielmehr wird schon durch die alleinige Berücksichtigung der Aminosäurereste die Dunkelform relativ zur Adduktform energetisch deutlich abgesenkt. Bei Isolumazin **3a** ist die beobachtete Stabilisierung des Edukts größer. Wie schon in Abschnitt 3.3.1 gefunden, ist die Energiedifferenz bei Isolumazin stets positiver als beim entsprechenden Lumiflavin-Modell. Insgesamt kann man aber feststellen, dass der experimentelle Wert von +0,9 bis +1,4 eV [115, 116] durch die hier vorgestellten Modelle schon deutlich besser approximiert werden kann, als das in den vorigen Kapiteln der Fall war. Dass hierfür aber Wassermoleküle allein, die immerhin die Stabilisierung durch Ausbildung von H-Brücken wiederspiegeln können sollten, nicht ausreichen, weist darauf hin, dass der Einfluss des Proteins auf die Energetik eher durch die Anordnung der das FMN umgebenden Aminosäuren gegeben ist, es sich also im wesentlichen um einen „sterischen“ Effekt handelt.

3.3.6 Linear-Transit-Pfade

Da die Bemühungen, einen Übergangszustand für die Addition zu finden, leider nicht von Erfolg gekrönt waren, wurde versucht, den Reaktionspfad für die Additionsreaktion folgendermaßen zu approximieren: Durch lineare Interpolation zwischen Edukt- und Adduktgeometrie (in internen redundanten Koordinaten [122]) der Modelle aus Abbildung 3.15 sind neun neue Geometrien erzeugt worden, an denen die Energien für S_0 und T_1 bestimmt worden sind. Der so erhaltene Reaktionspfad entspricht also grob einem konzertierten Mechanismus. Ebenso wurde ein Reaktionsverlauf über die Zwischenstufe in Abbildung 3.15 betrachtet. Hierzu wurde jeweils zwischen Edukt- und Intermediatgeometrie bzw. zwischen Intermediatgeometrie und Adduktform interpoliert. Um auf die selbe Anzahl von Schritten (Geometrien) wie zuvor zu kommen, sind hier jeweils vier neue Geometrien erzeugt worden.

Die Berechnung erfolgte mit B3LYP/6-31G*; stets wurde auf Stabilität der Wellenfunktion getestet. Die erhaltenen Energieverläufe sind in Abbildung 3.22 gezeigt. Man findet bei beiden Reaktionsverläufen im mittleren Bereich Punkte, an denen sich die T_1 - und S_0 -Flächen sehr nahe kommen. An diesen Punkten ist auch wieder eine RB3LYP-Wellenfunktion instabil, vielmehr weisen die stabilen UB3LYP-Wellenfunktionen wieder deutlichen biradikalischen Anteil auf. In der Nähe dieser Stellen sollte auch der ISC-Übergang von der Triplett-Fläche in den Grundzustand durch Spin-Bahn-Kopplung stattfinden, da die Wahrscheinlichkeit für einen solchen Übergang mit abnehmendem energetischen Abstand der beteiligten Zustände zunimmt, wie aus störungstheoretischen Argumenten folgt. Genauere Aussagen hierzu würden die explizite Berechnung der Spin-Bahn-Kopplungsstärke erfordern.

Weiterhin wird festgestellt, dass die „Aktivierungsenergie“, die im zweiten Pfad-Modell (relativ zur Reaktionsenergie) nur wenig niedriger als im konzertierten Modell ist, hauptsächlich durch den (N5–H)-Abstand und weniger durch die Lage der

3.3 Modellierung der Adduktbildung

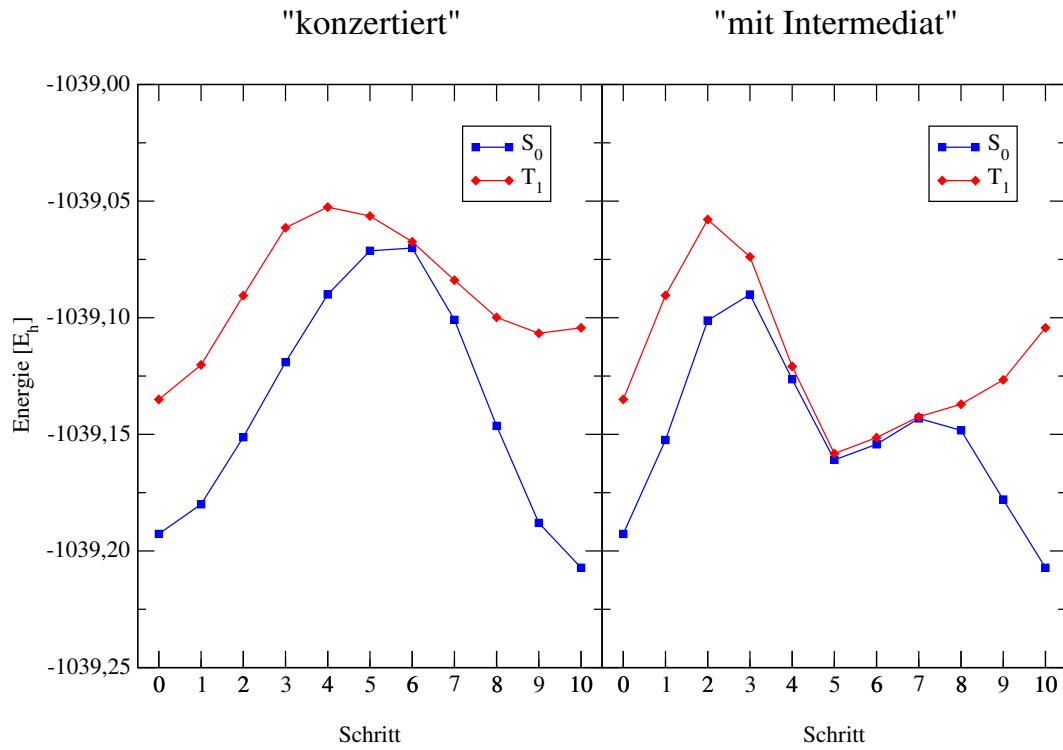


Abbildung 3.22: Durch Interpolation zwischen Edukt- und Adduktgeometrie („konzertiert“) bzw. zwischen Edukt-, Intermediat- und Adduktgeometrie (Abbildung 3.15) erhaltene „Linear Transit“-Pfade, siehe Text.

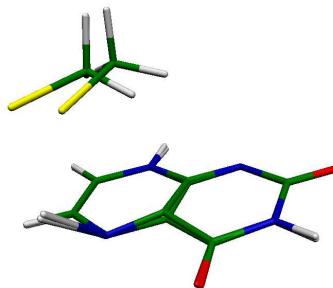


Abbildung 3.23: Vergleich der Geometrien mit höchster Energie in T₁ in Abbildung 3.22.

SCH₃-Gruppe gegeben ist; in Abbildung 3.23 sind die beiden Geometrien mit der jeweils höchsten Energie übereinandergelegt. Der „Übergangszustand“ liegt in beiden Fällen *auf der T₁-Fläche vor* den Punkten, bei denen ISC wahrscheinlich ist. Die Betrachtung der Mullikenladungen und -spindichten zeigt wiederum, dass bis dahin der Mechanismus eher als beginnender Wasserstoffatom-Übergang beschrieben

Ergebnisse der quantenchemischen Rechnungen

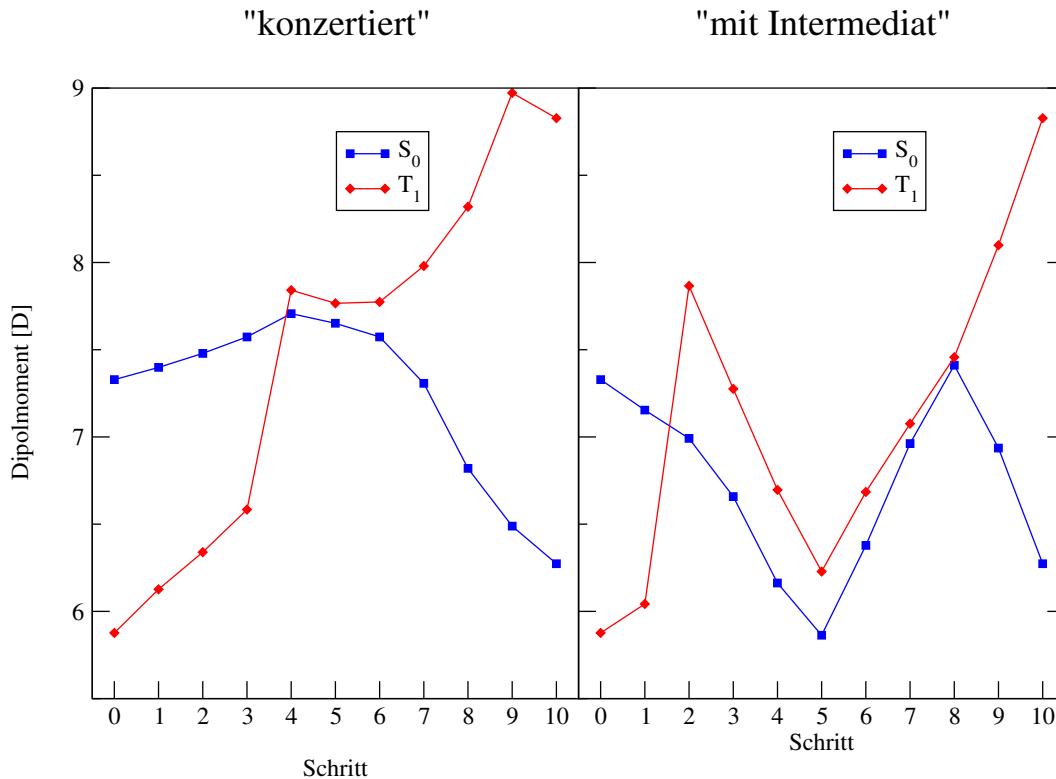


Abbildung 3.24: Veränderung des Dipolmoments entlang der in Abbildung 3.22 dargestellten Reaktionswege.

werden kann. Der kürzlich für die LOV2-Domäne von *Phot1* des Hafers gemessene H/D-Isotopeneffekt für die lichtgetriebene Adduktbildung zeigt, dass die Reaktionsgeschwindigkeit um etwa den Faktor 5 (bei 20°C) abnimmt, wenn man D₂O statt H₂O als Lösungsmittel verwendet [123]. Die Stärke des Isotopeneffekts weist darauf hin, dass im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt eine kovalente H-Bindung gebrochen wird. Gleichzeitig wird der in vorangegangenen Abschnitten besprochene Elektronentransfer von Cystein zu FMN als geschwindigkeitsbestimmender Schritt weiter unwahrscheinlich.

Im weiteren Verlauf werden von beiden Modellen Strukturen produziert, wo sich Triplett- und Singulettfläche nahe kommen, und ISC stattfindet. Die energetische Lage relativ zum Übergangszustand ist aber unterschiedlich: Während im zweiten Pfad-Modell die Energie deutlich abfällt, ist im „konzertierte“ Pfad-Modell diese Absenkung offensichtlich wegen der sich nähernden SCH₃-Gruppe viel geringer. Nach einem ISC in den S₀ führt der „konzertierte“ Pfad direkt zum Addukt, im zweiten Pfad-Modell muss hierfür nochmals eine kleine Energiebarriere überwunden werden. Welcher der betrachteten Wege der schnellere sein wird, kann aber wegen der erwähnten ähnlichen Aktivierungsenergie bei beiden Pfad-Modellen leider nicht

3.3 Modellierung der Adduktbildung

vorhergesagt werden. Insbesondere bleibt auch unklar, ob tatsächlich eine Zwischenstufe auftritt, oder nicht. Insgesamt kann man feststellen, dass die Reaktion über einen Großteil des Verlaufs radikalischen Charakter besitzt, egal ob eher konzertiert oder nicht.

Bezüglich der thermischen Rückreaktion auf der S_0 -Fläche ergibt sich aus Bild 3.22, dass der konzertierte Mechanismus eine wesentlich höhere Aktivierungsenergie besitzt als die zweite Variante. Da wie schon gesagt auch auf der Grundzustandsfläche die intermediären Strukturen biradikalisch sind, erscheint demnach eine zweischrittige Rückreaktion mit einem Flavinradikal als Zwischenstufe wahrscheinlich. Die höhere Aktivierungsenergie besitzt dabei der zweite Schritt der Rückreaktion, also der H-Transfer vom Flavinradikal zum S-Atom, so dass auch hier ein H/D-Isotopeneffekt zu erwarten ist. Messungen an der oben genannten LOV2-Domäne von Hafer zeigen, dass die Rückreaktion circa dreimal langsamer in D_2O verläuft als in H_2O [123].

Gut verstehen kann man auch den Befund, dass die Rückreaktion offensichtlich auch durch Licht ausgelöst wird [19], siehe Abbildung 1.3. Nach Anregung des Addukts findet wahrscheinlich wieder ein schnelles ISC in den tiefsten Triplettzustand statt, in dem das Addukt aber nicht stabil ist, vgl. Seite 55, und relativ leicht in die getrennten Moleküle zerfällt.

Die bisherigen Betrachtungen bezogen sich wieder auf die Modelle in der Gasphase. Um abzuschätzen, wie sich eine polarisierbare Umgebung auswirken würde, ist in Abbildung 3.24 die Änderung des Dipolmoments für die beiden Pfade aufgetragen. Man sieht, dass die Adduktform im Grundzustand ein kleineres Dipolmoment aufweist als die Eduktform, was in einer größeren Stabilisierung des Edukts resultiert und gut mit den in Abschnitt 3.3.4 und 3.3.5 erlangten Ergebnissen zusammenpasst. Im Gegensatz dazu ist das Dipolmoment der Eduktform im T_1 -Zustand wesentlich kleiner als bei der Adduktgeometrie. Folgt man dem Reaktionsverlauf auf beiden Pfad-Modellen ausgehend vom Triplettzustand, nimmt zunächst das Dipolmoment bis zur Geometrie mit maximaler Energie (Abbildung 3.22) zu, das heißt, eine Umgebung würde die Aktivierungsenergie in beiden Fällen absenken. Nach einem Wechsel auf die Grundzustandshyperfläche fällt das Dipolmoment beim „konzertierten“ Pfad, gleichzeitig nimmt nach Abschnitt 3.3.4 mit dem Wechsel auf die S_0 -Fläche der ionische Charakter der Reaktion zu; beim zweiten Pfad wird ein Minimum durchlaufen.

Zusammenfassend für diesen Abschnitt lässt sich feststellen, dass

- die Additionsreaktion deutliche biradikalische Anteile aufweist,
- die Energetik der Addition zum Großteil durch das Protein bedingt sein muss, und
- die Rückreaktion in zwei Schritten abzulaufen scheint.

Kapitel 4

Molekulardynamische und Kraftfeld-Methoden

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Dynamik der LOV2-Domäne von *Adiantum*, für die als einzige zu Beginn der Rechnungen sowohl von der Dunkel-, als auch von der belichteten Form Kristallstrukturen vorlagen [15, 17], untersucht. Es soll nun ein kurzer Überblick über die verwendeten Verfahren gegeben werden.

4.1 Kraftfeld

In molekulardynamischen Rechnungen werden die Bewegungen der Atome klassisch durch näherungsweise Lösung der Newtonschen Bewegungsgleichungen bestimmt. Jedes Atom wird dabei durch folgende Parameter charakterisiert, die während der gesamten Rechnung für jedes Atom unverändert bleiben:

- Masse,
- Ladung,
- Konnektivität (also welches Atom mit welchem wie verbunden ist).

Zusätzlich werden gegebenenfalls Abstandsfixierungen zu anderen Atomen und ähnliche Einschränkungen in den Bewegungsfreiheitsgraden vorgenommen. Das wirkende Potential ist durch das *Kraftfeld* gegeben, wobei man verschiedene Anteile unterscheidet:

- bindende Wechselwirkungen,
- nichtbindende Anteile, und

- externe Potentiale,

wobei die ersten beiden Teile sich aus der Konnektivität und Ladung der Atome ergeben. In dieser Arbeit ist das im Programmpaket GROMACS in der Version 3.1.4 [124–126] zusammen mit dem GROMOS96-Kraftfeld [127] verwendet worden, das für Proteine optimiert ist.

4.1.1 Das GROMOS96-Kraftfeld

Das GROMOS96-Kraftfeld benutzt die folgenden mathematischen Formeln für die verschiedenen Anteile der interatomaren Wechselwirkungen:

- Potentielle Energie der Bindungsdehnung/-stauchung: biquadratische Form:

$$E_b(r_{ij}) = \frac{1}{4}k_{ij}^b(r_{ij}^2 - b_{ij}^2)^2. \quad (4.1)$$

Hierbei ist r_{ij} der Abstand zwischen den gebundenen Atomen i und j ; b_{ij} und k_{ij}^b sind Parameter (Gleichgewichtsabstand und Kraftkonstante).

- Winkelabhängiges Potential zwischen gebundenen Atomen:

$$E_a(\theta_{ijk}) = \frac{1}{2}k_{ijk}^\theta(\cos(\theta_{ijk}) - \cos(\theta_{ijk}^0))^2. \quad (4.2)$$

Hier ist θ_{ijk} der Winkel zwischen den gebundenen Atomen i , j und k ; θ_{ijk}^0 und k_{ijk} sind Parameter.

- Diederwinkel zwischen gebundenen Atomen:

$$E_d(\phi_{ijkl}) = k_\phi(\cos(n\phi_{ijkl} - \phi_{ijkl}^0) + 1), \quad (4.3)$$

wobei n die sogenannte *Multiplizität* des Diederwinkels ϕ_{ijkl} ist, und die Anzahl der Minima/Perioden im Intervall $[0^\circ; 360^\circ]$ bestimmt. ϕ_{ijkl}^0 und k_ϕ sind Parameter.

- Uneigentliche Diederwinkel (engl. *improper Dihedrals*):

$$E_i(\xi_{ijkl}) = k_\xi(\xi_{ijkl} - \xi^0)^2. \quad (4.4)$$

Hier sind ξ^0 und k_ξ Parameter. Im Unterschied zu normalen Diederwinkeln, wo die Atome i, j, k, l in dieser Reihenfolge auch immer aneinander gebunden sind, ist das bei uneigentlichen Diederwinkeln ξ_{ijkl} nicht unbedingt der Fall, siehe Abbildung 4.1 für zwei Beispiele. Uneigentliche Diederwinkel werden dazu verwendet, um bestimmte Atomgruppen planar ($\xi^0 = 0^\circ$), oder tetraedrisch ($\xi^0 = 35.26439^\circ$) zu halten, weswegen auch das Potential „härter“ als für echte Diederwinkel ist.

Kopplungsterme zwischen diesen Potentialen kommen im GROMOS96-Kraftfeld nicht vor.

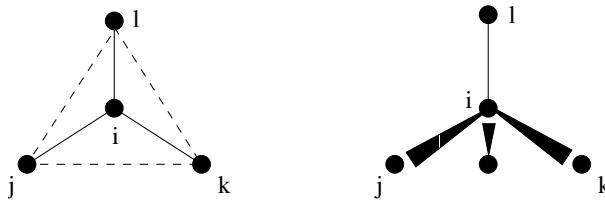


Abbildung 4.1: Uneigentliche Diederwinkel für Verzerrung aus der Planarität (links) bzw. Tetraedergeometrie (rechts), nach [124].

4.1.2 Nichtbindende Wechselwirkungen

Van-der-Waals- und elektrostatische Wechselwirkungen werden standardmäßig nur zwischen Atomen ausgerechnet, die mindestens drei Bindungen voneinander entfernt sind; 1-2- und 1-3-Wechselwirkungen werden damit ausgeschlossen, da sie schon durch die Kraftfeldparametrisierung berücksichtigt wurden. Für 1-4-van-der-Waals-Wechselwirkungen führt GROMOS96 eine getrennte Parameterliste; bei einigen kompakten Strukturen (vor allem in Ringstrukturen, so beispielsweise auch im FMN) werden teilweise *keine* nichtbindenden 1-4-Wechselwirkungen berechnet.

Die funktionale Form der van-der-Waals-Energie ist durch ein Lennard-Jones-Potential definiert:

$$E_{vdW}(r_{ij}) = \frac{C_{ij}^{(12)}}{r_{ij}^{12}} - \frac{C_{ij}^{(6)}}{r_{ij}^6}, \quad (4.5)$$

die Ladungswechselwirkung ist durch das Coulomb-Potential gegeben:

$$E_C(r_{ij}) = \frac{1}{\varepsilon} \frac{q_i q_j}{r_{ij}}, \quad (4.6)$$

wobei die relative Dielektrizitätskonstante ε bei Anwendung des GROMOS96-Kraftfelds normalerweise auf 1 gesetzt wird.

Um den Rechenaufwand zu reduzieren, werden van-der-Waals-Kräfte nur zwischen Atom(grupp)en berechnet, die sich näher als ein gewisser Grenzabstand sind, was wegen des schnellen Abfalls des Potentials mit zunehmender Entfernung im Allgemeinen eine gute Näherung ist. Praktisch muss dazu eine sogenannte *Nachbarliste* für alle Atome erstellt werden, die festlegt, zwischen welchen Atomen van-der-Waals-Wechselwirkungen ausgerechnet werden sollen. Für die Berechnung der (langreichweitigen) Coulombkräfte liefert ein solch einfaches Cut-Off-Kriterium, obwohl früher oft angewendet, schlechte Ergebnisse [128]. Heutzutage benutzt man oft Reaktionsfeldnäherungen, wie sie in Kapitel 2.5 für quantenchemische Rechnungen beschrieben worden sind, oder die in der vorliegenden Arbeit verwendete *Ewald-Methode*, bei der ebenfalls (im direkten Raum) die (abgeschilderte) Coulomb-Wechselwirkung nur bis zu einem Grenzabstand ausgerechnet wird, so dass auch

hier eine Nachbarliste geführt werden muß (zur Ewald-Methode weiter unten mehr). Bei der Bestimmung dieser Listen kam die *Doppelradien-Methode* zum Einsatz, bei der *nicht in jedem* Zeitschritt die Listen vollständig neu bestimmt werden, sondern in einen Nah- und einen Fernbereich aufgeteilt werden. Es gibt somit zwei Grenzradien, einen für den Nah- und einen für den Fernbereich. Die Atompaare innerhalb des Nahbereichs werden in jedem Zeitschritt aktualisiert, die des Fernbereichs nur typischerweise alle 5 bis 10 Zeitschritte. Des weiteren soll erwähnt sein, dass GROMACS/GROMOS96 stets bei der Nachbarlistengenerierung auf *Ladungsgruppen* zurückgreifen. Die Parametrisierung der Atomladungen in GROMOS96 ist so gestaltet, dass jedes Molekül so weit wie möglich in insgesamt neutrale Teile aufgeteilt wird, und nur geladene Gruppen (z. B. Carboxylatgruppen, aber auch einzelne Ionen, z. B. Na^+) eine ganzzahlige Gesamtladung tragen. Bei der Bestimmung der Nachbarlisten wird überprüft, ob die geometrischen Zentren zweier Ladungsgruppen näher als der Grenzabstand sind; wenn ja, werden alle Atome der beiden Ladungsgruppen in die Nachbarliste eingetragen. Damit wird erreicht, dass das Cut-Off-Kriterium, soweit möglich, immer nur zwischen neutralen Gruppen angewendet wird.

Die Ewald-Methode: Der langreichweite Teil der Coulomb-Wechselwirkung wurde mit Hilfe der Ewald-Methode [129–131] berechnet. Die Coulombenergie von N Teilchen der Elementarzelle eines periodischen Systems¹ kann geschrieben werden als

$$E_C = \frac{1}{2} \sum_{\mathbf{n}}' \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \frac{q_i q_j}{|\mathbf{r}_{ij} + \mathbf{n}|}, \quad (4.7)$$

mit $\mathbf{r}_{ij} := \mathbf{r}_j - \mathbf{r}_i$. Der Strich an der Summe über die Gittervektoren \mathbf{n} heißt, dass $i = j$ für $\mathbf{n} = \mathbf{0}$ ausgeschlossen wird (keine Selbstwechselwirkung). Die Konvergenz der Summe (4.7) ist sehr langsam. Das Ewald-Verfahren teilt die Coulomb-Energie in einen Nah- und einen Fernteil auf, wobei man beide Anteile so umschreiben kann, dass schnell konvergente Reihen entstehen. Unter Verwendung der Identität $\frac{1}{|z|} = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^\infty e^{-z^2 x^2} dx$ kann man E_C umformen zu

$$\begin{aligned} E_C &= \frac{1}{2} \sum_{\mathbf{n}}' \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N q_i q_j \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^\beta e^{-|\mathbf{r}_{ij} + \mathbf{n}|^2 x^2} dx \\ &\quad + \frac{1}{2} \sum_{\mathbf{n}}' \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N q_i q_j \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_\beta^\infty e^{-|\mathbf{r}_{ij} + \mathbf{n}|^2 x^2} dx, \end{aligned} \quad (4.8)$$

¹Um Randeffekte zu vermeiden, werden MD-Simulationen von Stoffen in kondensierter Phase für gewöhnlich mit periodischen Randbedingungen durchgeführt, vgl. Kapitel 5.1.1.

4.2 Molekulardynamik

was mit der komplementären Fehlerfunktion $\text{erfc}(z) := \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_z^\infty e^{-x^2} dx$ geschrieben werden kann als

$$\begin{aligned} E_C &= \frac{1}{2} \sum_{\mathbf{n}}' \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N q_i q_j \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^\beta e^{-|\mathbf{r}_{ij} + \mathbf{n}|^2 x^2} dx \\ &\quad + \frac{1}{2} \sum_{\mathbf{n}}' \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N q_i q_j \frac{\text{erfc}(\beta |\mathbf{r}_{ij} + \mathbf{n}|)}{|\mathbf{r}_{ij} + \mathbf{n}|}. \end{aligned} \quad (4.9)$$

Der erste Term wird noch in den Raum der reziproken Gittervektoren \mathbf{k} transformiert, so dass man schließlich

$$\begin{aligned} E_C &= \frac{1}{2\pi V} \sum_{\mathbf{k} \neq \mathbf{0}} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N q_i q_j \frac{1}{k^2} e^{-(\pi \mathbf{k}/\beta)^2 + 2\pi i \mathbf{k} \cdot \mathbf{r}_{ij}} - \frac{\beta}{\sqrt{\pi}} \sum_{i=1}^N q_i^2 \\ &\quad + \frac{1}{2} \sum_{\mathbf{n}}' \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N q_i q_j \frac{\text{erfc}(\beta |\mathbf{r}_{ij} + \mathbf{n}|)}{|\mathbf{r}_{ij} + \mathbf{n}|} \end{aligned} \quad (4.10)$$

erhält (V : Volumen der Elementarzelle). Der zweite Term ergibt sich durch die Berücksichtigung $i \neq j$ für $\mathbf{n} = \mathbf{0}$ im reziproken Raum. Der Parameter β (Einheit: m^{-1}) bestimmt das Verhältnis zwischen reziprokem und direktem Anteil bei der Berechnung von E_C , und wird so gewählt, dass beide Teile schnell konvergieren. Mit abnehmendem β nimmt dabei der im direkten Raum bestimmte Anteil zu, für $\beta = 0$ geht Gleichung (4.10) in Gleichung (4.7) über ($\text{erfc}(0) = 1$).

Bei der *Particle-Mesh-Ewald*-PME-Methode [130, 131] werden die Ladungspunkte zur Berechnung des reziproken Anteils näherungsweise durch Ladungspunkte auf einem äquidistanten Gitter ersetzt; damit wird es möglich, diesen Anteil durch schnelle Fourier-Transformation (FFT) auszurechnen.

Bei der praktischen Anwendung von PME in GROMACS wird der Wert von β nicht vom Anwender angegeben, sondern stattdessen eine Cut-Off-Distanz `rcoulomb`, bis zu der die Berechnung im direkten Raum erfolgen soll (siehe oben). Der Parameter β wird dann programmintern so bestimmt, dass der Abschirmfaktor $\text{erfc}(\beta |\mathbf{r}_{ij} + \mathbf{n}|)$ bei dieser Entfernung kleiner als der Eingabeparameter `ewald_rtol` ist, also $\text{erfc}(\beta \text{ rcoulomb}) < \text{ewald_rtol}$, so dass der direkte Anteil für größere Abstände vernachlässigt werden kann. Somit bestimmt `ewald_rtol` die gewünschte Genauigkeit der Wechselwirkung im direkten Raum.

4.2 Molekulardynamik

Wir kommen nun zur näherungsweisen Lösung der Newtonschen Bewegungsgleichungen $\mathbf{F}_i = m_i \mathbf{a}_i$; die Kräfte \mathbf{F}_i werden dabei vom vorher besprochenen Kraftfeld bestimmt.

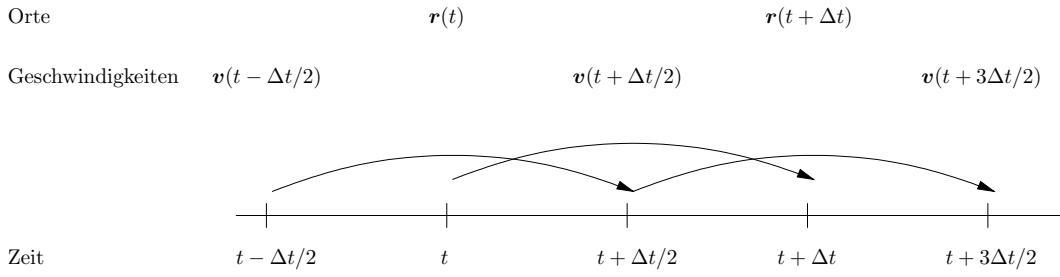


Abbildung 4.2: Leap-Frog-Algorithmus zur Integration der Bewegungsgleichungen, nach [128].

4.2.1 Der Leap-Frog-Algorithmus

GROMACS benutzt den *Leap-Frog-Algorithmus*, zu deutsch manchmal auch *Bock-sprung-Algorithmus* genannt, zur Integration der Bewegungsgleichungen [128, 132]. Durch Taylor-Entwicklung nach $\frac{\Delta t}{2}$ mit Abbruch nach dem Glied zweiter Ordnung lassen sich folgende Gleichungen herleiten (Index i weggelassen):

$$\mathbf{v}(t + \frac{\Delta t}{2}) = \mathbf{v}(t - \frac{\Delta t}{2}) + \frac{\mathbf{F}(t)}{m} \Delta t + O(\Delta t^3) \quad (4.11)$$

$$\mathbf{r}(t + \Delta t) = \mathbf{r}(t) + \mathbf{v}(t + \frac{\Delta t}{2}) \Delta t + O(\Delta t^3) \quad (4.12)$$

Wie man sieht, werden Orte und Geschwindigkeiten zu verschiedenen Zeitpunkten berechnet, was auch namensgebend war, vgl. Abbildung 4.2. Der Leap-Frog-Algorithmus zeichnet sich gegenüber anderen Methoden durch seinen minimalen Rechen- und Speicheraufwand aus.

4.2.2 Nebenbedingungen

Da die Größe des Zeitschritts Δt umso kleiner gewählt werden muss, je höher die maximale Frequenz des Systems ist, ist es sinnvoll, hochfrequente Freiheitsgrade, das heißt Streckschwingungen, einzufrieren, was einen etwa zwei bis viermal längeren Zeitschritt zulässt. Solche Nebenbedingungen können auf verschiedene Weise implementiert werden, in dieser Arbeit wurde der SETTLE-Algorithmus [133] für die Wassermoleküle und LINCS (LInear Constraint Solver) [134] für den Rest verwendet. Die Auswirkungen von Abstandsfixierungen wurden in der Literatur für Gleichgewichtssituationen untersucht, wobei sich herausgestellt hat, dass die berechneten physikalischen Eigenschaften dadurch nicht verzerrt werden [135, 136]. Bindungswinkel dürfen hingegen nicht ohne weiteres festgehalten werden [136].

Der LINCS-Algorithmus funktioniert, kurz gesagt, wie folgt (Abbildung 4.3): Zunächst wird die Bindungsänderung ohne Nebenbedingung berechnet; dann werden

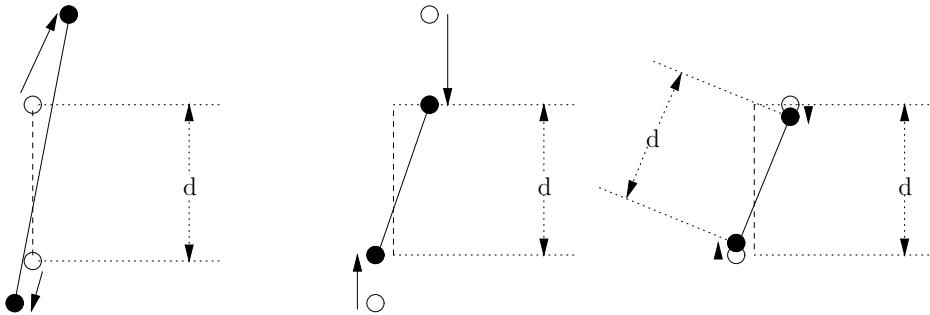


Abbildung 4.3: LINCS-Verfahren zur Berücksichtigung von Nebenbedingungen bezüglich der Bindungslänge, nach [134]. d bezeichnet die ursprüngliche Länge der Bindung, die Pfeile deuten die Verschiebungsvektoren der beiden Atome an. Zur Erläuterung der Schritte, siehe Text.

die Anteile der Verschiebungsvektoren entlang der alten Bindung herausprojiziert, und schließlich wird nochmals entlang dieser Richtung gestaucht, um die durch die Rotation der Bindung verbleibende Längenänderung zu kompensieren.

Für starre Wassermoleküle, wie *Single-Point-Charge-(SPC)-Wasser* [137], existieren analytische Gleichungen, um die feste Molekülgeometrie in einem Schritt zu berücksichtigen (SETTLE-Algorithmus). Das SPC-Wasser-Modell ist gekennzeichnet durch einen O–H-Abstand von 1,0 Å und einer Ladung von $-0,82e$ bzw. $+0,41e$ auf dem O-Atom bzw. den H-Atomen. Der H–H-Abstand beträgt 1,6333 Å (die H-Atome sind somit in Richtung der Ecken eines Tetraeders mit O im Schwerpunkt ausgerichtet). Van-der-Waals-Wechselwirkungen treten nur mit dem Sauerstoffatom auf, wofür ein Lennard-Jones-Potential verwendet wird.

4.2.3 Temperatur- und Druckkopplung

Aufgrund numerischer Fehler, Unzulänglichkeiten des Kraftfelds, etc., kann es im Laufe einer MD-Simulation zu einem unphysikalischen Aufheizen/Abkühlen des Systems kommen. Um dem entgegenzuwirken ist es notwendig, die Temperatur des Systems zu kontrollieren.

Die „instantane“ Temperatur \tilde{T} eines N -Teilchensystems kann man definieren über

$$\frac{1}{2}N_F k \tilde{T} = E_{kin}, \quad (4.13)$$

mit N_F als Anzahl der Freiheitsgrade und

$$E_{kin} = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N m_i v_i^2. \quad (4.14)$$

Nach dem Gleichverteilungssatz gilt nämlich im Gleichgewicht, dass

$$\langle E_{kin} \rangle = \frac{1}{2} N_F k T, \quad (4.15)$$

wobei $\langle E_{kin} \rangle$ der Ensemble-Mittelwert der kinetischen Energie im thermodynamischen Gleichgewicht ist. Wie man sieht, geht Gleichung (4.13) in (4.15) über, wenn man den Mittelwert von $\langle \tilde{T} \rangle$ über ein Ensemble (wie es beispielsweise eine MD-Simulation liefert) berechnet, und mit der klassischen Temperatur T gleichsetzt. Insofern kann Gleichung (4.13) als eine mögliche Verallgemeinerung des Temperaturbegriffs angesehen werden; im folgenden wird nicht mehr zwischen \tilde{T} und T unterschieden.

Für die Regelung der Temperatur eines MD-Systems gibt es verschiedene Möglichkeiten. In dieser Arbeit wurde der sogenannte *Berendsen-Thermostat* [138] verwendet. Dabei wird vorausgesetzt, dass die zeitliche Temperaturänderung proportional zur Differenz zwischen Soll-Temperatur T_0 und Ist-Temperatur $T(t)$ ist (*schwache Kopplung*):

$$\frac{dT(t)}{dt} = \frac{T_0 - T(t)}{\tau_T}. \quad (4.16)$$

Das heißt, die Temperaturabweichung verschwindet exponentiell mit einer Zeitkonstante τ_T . Die Nachregelung der Temperatur erfolgt durch Skalierung der Geschwindigkeiten mit einem gemeinsamen Faktor λ , für den sich durch Einsetzen von Gleichung (4.13) in (4.16)

$$\lambda = \left[1 + \frac{\Delta t}{\tau_T} \left(\frac{T_0}{T(t - \frac{\Delta t}{2})} - 1 \right) \right]^{1/2} \quad (4.17)$$

ergibt.

Analog wie die Temperatur lässt sich auch der Druck des Systems durch schwache Kopplung nachregeln. Dies geschieht entsprechend zur Temperaturkopplung durch eine Skalierung der Simulationsbox und somit aller Ortskoordinaten [128].

Zur Temperaturkopplung ist noch zu sagen, dass man in Systemen wie „Protein in Wasser“ oder ähnlichem, das Protein und das Lösungsmittel *getrennt* an das Wärmebad der Temperatur T_0 koppelt, das heißt, zwei verschiedene Parameter λ_P und λ_{LM} verwendet. Der Grund dafür ist, dass wegen nicht perfekter Kopplung zwischen Protein und Lösungsmittel, Cut-Off-Effekten, etc., der Energieaustausch zwischen Protein und Lösungsmittel nicht gleichmäßig ist. Koppelt man ein solches System *insgesamt* an ein Temperaturbad, wird im allgemeinen ein Abkühlen des Proteins und ein Aufheizen des Lösungsmittels beobachtet. Der Temperaturunterschied liegt dabei typischerweise um die 100 K (für eine Simulation bei ca. 300 K).

4.3 Das CONCOORD-Verfahren

Eine „preiswerte“ Alternative für MD-Simulationen zur Erzeugung möglicher Konformationen eines Proteins ist das *CONCOORD*-Verfahren („from CONstraints to COORDinates“) [139]. Im Gegensatz zum MD-Ansatz wird hier nicht versucht, eine Trajektorie zu berechnen, sondern die für das Protein „sinnvollen“ Geometrien werden direkt aus einer Startgeometrie abgeleitet ohne dabei ein Kraftfeld zu benutzen, wie im Folgenden erläutert wird. Der Vorteil dabei ist, dass beispielsweise keine Barrieren zwischen verschiedenen Konformationen überwunden werden müssen (was bei einer MD-Simulation sehr lange dauern kann), und man daher schon mit relativ wenigen erzeugten Geometrien (typischerweise 500 bis 1000) ein repräsentatives Ensemble erhält, mit anderen Worten das Sampling ist oft besser. Dies gilt allerdings auch nur für nicht zu große Konformationsänderungen.

Die Erzeugung der Strukturen erfolgt auf Grund von Abstandsbedingungen. Dazu werden zunächst alle Atom-Atom-Abstände bestimmt, die dann um maximal $\pm D$ nm variiert werden. Wie groß D ist, hängt davon ab, in welcher Beziehung die betreffenden Atome zueinander stehen (z. B. direkt aneinander gebunden, über ein Atom aneinander gebunden, Teil einer Salzbrücke, Teil einer α -Helix, etc.); für Näheres siehe [139]. Da die Bestimmung, welche Atome aneinander gebunden sind, durch ein Abstandskriterium erfolgt, ist es ratsam, zuvor in einem Kraftfeld energieminierte Startgeometrien zu verwenden. Im nächsten Schritt werden dann mit einem Zufallsgenerator Strukturen erzeugt, die alle Abstandsbedingungen erfüllen. Die Analyse der erhaltenen Konformationen gibt Aufschluss über die „Beweglichkeiten“ der Atome im Protein, weshalb das CONCOORD-Verfahren hier (in einem verallgemeinerten Sinne) ebenfalls zu den molekulardynamischen Methoden (aber nicht als MD-Simulation!) gezählt werden soll. In der vorliegenden Arbeit ist CONCOORD 1.2, erhältlich unter [140], verwendet worden.

Kapitel 5

Molekulardynamische Rechnungen

Vergleicht man die vorhandenen Kristallstrukturen von LOV-Domänen im Dunkelzustand und der signalgebenden Adduktform, stellt man fest, dass die Konformationsänderungen äußerst gering sind [17, 18]. Allerdings kann man spekulieren, dass sich die Dynamik des Proteins ändert (das heißt beispielsweise, dass sich die Beweglichkeit einzelner Abschnitte ändert), was in der Kristallstruktur nur schwerlich sichtbar ist. Außerdem soll die Stabilität des Proteins in einer Molekulardynamik- (MD)-Simulation und einige Befunde in der Literatur (vgl. Abschnitt 5.2.2) überprüft werden.

5.1 Durchführung der Rechnungen

5.1.1 MD-Simulationen

Ausgangspunkte für die MD-Simulationen sind die Kristallstrukturen der Dunkel- und der Adduktform der LOV2-Domäne von *Adiantum capillus-veneris* [15, 17]. Die entsprechenden pdb-Codes heißen 1G28 und 1JNU (zur Darstellung von 1G28 siehe Abbildung 1.2 in der Einleitung. Die Kristallstruktur des belichteten Zustands von LOV2 (1JNU) ist auf Seite 91 abgebildet.)

Vorbereitung der Strukturen: Die beiden pdb-Dateien enthalten jeweils vier LOV2-Untereinheiten, von denen je eine (zusammen mit den dazugehörigen Kristallwassermolekülen) getrennt für die Simulation abgespeichert wurde. Die LOV2-Domäne besteht aus 104 Aminosäuren, die das FMN einschliessen. In der pdb-Datei fehlende Seitenketten und Wasserstoffatome sind angefügt worden. Die fehlenden Wasserstoffatome sind so hinzugefügt worden, dass saure Aminosäuren (Asp, Glu) und das C-terminale Ende deprotoniert, und basische Aminosäuren (Arg, His, Lys)

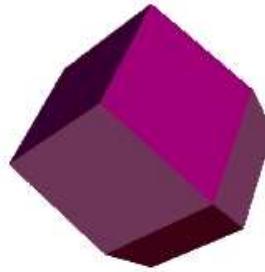


Abbildung 5.1: Rhombischer Dodekaeder. Man kann sich diesen als Würfel mit auf allen Seitenflächen aufgesetzten Pyramiden vorstellen.

und das N-terminale Ende des Proteins protoniert sind. Zudem ist die Phosphatgruppe von FMN in der GROMOS-Parametrisierung einfach protoniert, wobei pro Kristallstruktur zwei Geometrien erzeugt worden sind, die sich darin unterscheiden, welches O-Atom der Phosphatgruppe protoniert wurde. Die Ladung der Strukturen ist nach diesem Schritt jeweils 2-fach negativ.

Als Simulationszelle wurde ein rhombischer Dodekaeder (Abbildung 5.1) mit periodischen Randbedingungen verwendet. Die Größe wurde so gewählt, dass der minimale (Protein-Zellenwand)-Abstand 1,0 nm ist. Das führt im Fall des Dunkelzustands (1G28) auf ein Zellenvolumen von 224,08 nm³, im Fall der Adduktform (1JNU) auf 227,79 nm³. Die Simulationszelle wurde dann nach einem Zufallsalgorithmus unter Berücksichtigung kritischer van-der-Waals-Abstände und einer gewünschten Dichte von 1000 g/l mit SPC-Wassermolekülen (siehe Abschnitt 4.2.2) [137] gefüllt. Um die Simulationsbox neutral zu machen, sind anschließend zwei der Wassermoleküle durch Na⁺ ersetzt worden. Letztendlich befinden sich neben der LOV-Domäne 6883 SPC-Wassermoleküle und zwei Na⁺-Ionen (Dunkelform) bzw. 6954 SPC-Wassermoleküle und zwei Na⁺-Ionen (Adduktform) in der Elementarzelle.

Parametrisierung der Adduktform: Da das Addukt aus FMN und Cystein dem GROMOS96-Kraftfeld nicht bekannt ist, musste eine Parametrisierung dieser Struktur, die CFN genannt wurde, erfolgen. Dabei wurde so vorgegangen, dass zunächst die Atomtypen von CFN unter Wahl des passendsten aus denen im GROMOS96-Kraftfeld [127] vorhandenen Atomtypen bestimmt worden ist. Ebenso wurde mit den Bindungsparametern verfahren. Die Bestimmung der Ladungsgruppen und Atomladungen erfolgt so, dass die auf B3LYP/6-31G* berechneten Mulliken-Ladungen für Lumiflavin und HSCH₃ mit den für diese Verbindungen vorhandenen GROMOS96-Ladungen verglichen worden sind, und im Anschluss, aus den B3LYP/6-31G*-Ladungen für das Lumiflavin-Cystein-Addukt für das GROMOS96-Kraftfeld passende Ladungen abgeschätzt worden sind. Die Parametrisierung von

5.1 Durchführung der Rechnungen

Schritt	Dauer [ps]	T_0 [K]	τ_T [ps]	k_{pr} [kJ mol $^{-1}$ nm $^{-2}$]	Ensemble	τ_p [ps]
1	5	50	0,1	25000	NVT	–
2	5	100	0,01	10000	NVT	–
3	5	150	0,01	5000	NVT	–
4	5	200	0,01	1000	NVT	–
5	5	250	0,01	100	NVT	–
6	5	300	0,01	10	NVT	–
7	5	300	0,1	0	NPT	1,0

Tabelle 5.1: Protokoll der Äquilibrierung.

CFN ist im Anhang abgedruckt.

Geometrieoptimierung: Die so erhaltenen vier Geometrien (zweimal Dunkelform, zweimal Adduktform der LOV2-Domäne mit jeweils unterschiedlichem Prototierungsmuster an der Phosphatgruppe von FMN) sind mit der *Steepest-Descent*-Methode optimiert worden, um ungünstige Wechselwirkungen zu minimieren. Dabei sind die Ortskoordinaten der ursprünglich in den pdb-Dateien vorhandenen Atome mit einem harmonischen Potential festgehalten worden (Kraftkonstante $k_{pr} = 25000$ kJ mol $^{-1}$ nm $^{-2}$).

Äquilibrierung: Die Äquilibrierung der vier Systeme auf 300 K erfolgte in mehreren Schritten, deren wichtigste Parameter in Tabelle 5.1 zusammengefasst sind.

Der Zeitschritt Δt wurde auf 1 fs gesetzt, die Geschwindigkeiten sind über eine Maxwellverteilung bei 50 K initialisiert worden, wobei für die beiden Dunkelformen bzw. Adduktformen verschiedene Anfangszahlen für den Zufallsgenerator gewählt wurden. In den folgenden Schritten wurde die Temperatur T_0 des Berendsen-Thermostaten um je 50 K bis auf 300 K erhöht, wobei das Protein mit FMN und das Lösungsmittel Wasser mit den Natriumkationen getrennt an das Wärmebad gekoppelt worden sind. Das Volumen der Simulationszelle wurde während der Aufheizphase konstant gehalten ($\hat{=}$ NVT- Ensemble). Danach wurde weitere 5 ps lang bei 300 K und einem Druck p_0 von 1 bar äquilibriert ($\hat{=}$ NPT-Ensemble), siehe Tabelle 5.1.

In allen Rechnungen sind die Bindungslängen eingefroren worden; wie schon in Abschnitt 4.2.2 erwähnt, kam dabei für die Wassermoleküle die SETTLE-Methode, für alle übrigen Bindungen der LINCS-Algorithmus zum Einsatz. Zur Berechnung der van-der-Waals-Wechselwirkungen wurde die Doppelradienmethode (Abschnitt 4.1.2) mit einem inneren Grenzradius von 10 Å und einem äußeren Grenzradius von 15 Å verwendet. Für größere Abstände sind die van-der-Waals-Kräfte auf Null gesetzt worden. Für die elektrostatischen Wechselwirkungen wurde die PME-

Methode mit einem Grenzradius von 10 Å im direkten Raum, vgl. Abschnitt 4.1.2, verwendet. Sonst sind die voreingestellten Werte beibehalten worden [124]. Die Gesamtdauer jeder der vier MD-Simulationen beträgt 12 ns, dabei sind nach jeder ps die Ortskoordinaten und alle 5 ps die Geschwindigkeiten abgespeichert worden. Die Schwerpunktsbewegung des Systems ist in jedem Zeitschritt auf null gesetzt worden.

Molekulardynamik-Simulationen: Die anschließenden vier MD-Simulationen sind mit den gleichen Einstellungen wie eben für den letzten Äquilibrierungsschritt beschrieben durchgeführt worden.

5.1.2 CONCOORD-Rechnungen

Als Startgeometrien für die CONCOORD-Rechnungen kamen die im Vorfeld der MD-Simulationen geometrieeoptimierten Strukturen zum Einsatz, siehe oben. Wassermoleküle sind bis auf die in der Kristallstruktur vorhandenen verworfen worden. H-Atome sind ebenfalls entfernt worden. Alternativ wurden auch die Kristallstrukturen ohne weitere Behandlung verwendet, allerdings unterscheiden sich die erhaltenen Ergebnisse praktisch nicht, so dass nur die aufgrund der zuerst erwähnten Geometrien gezeigt werden. Für die Dunkel- und die Adduktform sind jeweils 1000 Geometrien erzeugt worden.

5.2 Ergebnisse der molekulardynamischen Rechnungen

5.2.1 Vergleich der MD-Simulations-Trajektorien

Mittlere Abweichung von der Kristallstruktur: In Abbildung 5.2 ist die mittlere Abweichung (*Root Mean Square Deviation*, RMSD) der LOV-Domänen gegenüber den Kristallstrukturen aufgetragen. Diese ist definiert als

$$RMSD(t) = \sqrt{\frac{1}{M} \sum_{i=1}^N m_i |\mathbf{r}_i(t) - \mathbf{r}_i^{(0)}|^2}, \quad (5.1)$$

mit $M = \sum_{i=1}^N m_i$ und N als Anzahl der betrachteten Atome. $\mathbf{r}^{(0)}$ bezeichnet die Ortskoordinaten in der Kristallstruktur. Die RMSD-Werte sind für die Atome im Protein berechnet. Zuvor wurden die Positionen der C_α -Atome jeder Struktur auf die Positionen der C_α -Atome der Kristallstruktur gefitett (Anpassung nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate, Least-Squares-Fit), um translations- und rotationsbedingte Abweichungen herauszufiltern.

5.2 Ergebnisse der molekulardynamischen Rechnungen

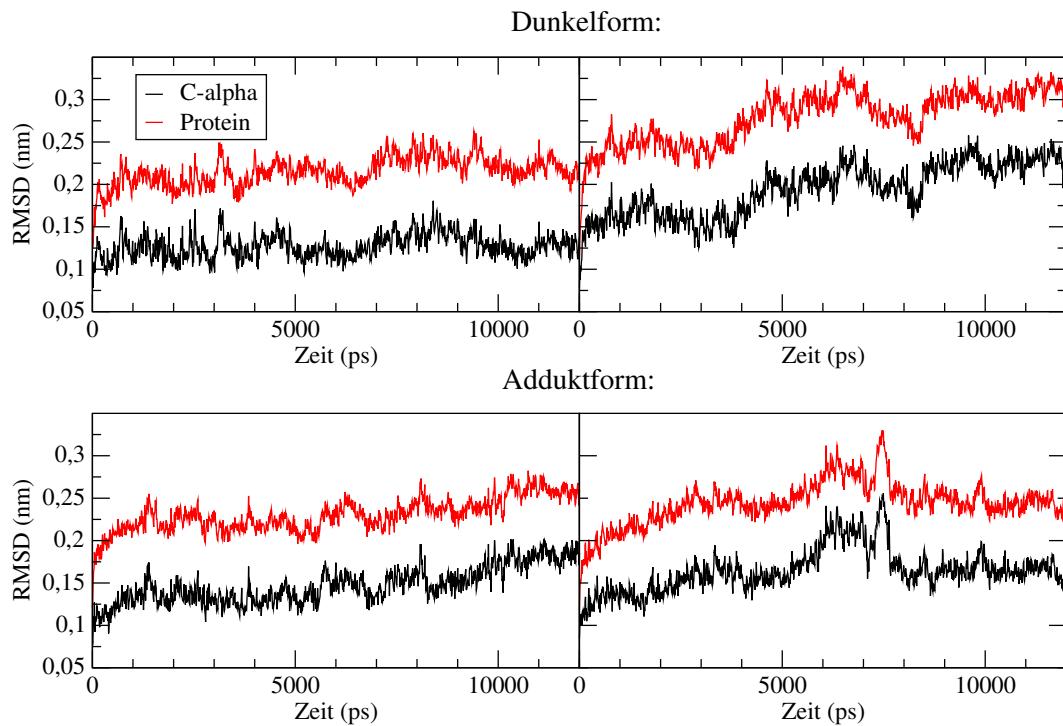


Abbildung 5.2: Mittlere Abweichnungen (RMSD-Wert, siehe Text) der LOV-Domäne gemäß der beiden Dunkelform-Simulationen und der beiden Adduktform-Simulationen als Funktion der Zeit. Gezeigt sind die RMSD-Werte für alle Atome im Protein einschließlich FMN und H-Atome bzw. die für die C_α -Atome des Proteirückgrats allein.

Molekulardynamische Rechnungen

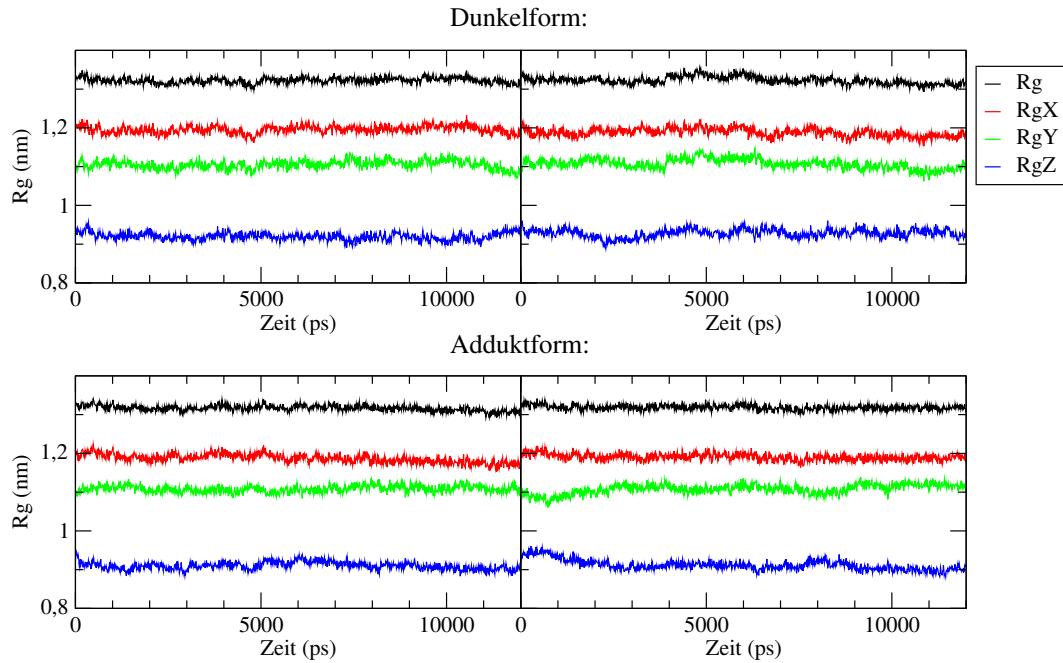


Abbildung 5.3: Veränderung der Trägheitsradien R_g für die MD-Simulationen. Außerdem sind die Trägheitsradien um die Hauptträgheitsachsen des Proteins angegeben.

Die RMSD-Werte liegen in vernünftigen Bereichen (für alle Atome 0,25 bis 0,3 nm, für die C_α -Atome 0,15 bis 0,25 nm). Für die zweite Simulation der Dunkelform wird dabei der stärkste Drift hin zu größeren RMSD-Werten beobachtet. Für die übrigen Trajektorien ist ein Gleichgewichtszustand nach etwa 1 ns erreicht. Insgesamt sind die Strukturen der Dunkel- und Adduktform während der Simulationen stabil.

Trägheitsradius: Der Trägheitsradius (engl. Radius of Gyration) ist gegeben durch

$$R_g(t) = \sqrt{\frac{1}{M} \sum_{i=1}^N R_i^2(t)m_i}, \quad (5.2)$$

wobei R_i der Abstand des Atoms i vom Schwerpunkt ist. Der Trägheitsradius ist somit ein Maß für die Kompaktheit einer Struktur. In Abbildung 5.3 ebenfalls angegeben sind die Trägheitsradien um die Hauptträgheitsachsen des Proteins. Es zeigt sich, dass sich die Kompaktheit offensichtlich nicht wesentlich ändert. Auch zwischen Dunkelzustand und belichteter Form des Proteins gibt es diesbezüglich keine deutlichen Unterschiede.

5.2 Ergebnisse der molekulardynamischen Rechnungen

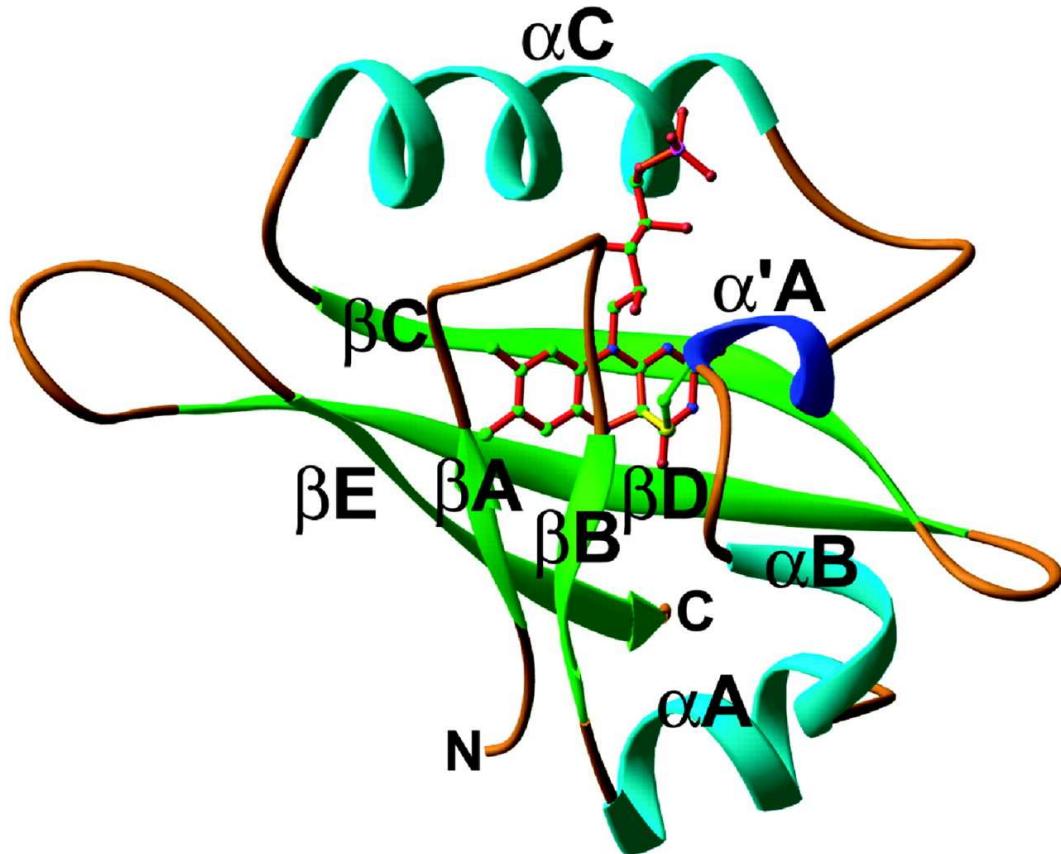


Abbildung 5.4: Kristallstruktur der LOV2-Domäne von *Adiantum capillus-veneris* im belichteten Zustand, aus Ref. [17]. Die Farbgebung der Sekundärstrukturelemente ist wie in Abbildung 1.2.

Sekundärstrukturen: Zur Bestimmung der Sekundärstruktur der Proteine wurde das Programm DSSP (Define Secondary Structure of Proteins) verwendet, das in [141] genau beschrieben ist. Die zeitlichen Entwicklungen der Sekundärstrukturen sind in den Abbildungen 5.5 und 5.6 gezeigt. Dabei steht B-Sheet für eine β -Faltblattstruktur, B-Bridge für eine β -Brücke (was man als β -Faltblatt mit einer Länge von nur einem Aminosäurepaar auffassen kann), Bend und Turn stehen für eine Windung/Schleife, A-Helix für eine α -Helix, 3-Helix für eine 3_{10} -Helix (siehe Einleitung) und Coil für eine nicht zugeordnete Sekundärstruktur.

Man kann die in Abbildung 1.2 dargestellten Strukturen gut erkennen; in Abbildung 5.4 ist die entsprechende Kristallstruktur im belichteten Zustand gezeigt. Wie man sieht, bleiben die Sekundärstrukturen im wesentlichen während der gesamten Simulation stabil, und es sind keine deutlichen Unterschiede zwischen der Dunkel- und der Adduktform zu finden.

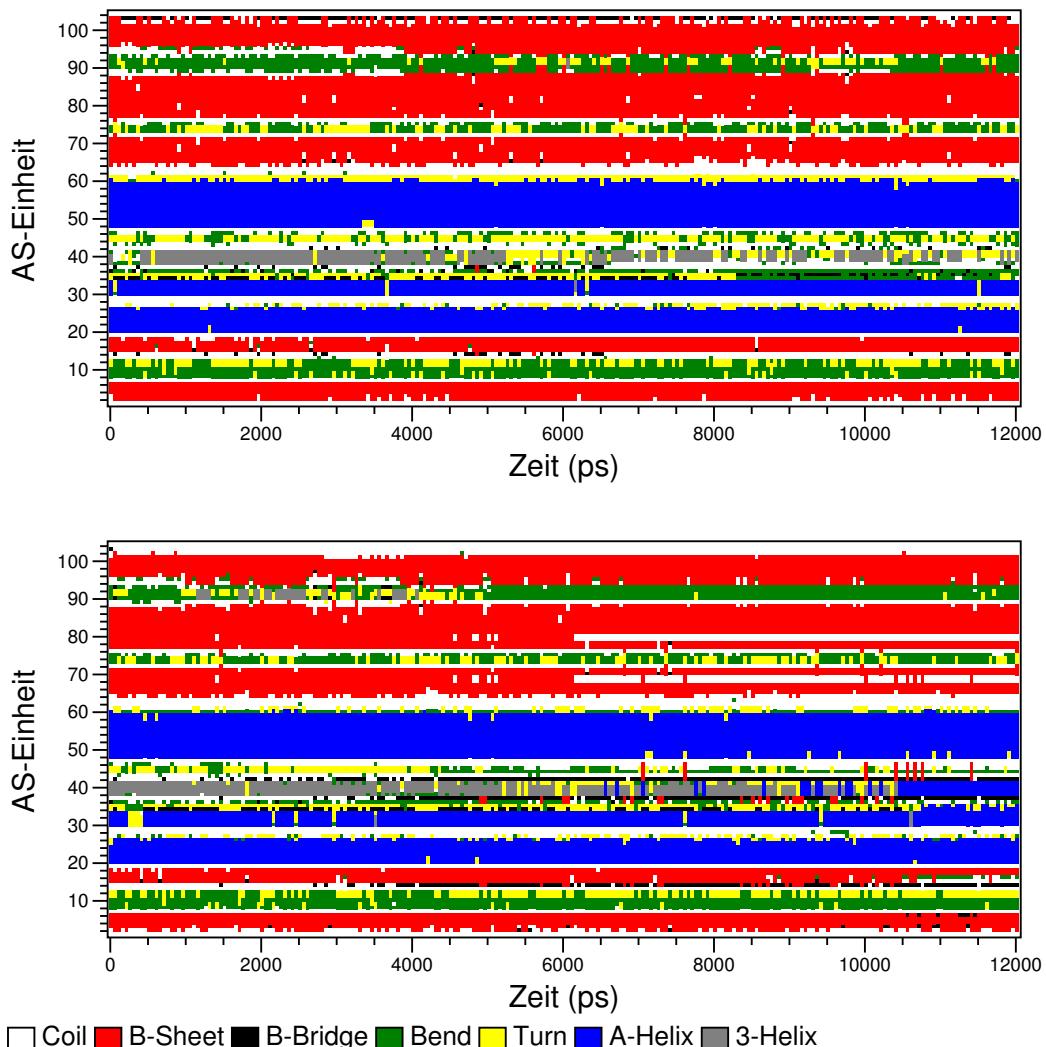


Abbildung 5.5: Zeitliche Entwicklung der Sekundärstruktur für die beiden Simulationen der Dunkelform. Die Aminosäureeinheiten sind beginnend vom N-terminalen Ende zum C-terminalen Ende durchnumeriert.

5.2 Ergebnisse der molekulardynamischen Rechnungen

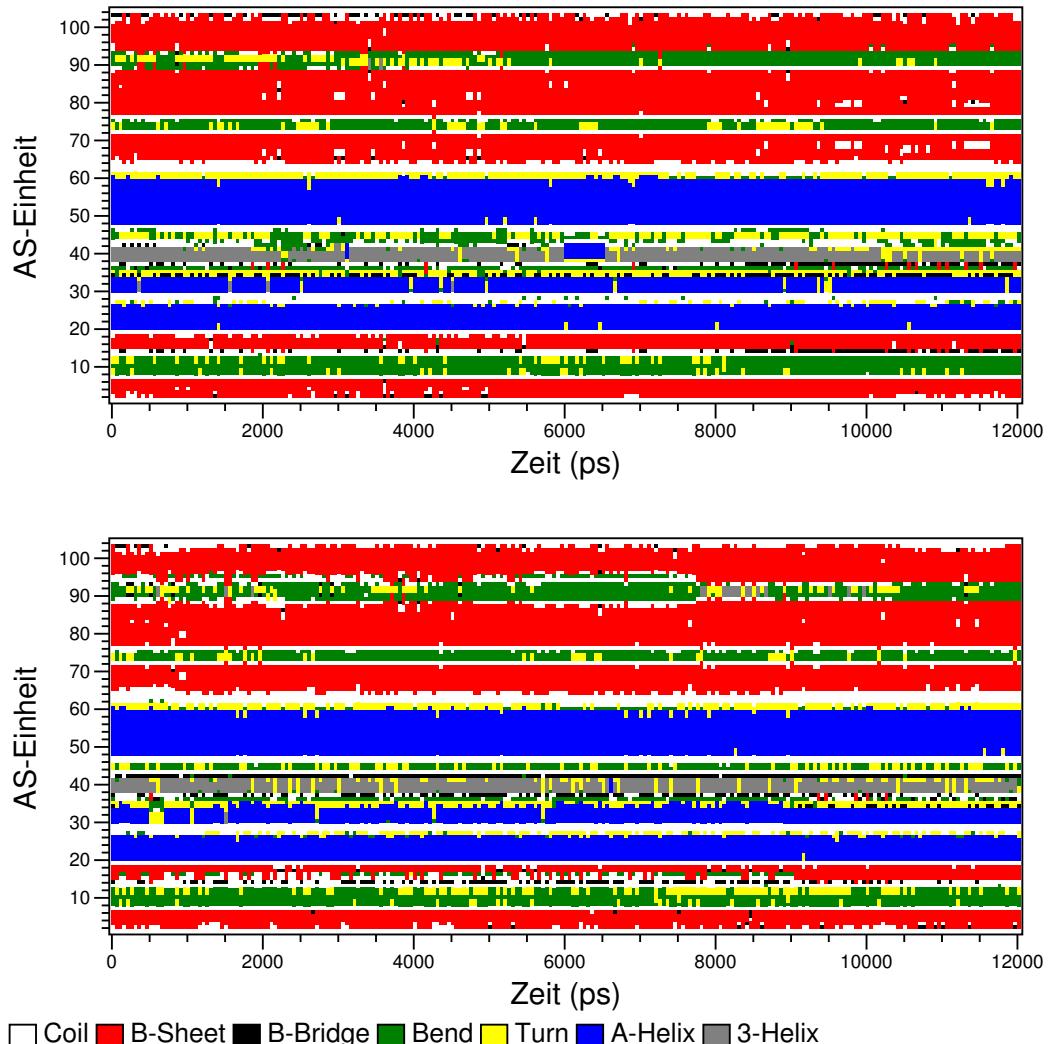


Abbildung 5.6: Zeitliche Entwicklung der Sekundärstruktur für die beiden Simulationen der Adduktform. Die Aminosäureeinheiten sind beginnend vom N-terminalen Ende zum C-terminalen Ende durchnumeriert.

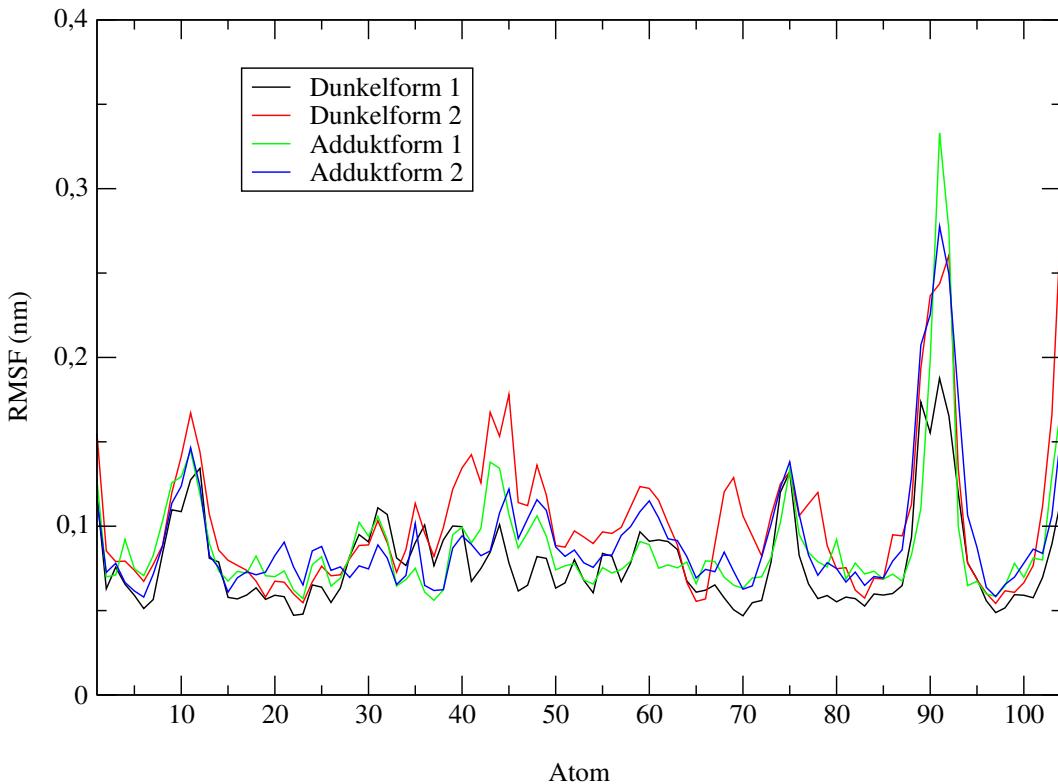


Abbildung 5.7: RMSF-Werte der LOV-Domäne für die C_α -Atome wie sie sich aus den je zwei Simulationen für die Dunkel- und Adduktform ergeben.

Atomfluktuationen: Die „Beweglichkeit“ der einzelnen Atome kann durch den *Root Mean Square Fluctuation*-(RMSF)-Wert charakterisiert werden. Dieser ist definiert durch

$$RMSF(i) = \sqrt{\langle \mathbf{r}_i^2 \rangle - \langle \mathbf{r}_i \rangle^2}, \quad (5.3)$$

wobei $\langle \dots \rangle$ den zeitlichen Mittelwert darstellt. In Abbildung 5.7 sind die Fluktuationen für die C_α -Atome aufgetragen, die beginnend am N-terminalen Ende von 1 bis 104 durchnumeriert sind.

Besonders große Beweglichkeit weist demnach in allen Simulationen der Bereich um die Aminosäuren Asn91 und Pro11 auf, die sich in den β -Schleifen zwischen den Faltblättern β D und β E bzw. β A und β B (siehe Abbildung 1.2) befinden. Auch um Gly75, das in der β -Schleife zwischen β C und β D liegt, findet man in allen Simulationen ähnlich erhöhte Mobilität. Die Schleife zwischen der 3_{10} -Helix und der Helix α C zeigt eine ziemlich breite Streuung bezüglich der Fluktuation in den verschiedenen Simulationen, jedoch ist kein eindeutiger Trend zwischen Dunkel- und Adduktform des Proteins auszumachen. Erkennen lässt sich hingegen die verringerte Beweglichkeit von Cys38, das in der belichteten Form an das FMN bindet.

5.2 Ergebnisse der molekulardynamischen Rechnungen

Ansonsten sind keine signifikanten Unterschiede zu finden. Die in beiden Addukt-Simulationen leicht erhöhte Fluktuation um Ser19, das sich am Übergang von β B nach α A befindet, könnte ein Hinweis auf leicht erhöhte Beweglichkeit dieser Region sein.

Auffallend ist außerdem, dass für die meisten Atomfluktuationen gilt, dass der RMSF-Wert gemäß der ersten Dunkelform-Simulation am kleinsten ist, während der nach der zweiten Dunkelform-Simulation am höchsten ist, und die Werte der zwei Addukt-Rechnungen dazwischen liegen.

Eine weitere Untersuchung der RMSF-Werte unter Einschluss aller Schweratome bringt keine neuen Erkenntnisse.

5.2.2 Speziellere Analysen

Konformationen der Cystein-Einheit: Während in der Röntgenstrukturanalyse der Dunkelform der LOV2-Domäne [15] nur eine Konformation der Cysteins aufgelöst werden konnte, wurden bei der Röntgenstrukturanalyse der LOV1-Domäne von *Chlamydomonas reinhardtii* zwei Konformere der (S-H)-Gruppe des Cysteins mit einer Verteilung von ca. 70% zu 30% entdeckt. Da die Konformere durch die Rotation um eine (C-C)-Bindung entstehen, kann man generell von drei möglichen Konformationen ausgehen, die auch alle in den MD-Simulationen der Dunkelform auftauchen. Abbildung 5.8 zeigt die drei Konformationen anhand von Schnappschüssen aus der ersten MD-Simulation der Dunkelform.

In Tabelle 5.2 sind die Anteile der Konformationen in den MD-Simulationen der Dunkelform zusammen mit den röntgenographisch bestimmten Werten angegeben. Für die erste Simulation findet man, dass alle drei Konformere etwa gleich stark besetzt sind, wohingegen die zweite MD-Simulation die experimentellen Werte relativ gut wiedergibt. Wenn man sich den zeitlichen Verlauf der Konformationen anschaut (Abbildung nicht gezeigt), erkennt man weiterhin, dass der Wechsel zwischen Konformation A und Konformation B relativ schnell erfolgt (ps-Bereich), wo-

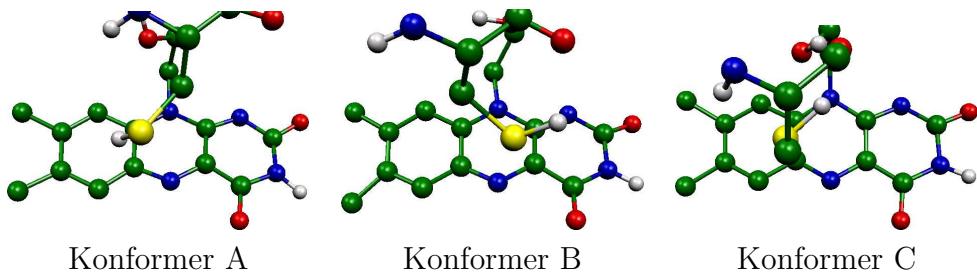


Abbildung 5.8: „Schnappschüsse“ für die drei möglichen Konformationen der Cystein-Einheit aus der ersten MD-Simulation für die Dunkelform.

Molekulardynamische Rechnungen

	MD(Dunkelf.) 1	MD(Dunkelf.) 2	LOV2 [15]	LOV1 [18]
Konformation A	31%	58%	(100%)	70% \pm 10%
Konformation B	34%	32%	—	30% \pm 10%
Konformation C	35%	10%	—	—

Tabelle 5.2: Verteilung der in Abbildung 5.8 dargestellten Konformere für die beiden Simulationen der Dunkelform von LOV2. Weiterhin sind die aus Röntgenstrukturanalysen erhaltenen Verteilungen angegeben. Für LOV2 ist in [15] wahrscheinlich wegen der geringeren Auflösung nur das am stärksten besetzte Konformer entdeckt worden; daher ist der Wert in Klammern gesetzt worden.

gegen die Konformation C, einmal eingenommen, eine ganze Zeit lang (ns-Bereich) stabil bleibt. So ergeben sich auch die Anteile der Konformation C in den beiden MD-Simulationen im wesentlichen nur aus je einem Zeitabschnitt, wo ausschließlich Konformation C vorliegt.

Durch die unterschiedliche Stellung des Schwefel-Atoms relativ zum FMN ist damit zu rechnen, dass für die beiden Konformationen die Spin-Bahnkopplung unterschiedlich stark ist, was einen deutlichen Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit haben kann, da nach Abbildung 3.22 die Geometrien, wo S_0 - und T_1 -Fläche praktisch entartet sind, relativ nahe am Übergangszustand liegen. Die experimentell gefundenen zwei Zeitkonstanten für die lichtgetriebene Additionsreaktion [19] sind daher möglicherweise auf diese Konformere zurückzuführen.

Schwefelatom–Isoalloxazin-Gerüst–Abstand: In Kapitel 3.3.2 wurde festgestellt, dass sowohl ein Proton-, als auch Elektronentransfer von Cystein zu Triplet-FMN energetisch ungünstig ist. Die Grenzdistanz zweier Punktladungen, wo die Proton- bzw. Elektronentransfer energetisch begünstigt werden, betragen 2,44 Å bzw. 2,37 Å, was deutlich kürzer als der minimale Abstand zwischen dem Cystein-Schwefelatom und dem Isoalloxazin-Gerüst von FMN in der Kristallstruktur des Dunkelzustands ist (3,58 Å). Allerdings könnte es sein, dass durch die ständige Bewegung der Atome dieser Abstand öfters wesentlich unterschritten wird. In Abbildung 5.9 ist der minimale Abstand zwischen dem Schwefelatom und dem Isoalloxazingerüst des FMNs für die beiden MD-Simulationen der Dunkelform des Proteins als Funktion der Zeit aufgetragen.

Die berechneten mittleren Abstände liegen für die beiden Simulationen mit Werten von 3,64 Å und 3,43 Å um den Wert der Kristallstruktur. Zudem fällt der Abstand nur selten unter die 3 Å-Marke, und kommt nie in die zuvor genannten Bereiche, wo Proton- oder Elektronentransfer energetisch bevorzugt sind.

5.2 Ergebnisse der molekulardynamischen Rechnungen

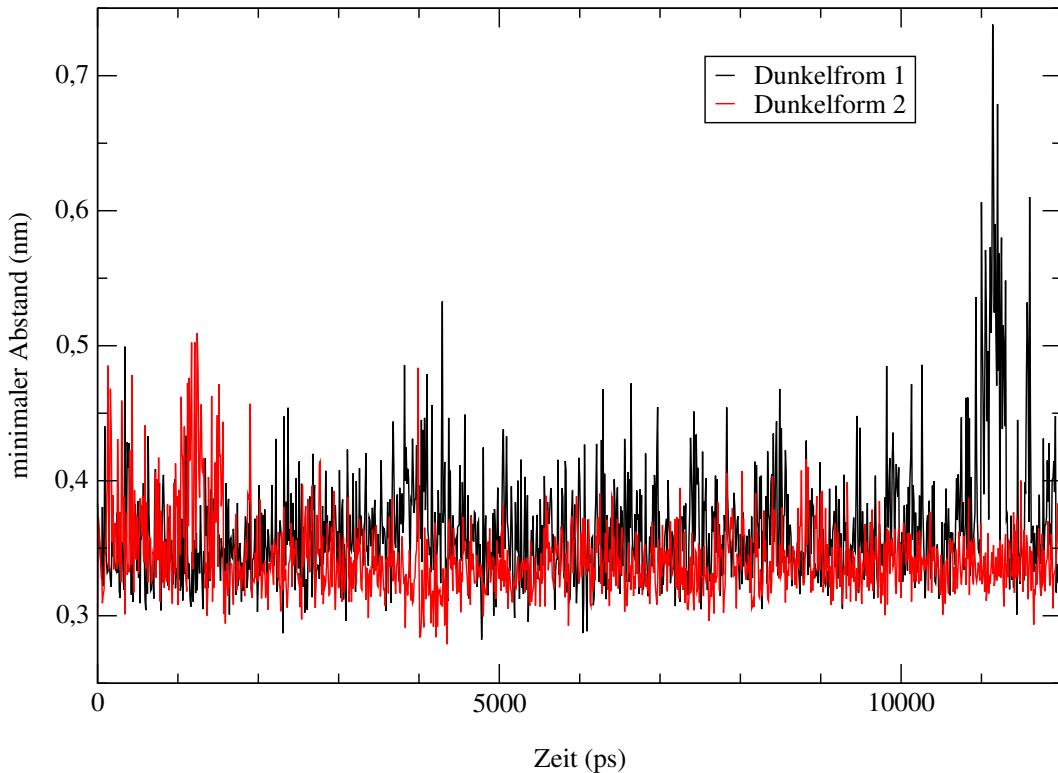


Abbildung 5.9: Minimaler Abstand des Cystein-Schwefelatoms vom Isoalloxazin-Gerüst des FMN-Chromophors im Dunkelzustand als Funktion der Zeit.

Stabilität der Salzbrücke Glu32–Lys73: Gemäß einer jüngst aufgestellten Hypothese, erfolgt die Signalfortpflanzung in LOV-Domänen nach folgendem Prinzip ab [142]: Durch die Adduktbildung wird – über mehrere Aminosäuren vermittelt – letztendlich eine bestimmte Salzbrücke an der Oberfläche der LOV-Domäne geschwächt, was dazu führt, dass die Wechselwirkung mit einem weiteren (unbekannten) Protein verstärkt oder geschwächt wird (man erinnere sich daran, dass PAS-Domänen, zu denen auch die LOV-Domänen zählen, eine wesentliche Rolle bei Protein-Protein-Wechselwirkungen spielen, siehe Einleitung). Dabei muss sich jedoch die mittlere Geometrie der Salzbrücke (und angrenzender Aminosäuren) nicht notwendigerweise stark ändern, es genügt, wenn sich die Flexibilität ändert. Dies kann aber nur schlecht aus Röntgenstrukturdaten abgelesen werden, weswegen sich Überprüfung dieser Annahme mit MD-Simulationen anbietet.

Wie schon zuvor dargelegt, können jedoch keine signifikanten Änderungen in der Flexibilität der Atome festgestellt werden, vergleiche nochmals Abbildung 5.7. In Tabelle 5.3 sind die mittleren Abstände und die Standardabweichungen für die Salzbrücke zusammengefaßt, die in der hier verwendeten Aminosäurenumumerierung zwischen Glu32 und Lys73 vorliegt. Man erkennt zum einen, dass weder der mitt-

	Dunkelform			Adduktform		
	MD 1	MD 2	LOV2	MD 1	MD 2	LOV2
$\langle R \rangle [\text{\AA}]$	4,28	3,93	3,20	4,06	4,15	3,23
$\sigma_R [\text{\AA}]$	1,20	0,72	–	1,06	1,10	–

Tabelle 5.3: Mittlerer Abstand zwischen dem Carboxylat-C-Atom von Glu32 und dem N-Atom der Aminogruppe von Lys73, die eine Salzbrücke an der LOV-Domänenoberfläche ausbilden. Angegeben sind auch die Standardabweichungen und Vergleichsabstände aus den Kristallstrukturen der LOV2-Domäne von *Adiantum capillus-veneris* [15, 17].

lere Abstand, noch die durch die Standardabweichung gekennzeichnete Flexibilität der Salzbrücke, eine eindeutige Veränderung in der Adduktform im Vergleich zur Dunkelform des Proteins aufweist. So zeigt die erste Simulation des Dunkelzustands den größten mittleren Abstand und Standardabweichung, die zweite Simulation der Dunkelform aber die kleinsten Werte von allen vier Simulationen; die Ergebnisse der Rechnungen zur Adduktform liegen zwischen diesen beiden Extremen, ähnlich wie vorher schon für die RMSF-Werte bemerkt. Somit kann die zuvor genannte Hypothese nicht bestätigt werden. Zum zweiten sieht man aber auch, dass die Salzbrücke im Mittel weiter geöffnet, das heißt also weniger stabil, als in den Kristallstrukturen ist; des weiteren ist die Abweichung von der Kristallstruktur mit bis zu $\approx 1 \text{ \AA}$ deutlich größer als der über alle Schweratome bestimmte RMSD-Wert, siehe Abbildung 5.2. Das könnte darauf hinweisen, dass die Stabilität der Salzbrücke des Proteins in Lösung geringer ist als in den vermessenen Proteinkristallen.

5.2.3 Hauptkomponentenanalysen

Ein gängiges Verfahren zur Auswertung von MD-Simulationen stellt die *Hauptkomponentenanalyse* oder *Essential-Dynamics*-Analyse dar [143, 144]. Dazu wird zunächst die *Kovarianzmatrix* der Atompositionen aufgestellt; diese ist (in ihrer nicht massengewichteten Form) definiert als

$$C_{ij} = \langle (x_i - \langle x_i \rangle)(x_j - \langle x_j \rangle) \rangle, \quad (5.4)$$

wobei x_i die Koordinate eines Atoms ist, und $\langle x_i \rangle$ der Mittelwert dieser Koordinate über die Trajektorie. C ist demzufolge eine symmetrische $(3N \times 3N)$ -Matrix, die auf der Diagonalen die Orts-Varianzen $\langle (x_i - \langle x_i \rangle)^2 \rangle$ zu stehen hat. Diagonalisiert man die Kovarianzmatrix, erhält man die gekoppelten Bewegungsmoden des Proteins als Eigenvektoren, die Eigenwerte stellen die Varianz, also die „Beweglichkeit“ der zugehörigen Mode dar; diejenigen mit den größten Eigenwerten beschreiben demnach den Hauptanteil der Bewegung des Systems für die betrachtete Trajektorie,

5.2 Ergebnisse der molekulardynamischen Rechnungen

	Dunkelform		Adduktform	
	MD 1	MD 2	MD 1	MD 2
K_1	0,610	0,888	0,841	0,060
K_2	0,038	0,403	0,672	0,030
K_3	0,031	0,308	0,291	0,139
K_4	0,041	0,239	0,030	0,050
K_5	0,002	0,079	0,014	0,251
K_6	0,041	0,067	0,132	0,010
K_7	0,038	0,061	0,012	0,000
K_8	0,029	0,016	0,000	0,010

Tabelle 5.4: Kosinusgehalt nach Gl. (5.5) der je acht wichtigsten Eigenvektoren.

weswegen man das beschriebene Vorgehen auch als Hauptkomponentenanalyse bezeichnet. Um Rotation des gesamten Proteins herauszufiltern, wird vor der Analyse jede Struktur auf eine Referenz gefittet, analog zur RMSD-Analyse (Seite 89).

Mit jeder der vier berechneten Trajektorien wurde eine Hauptkomponentenanalyse für die C_α -Atome der LOV-Domäne durchgeführt. Die Berücksichtigung weiterer Atome bringt keine neuen Erkenntnisse [143]. Als Referenz wurden die entsprechenden Kristallstrukturen verwendet.¹ In Abbildung 5.10 sind die acht wichtigsten Eigenvektoren für Simulationen gezeigt. Die Schwankungen sind allerdings zu groß, um klare Unterschiede zwischen Dunkel- und Adduktform zu unterscheiden. Insgesamt scheint nach 12 ns das Sampling noch unzureichend für sichtbare Differenzen zu sein. Erkennen lässt sich jedoch wiederum, dass auch die Hauptkomponenten für alle Simulationen relativ ähnlich sind.

Um zu testen, inwieweit die Simulationen noch „Rauschen“ als Folge von „zufälliger Diffusion“ beschreiben, kann man die Trajektorien auf die entsprechenden Hauptkomponenten projizieren. Da man zeigen kann, dass die Projektionen der Hauptkomponenten einer reinen Diffusionsbewegung Kosinusse mit der Periode $\tau = 2T/n$ sind (T : Simulationsdauer, n : Nummer des Eigenvektors bei Sortierung nach absteigender Größe) [145, 146], kann damit abgeschätzt werden, wie groß der Anteil an reiner Diffusion ist. Quantifizieren lässt sich das durch den (dimensionslosen) Kosinusgehalt K_i der Projektion p_i des jeweiligen Eigenvektors i , der definiert ist als

$$K_i := \frac{2}{T} \left(\int_0^T \cos(k\pi t) p_i(t) dt \right)^2 \left(\int_0^T p_i^2(t) dt \right)^{-1}. \quad (5.5)$$

¹Um den Einfluss der Referenzgeometrie auf die Ergebnisse zu untersuchen, wurde auch die mittlere Struktur der jeweiligen Trajektorie als Referenz versucht. Es zeigt sich, dass die erhaltenen Ergebnisse praktisch identisch sind, so dass eine Verfälschung der Ergebnisse durch eine ungünstig gewählte Referenz ausgeschlossen werden kann.

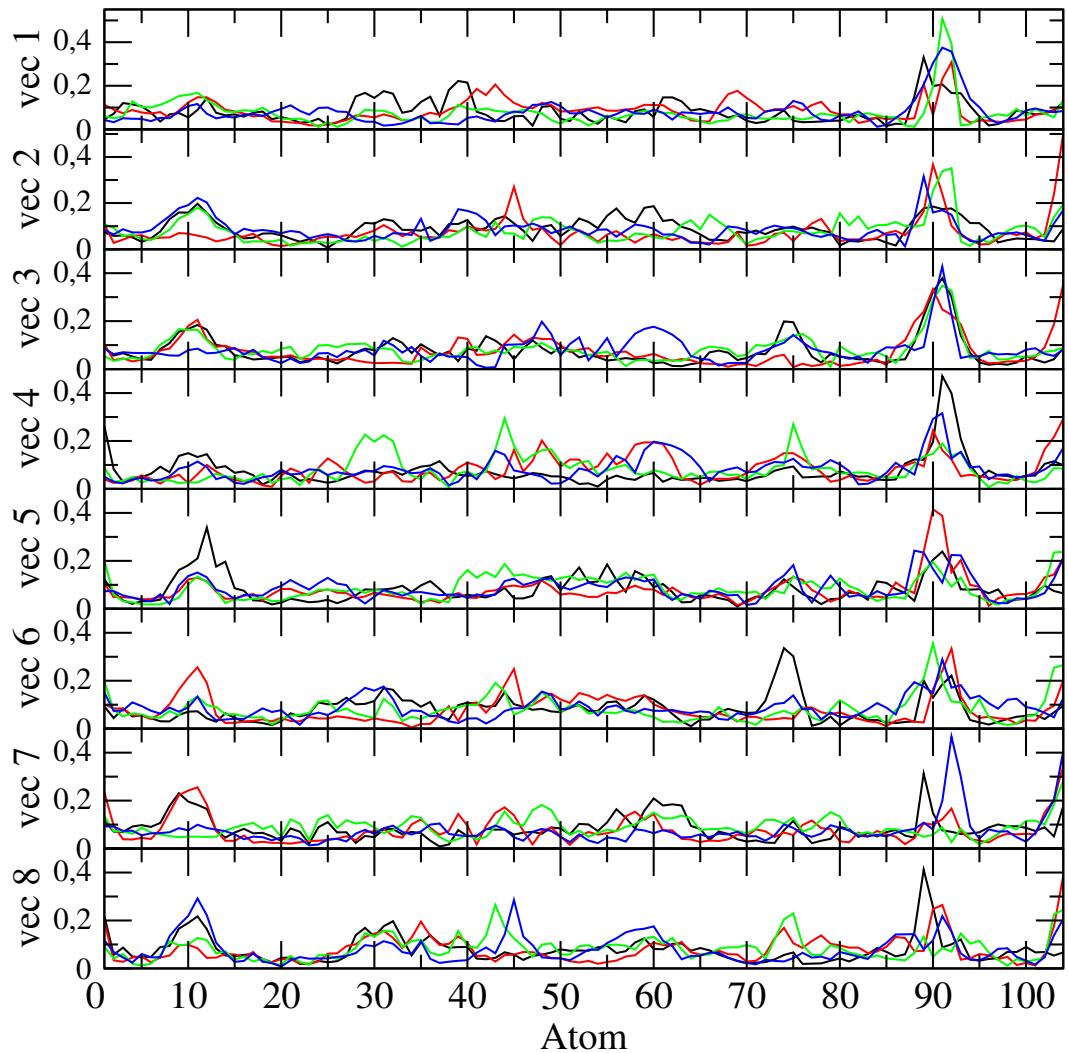


Abbildung 5.10: Darstellung der acht Eigenvektoren mit größter Varianz gemäß den MD-Simulationen (C_α -Atome als Basis). Die Farbgebung ist wie in Abbildung 5.7.

5.2 Ergebnisse der molekulardynamischen Rechnungen

In Tabelle 5.4 ist der jeweilige Kosinusgehalt für die wichtigsten acht Eigenvektoren aufgelistet. Wie man sieht, ist insbesondere die erste Hauptkomponente in drei der vier Simulationen stark mit Diffusion kontaminiert. Berechnungen des Kosinusgehalts für verschiedene Teilabschnitte der Simulationen zeigen außerdem, dass der Kosinusgehalt der Projektionen stark vom betrachteten Zeitfenster abhängt, und insbesondere nicht monoton mit der Simulationsdauer abnimmt. So sind beispielsweise die Werte für die erste Simulation der Adduktform nach nur 6 ns Dauer deutlich besser, das heißt kleiner, als nach 12 ns. So sind auch die relativ kleinen Werte für die zweite Simulation des Addukts wohl eher „zufällig“. Insgesamt macht sich hier vermutlich das bei allen (auch noch so langen) MD-Simulationen auftretende prinzipielle Samplingproblem, das heißt die unvollständige Repräsentation des Phasenraums, bemerkbar, vgl. hierzu auch [147]. Daher wurde eine weitere Methode als Grundlage zur Bestimmung der Hauptkomponenten ausprobiert, die prinzipbedingt keine Probleme mit Diffusionsverunreinigung hat, nämlich das CONCOORD-Verfahren.

CONCOORD-Ergebnisse: Die CONCOORD-Methode liefert Ensembles, die sich in besonderer Weise für Hauptkomponentenanalysen eignen, da sie keine Verunreinigung durch Diffusion enthalten [139]. Im vorliegenden Fall wurde die CONCOORD-Methode auf die Dunkel- und Adduktform der auch in den MD-Simulationen verwendeten LOV2-Domäne angewendet, siehe Abschnitt 5.1.2. Mit den zwei erhaltenen Ensembles wurde je eine Hauptkomponentenanalyse wie zuvor bei den MD-Simulationen beschrieben durchgeführt. Abbildung 5.11 zeigt die erhaltenen acht wichtigsten Eigenvektoren für die Dunkel- und Adduktform des Proteins.

Die Abbildung zeigt deutlich, dass fast keine Unterschiede in den Eigenvektoren gefunden werden, wohl wegen der hohen strukturellen Ähnlichkeit der beiden Proteinformen. Erst in der fünften Hauptkomponente kann man Unterschiede erkennen. Dabei scheint in der Adduktform die Beweglichkeit im Bereich von Arg44 etwas abzunehmen. Arg44 befindet sich in der Schleife zwischen α' A und α C (Abbildungen 5.4 und 5.5), so dass also die Flexibilität dieser Region durch die Adduktbildung eingeschränkt zu sein scheint. Die ebenfalls in der fünften Hauptkomponente auftretende Veränderung im Bereich von Leu10 wird bereits durch die sechste Hauptkomponente im wesentlichen aufgehoben. Leu10 ist zwischen den Faltblattstrukturen β A und β B lokalisiert. Im Bereich der Salzbrücken-Aminosäuren Glu32 und Lys73 sind keine Unterschiede zwischen den beiden Formen der LOV-Domäne zu sehen.

Insgesamt lässt sich feststellen, dass die Unterschiede in der Bewegung der LOV-Domäne zwischen Dunkel- und Adduktform sehr gering zu sein scheinen. Möglicherweise aber wird das Signal durch die Schleife zwischen α' A und α C weitergegeben und verstärkt. Die oben beschriebene Hypothese von Crosson und Mitarbeitern [142] konnte jedoch nicht bestätigt werden, zumindest auf der untersuchten Zeitskala.

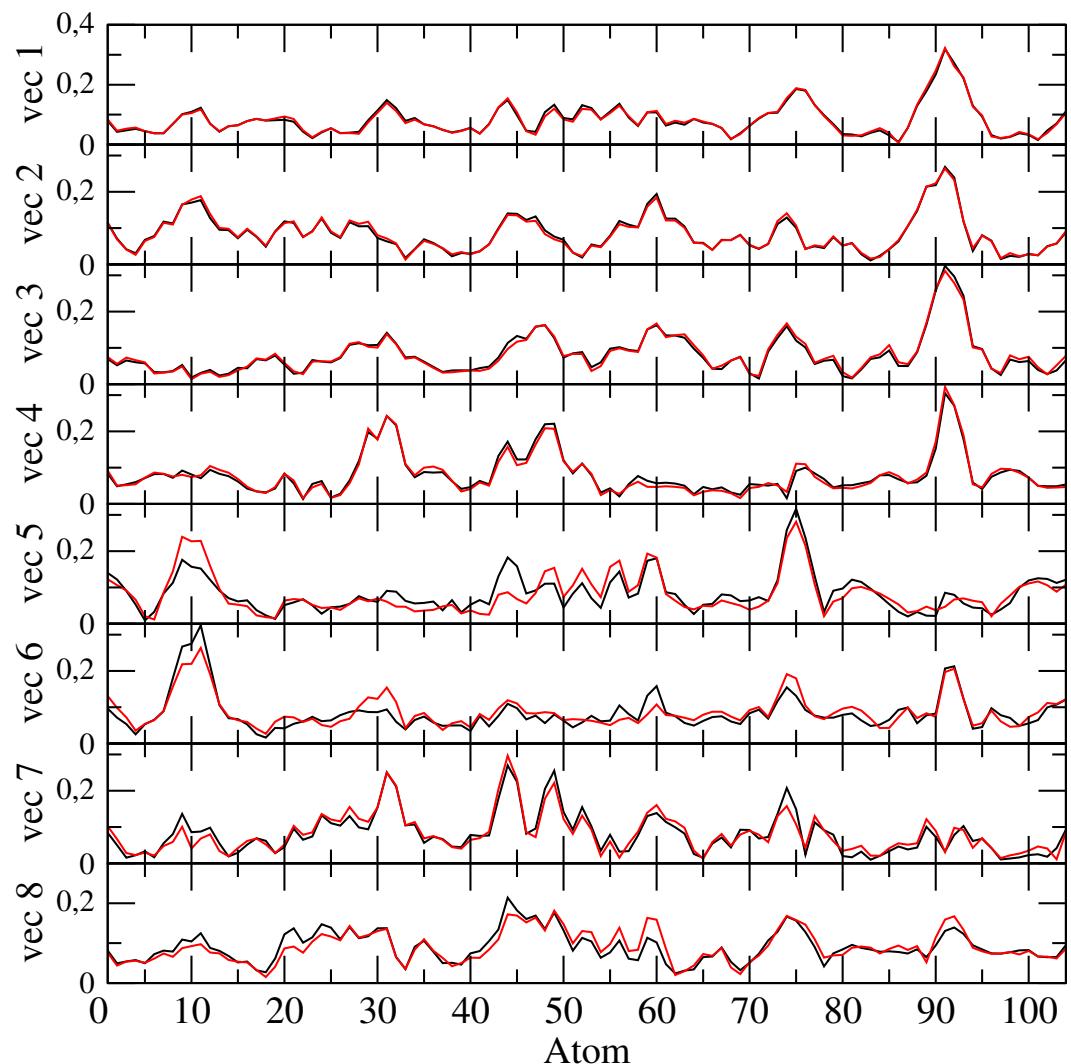


Abbildung 5.11: Darstellung der acht wichtigsten Eigenvektoren aus den CONCOORD-Ensembles für die Dunkel- (schwarz) und Adduktform (rot). (C_{α} -Atome als Basis)

Kapitel 6

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Eigenschaften von Flavinen und verwandten Modellkomponenten einschließlich der Absorptionsspektren berechnet. Ausgehend hiervon, sind die ersten Schritte der von den LOV-Domänen ausgehenden Signalkette in Phototropin untersucht worden. Zusammen mit experimentellen Daten und den durchgeführten Rechnungen gelangt man zu folgendem Bild: Nach Anregung des Chromophors FMN in einen höhergelegenen Singulettzustand S_n ($n \neq 0$) relaxiert dieser in den tiefsten Tripletzustand T_1 , was durch das Schwefelatom der benachbarten Cystein-Einheit beschleunigt wird (Schweratomeffekt). Da das Cystein protoniert vorliegt, gibt es drei „sinnvolle“ Modelle für den weiteren Reaktionsverlauf: Erstens könnte ein Proton-Transfer vom Cystein zum FMN stattfinden, wofür aber den Rechnungen nach der Cystein–FMN-Abstand etwas zu groß ist, als dass dieser Schritt energetisch begünstigt wäre. Das theoretisch entstehende Ionenpaar konnte zudem in keiner Rechnung gefunden werden, vielmehr folgt dem Proton stets (ein wenig abhängig von der Polarisierbarkeit der Umgebung) ein Elektron, was einem H-Atom-Transfer entspricht. Zum zweiten könnte ein Elektronentransfer vom Cystein zum FMN ablaufen; die Rechnungen zeigen aber, dass auch dieser Schritt energetisch ungünstig ist. Zudem konnte kein Hinweis für eine erhöhte Tunnelwahrscheinlichkeit vom Cystein zum Flavin gefunden werden, die sich in einer größeren Ladungsdichte am FMN bei der Ausgangsstruktur (H an S gebunden) manifestieren sollte. Vielmehr sind die beiden Fragmente im T_1 -Zustand praktisch neutral, vergleiche Tabelle 3.23 und 3.25. Experimentell spricht gegen den Elektronentransfer auch der beobachtete H/D-Isotopeneffekt der Addition [123]. Als dritte Möglichkeit gibt es den bereits erwähnten H-Atom-Übergang von Cystein zum Flavinmolekül. Dieser Schritt erscheint am wahrscheinlichsten, da er energetisch begünstigt ist, und, wie eben schon erwähnt, Rechnungen mit näher am Flavin lokalisiertem Proton biradikalischen Charakter aufweisen. Das ändert sich prinzipiell auch nicht bei der Berücksichtigung von Umgebungseffekten, obwohl ein gewisser ionischer Anteil induziert wird.

Zusammenfassung

Ob die lichtinduzierte Addition über ein echtes Intermediat verläuft, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. In jedem Fall kann man aber die folgende Reihenfolge annehmen: Zunächst beginnt im Triplettzustand der H-Übergang von S nach FMN; das S-Atom kann dem Flavin hingegen nicht so nahe kommen, als dass eine Bindung ausgebildet würde, denn das Addukt ist im T₁ nicht stabil. Das heißt aber, dass nach beginnendem oder auch vollendetem H-Transfer zunächst der Interkombinationsübergang in den elektronischen Grundzustand vollzogen werden muss, damit das S-Atom schließlich an das Flavin binden kann.

Neuerdings wird auch die Möglichkeit diskutiert, dass bereits im angeregten Singulettzustand das Proton auf das FMN übertragen wird, und dann erst Interkombination in den tiefsten Triplettzustand stattfindet [148]. Die Untersuchung dieses Mechanismus würde weitere Rechnungen im angeregten S₁, eventuell auch S₂, erforderlich machen, die in dieser Arbeit nicht durchgeführt worden sind. Vollkommen unsinnig erscheint diese Annahme jedenfalls nicht, da, wie gezeigt wurde, S₁ eine qualitativ ähnliche Elektronenverteilung wie T₁ besitzt, und damit beispielsweise basischer als der Grundzustand ist.

Für die Rückreaktion auf der Singulett-Grundzustandsfläche scheint jedoch ein Mechanismus mit einem Flavinradikal als Intermediat wahrscheinlicher. Ermöglicht wird die Rückreaktion im wesentlichen wohl durch die Proteinumgebung, die die Dunkelform im Vergleich zu Adduktform stärker stabilisiert, und so dafür sorgt, dass die Rückreaktion thermodynamisch günstig wird.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde versucht, ausgehend von Kristallstrukturen der Dunkel- und Adduktform einer LOV-Domäne Einblicke in das weitere molekulare Geschehen zu bekommen. Die hierzu durchgeföhrten MD-Simulationen zeigen jedoch, ähnlich wie die Kristallstrukturen keine sehr deutlichen Veränderungen durch die Adduktbildung, sowohl struktureller, als auch dynamischer Natur. Dafür konnten experimentelle Sachverhalte, beispielsweise die verschiedenen Konformationen der Cystein-Einheit zumindest qualitativ nachgebildet werden. Die Ergebnisse der CONCOORD-Rechnungen lassen es möglich erscheinen, dass die Flexibilität der α' -A- α C-Schleife durch die Adduktbildung etwas abnimmt, und dies für die Signalweitergabe verantwortlich ist.

Aufgrund der relativ geringen Änderung stellt sich aber weiterhin die Frage, ob dies dem tatsächlichen Weg der Signalfortpflanzung entspricht. Ebenso ist es möglich, dass die Kristallstrukturen nicht genau den im vollständigen Phototropin vorliegenden Konformationen entsprechen. In der Tat wird zur Zeit über die Relevanz der LOV-Kristallstrukturen in dieser Richtung diskutiert [149].

In Zukunft soll neben der lichtgesteuerten Additionsreaktion auch die thermische Rückreaktion der LOV-Domäne noch genauer untersucht werden, was den Vorteil hat, dass Grundzustandsrechnungen ausreichen. Idealerweise könnte der Übergangszustand und hiervon ausgehend der Reaktionspfad für die Rückreaktion

bestimmt werden. Eine andere Fragestellung ist, wie oben schon angedeutet, die Bedeutung des S₁-Zustands und möglicherweise noch höher angeregter Zustände für die Adduktbildung zu untersuchen. Interessant wäre auch die Abhängigkeit der Spin-Bahn-Kopplungsstärke von der Position des Schwefelatoms relativ zu FMN. Außerdem soll in Zukunft die Umgebung des „aktiven Zentrums“ noch stärkeren Eingang in die Berechnungen finden, beispielsweise unter Verwendung des ONIOM-Modells [150–152].

Anhang

Parametrisierung von Cysteinyl-FMN (CFN)

Nachfolgend ist der für Cysteinyl-FMN vorgenommene Eintrag in der Residuen-Datenbank-Datei `ffG43a1.rtp` aufgeführt. Der Abschnitt `[atoms]` definiert (in dieser Reihenfolge) Atombezeichner (siehe Abbildung 6.1), Atomtyp, Ladung und Nummer der Ladungsgruppe. In `[exclusions]` sind alle 1-4-Paare aufgeführt, zwischen

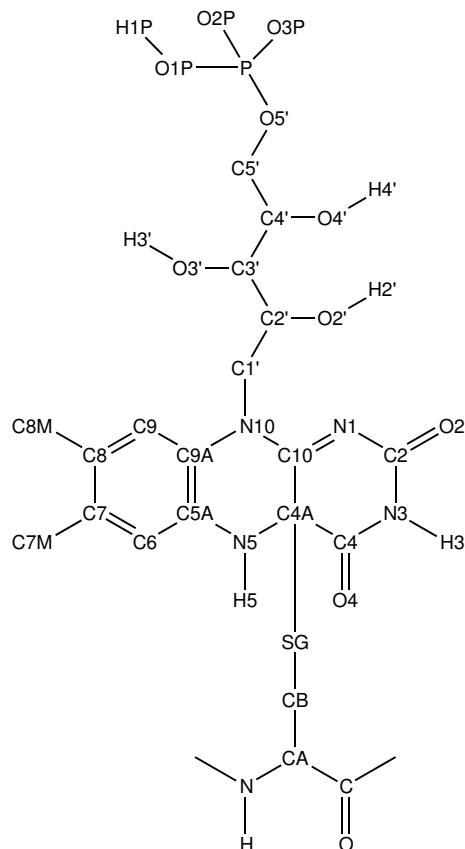


Abbildung 6.1: Verwendete Atombezeichner für Cysteinyl-FMN „CFN“.

Anhang

denen keine nichtbindenen (also van-der-Waals- und Coulomb-) Wechselwirkungen berechnet werden. Es handelt sich dabei um alle 1-4-Paare, bei denen sich mindestens eines im Ringgerüst befindet, außerdem solche mit H1P (Wasserstoff an der Phosphatgruppe), analog zur Parametrisierung von FMN. Die übrigen Abschnitte geben die Bindungs- (Abschnitt [bonds]), Winkel- (Abschnitt [angles]), Diederwinkel- (Abschnitt [dihedrals]), und uneigentlichen Diederwinkel-Parameter (Abschnitt [impropers]) an. Dabei sind jeweils die beteiligten Atome angegeben gefolgt von einem Parameterkürzel. Die Parameter sind in der Datei `ffG43a1bon.itp` aufgeschlüsselt.

```
; newly added amino acid "cysteinyl-flavin"
[CFN]
[atoms]
N      N      -0.280  0
H      H      0.280  0
CA     CH1    0.000  1
CB     CH2    0.000  1
SG     S      0.130  2
C4A    C      -0.130 2
C4     C      0.380  3
O4     O      -0.380 3
N3     NR     -0.280 4
H3     H      0.280  4
C2     C      0.380  5
O2     O      -0.380 5
N1     NR     -0.360 6
C10    C      0.360  6
N5     N      -0.450 7
H5     H      0.300  7
C5A    C      0.150  7
C6     CR1   0.000  8
C7     C      0.000  9
C7M    CH3   0.000  9
C8     C      0.000 10
C8M    CH3   0.000 10
C9     CR1   0.000 11
C9A    C      0.200 12
N10    NR    -0.200 12
C1'    CH2   0.000 13
H2'    H      0.398 14
O2'    OA    -0.548 14
C2'    CH1   0.150 14
```

H3' H 0.398 15
O3' OA -0.548 15
C3' CH1 0.150 15
H4' H 0.398 16
O4' OA -0.548 16
C4' CH1 0.150 16
C5' CH2 0.150 17
O5' OA -0.360 17
P P 0.630 17
O1P OA -0.548 17
H1P H 0.398 17
O2P OM -0.635 17
O3P OM -0.635 17
C C 0.380 18
O O -0.380 18
[bonds]
N H gb_2
N CA gb_20
CA C gb_26
C O gb_4
C +N gb_9
CA CB gb_26
CB SG gb_30
SG C4A gb_30
C9A N10 gb_16
C9A C5A gb_15
C9A C9 gb_15
N10 C10 gb_16
N10 C1' gb_22
C10 N1 gb_11
C10 C4A gb_15
N1 C2 gb_11
C2 O2 gb_4
C2 N3 gb_16
N3 H3 gb_2
N3 C4 gb_16
C4 O4 gb_4
C4 C4A gb_15
C4A N5 gb_10
N5 C5A gb_10
N5 H5 gb_2
C5A C6 gb_15

Anhang

```
C6    C7      gb_15
C7    C7M     gb_26
C7    C8      gb_15
C8    C8M     gb_26
C8    C9      gb_15
C1'   C2'     gb_26
C2'   O2'     gb_17
C2'   C3'     gb_26
O2'   H2'     gb_1
C3'   O3'     gb_17
C3'   C4'     gb_26
O3'   H3'     gb_1
C4'   O4'     gb_17
C4'   C5'     gb_26
O4'   H4'     gb_1
C5'   O5'     gb_17
O5'   P       gb_27
P     O1P     gb_27
P     O2P     gb_23
P     O3P     gb_23
O1P   H1P     gb_1
[exclusions ]
;  ai      aj
C9A   N1
C9A   C4A
C9A   C7
C9A   C8M
N10   C2
N10   C4
N10   N5
N10   C6
N10   C8
C10   O2
C10   N3
C10   O4
C10   C5A
C10   C9
N1    H3
N1    C4
N1    N5
N1    C1'
C2    O4
```

C2 C4A
O2 H3
O2 C4
N3 N5
H3 O4
H3 C4A
C4 C5A
O4 N5
C4A C6
C4A C1'
N5 C7
N5 C9
C5A C7M
C5A C8
C5A C1'
C6 C8M
C6 C9
C7M C8M
C7M C9
C9 C1'
O5' H1P
H1P O2P
H1P O3P
H5 C6
H5 C9A
H5 SG
H5 C10
H5 C4
SG N10
SG N1
SG N3
SG O4
SG C5A
[angles]
-C N H ga_31
H N CA ga_17
-C N CA ga_30
N CA C ga_12
CA C +N ga_18
CA C O ga_29
O C +N ga_32
N CA CB ga_12

Anhang

C	CA	CB	ga_12
CA	CB	SG	ga_15
CB	SG	C4A	ga_3
SG	C4A	C4	ga_12
SG	C4A	N5	ga_12
SG	C4A	C10	ga_12
C4A	C10	N1	ga_26
N10	C9A	C5A	ga_26
N10	C9A	C9	ga_26
C5A	C9A	C9	ga_26
C9A	N10	C10	ga_26
C9A	N10	C1'	ga_26
C10	N10	C1'	ga_26
N10	C10	N1	ga_26
N10	C10	C4A	ga_26
N1	C10	C4A	ga_26
C10	N1	C2	ga_26
N1	C2	O2	ga_26
N1	C2	N3	ga_26
O2	C2	N3	ga_26
C2	N3	H3	ga_24
C2	N3	C4	ga_26
H3	N3	C4	ga_24
N3	C4	O4	ga_26
N3	C4	C4A	ga_26
O4	C4	C4A	ga_26
C10	C4A	C4	ga_12
C10	C4A	N5	ga_12
C4	C4A	N5	ga_12
C4A	N5	C5A	ga_26
C9A	C5A	N5	ga_26
C9A	C5A	C6	ga_26
N5	C5A	C6	ga_26
C4A	N5	H5	ga_24
H5	N5	C5A	ga_24
C5A	C6	C7	ga_26
C6	C7	C7M	ga_26
C6	C7	C8	ga_26
C7M	C7	C8	ga_26
C7	C8	C8M	ga_26
C7	C8	C9	ga_26
C8M	C8	C9	ga_26

C9A	C9	C8	ga_26	
N10	C1'	C2'	ga_14	
C1'	C2'	O2'	ga_14	
C1'	C2'	C3'	ga_14	
O2'	C2'	C3'	ga_12	
C2'	O2'	H2'	ga_11	
C2'	C3'	O3'	ga_12	
C2'	C3'	C4'	ga_14	
O3'	C3'	C4'	ga_12	
C3'	O3'	H3'	ga_11	
C3'	C4'	O4'	ga_12	
C3'	C4'	C5'	ga_14	
O4'	C4'	C5'	ga_14	
C4'	O4'	H4'	ga_11	
C4'	C5'	O5'	ga_14	
C5'	O5'	P	ga_25	
O5'	P	O1P	ga_4	
O5'	P	O2P	ga_13	
O5'	P	O3P	ga_13	
O1P	P	O2P	ga_13	
O1P	P	O3P	ga_13	
O2P	P	O3P	ga_28	
P	O1P	H1P	ga_11	
[impropers]				
N	-C	CA	H	gi_1
C	CA	+N	O	gi_1
CA	N	C	CB	gi_2
C2	N1	N3	O2	gi_1
N3	C2	C4	H3	gi_1
C4	N3	C4A	O4	gi_1
C4A	C4	N5	C10	gi_2
N5	C5A	H5	C4A	gi_2
C4A	N5	SG	C10	gi_2
C4A	C10	SG	C4	gi_2
C10	N1	N10	C4A	gi_1
N10	C9A	C5A	N5	gi_1
C5A	N5	C6	C9A	gi_1
C9A	N10	C9	C5A	gi_1
C5A	C6	C7	C8	gi_1
C6	C7	C8	C9	gi_1
C7	C8	C9	C9A	gi_1
C8	C9	C9A	C5A	gi_1

Anhang

```
C9    C9A   C5A    C6    gi_1
C9A   C5A   C6    C7    gi_1
C7    C6    C8    C7M   gi_1
C8    C7    C9    C8M   gi_1
C2'   O2'   C3'   C1'   gi_2
C3'   O3'   C4'   C2'   gi_2
C4'   O4'   C5'   C3'   gi_2
[dihedrals]
-CA   -C     N     CA    gd_4
-C    N     CA    C     gd_19
N     CA    C     +N    gd_20
N     CA    CB    SG    gd_17
CA    CB    SG    C4A   gd_13
CB    SG    C4A   C4    gd_13
C10   C4A   C4    O4    gd_5
C4    C4A   C10   N1    gd_5
O4    C4    N3    C2    gd_4
C4    N3    C2    O2    gd_4
O2    C2    N1    C10   gd_4
C2    N1    C10   N10   gd_4
C10   C4A   N5    C5A   gd_4
C4A   N5    C5A   C9A   gd_4
C5A   C9A   N10   C10   gd_4
C9A   N10   C10   C4A   gd_4
C9A   N10   C1'   C2'   gd_20
N10   C1'   C2'   C3'   gd_17
C1'   C2'   O2'   H2'   gd_12
C1'   C2'   C3'   C4'   gd_17
C2'   C3'   O3'   H3'   gd_12
C2'   C3'   C4'   C5'   gd_17
C3'   C4'   O4'   H4'   gd_12
C3'   C4'   C5'   O5'   gd_17
C4'   C5'   O5'   P     gd_14
C5'   O5'   P     O1P   gd_11
C5'   O5'   P     O1P   gd_9
O5'   P     O1P   H1P   gd_11
O5'   P     O1P   H1P   gd_9
```

Außerdem muss ein Eintrag in der Wasserstoff-Datenbank **ffG43a1.hdb** gemacht werden, in der festgelegt wird, wo und wie eventuell fehlende H-Atome ergänzt werden. Zur Erläuterung der Syntax siehe [124].

CFN	7			
1	2	O2'	C2'	C1'
1	2	O3'	C3'	C2'
1	2	O4'	C4'	C3'
1	2	O1P	P	O5'
1	1	N3	C2	C4
1	2	N5	C5A	C9A
1	1	N	-C	CA

Literaturverzeichnis

- [1] C. Fankhauser, *J. Biol. Chem.* **276** (2001), 11453.
- [2] A. Batschauer, *Planta* **206** (1998), 479.
- [3] M. Ahmad, *Curr. Op. Plant Biol.* **2** (1999), 230.
- [4] C. Lin, *Trends in Plant Science* **5** (2000), 337.
- [5] T. W. Short, M. Porst, J. Palmer, E. Fernbach, und W. R. Briggs, *Plant Physiol.* **104** (1994), 1317.
- [6] E. P. Huala, P. W. Oeller, E. Liscum, I.-S. Han, E. Larsen, und W. R. Briggs, *Science* **278** (1997), 2120.
- [7] W. R. Briggs, C. F. Beck, A. R. Cashmore, J. M. Christie, J. Hughes, J. A. Jarillo, T. Kawaga, H. Kanegae, E. Liscum, A. Nagatani, K. Okada, M. Salomon, W. Rüdiger, T. Sakai, M. Takano, M. Wada, und J. C. Watson, *Plant Cell* **13** (2001), 993.
- [8] W. R. Briggs, J. M. Christie, und M. Salomon, *Antioxid. Redox. Signal.* **3** (2001), 775.
- [9] J. M. Christie, P. Reymond, G. K. Powell, P. Bernasconi, A. A. Raibekas, E. Liscum, und W. R. Briggs, *Science* **282** (1998), 1698.
- [10] T. Kinoshita, M. Doi, N. Suetsugu, T. Kagawa, M. Wada, und K. I. Shimazaki, *Nature* **414** (2001), 656 .
- [11] J. A. Jarillo, H. Gabrys, J. Capel, J. M. Alonso, J. R. Ecker, und A. R. Cashmore, *Nature* **410** (2001), 952.
- [12] T. Kagawa, T. Sakai, N. Suetsugu, K. Oikawa, S. Ishiguro, T. Kato, S. Tabata, K. Okada, und M. Wada, *Science* **291** (2001), 2138.
- [13] J. M. Christie, M. Salomon, K. Nozue, M. Wada, und W. R. Briggs, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96** (1999), 8779.

LITERATURVERZEICHNIS

- [14] J. M. Christie, T. E. Swartz, R. A. Bogomolni, und W. R. Briggs, *Plant J.* **32** (2002), 205.
- [15] S. Crosson und K. Moffat, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98** (2001), 2995.
- [16] M. Salomon, J. M. Christie, E. Knieb, U. Lempert, und W. R. Briggs, *Biochemistry* **39** (2000), 9401.
- [17] S. Crosson und K. Moffat, *Plant Cell* **14** (2002), 1067.
- [18] R. Fedorov, I. Schlichting, E. Hartmann, T. Domratcheva, M. Fuhrmann, und P. Hegemann, *Biophys. J.* **84** (2003), 2474.
- [19] T. Kottke, J. Heberle, D. Hehn, B. Dick, und P. Hegemann, *Biophys. J.* **84** (2003), 1192.
- [20] T. E. Swartz, S. B. Corchnoy, J. M. Christie, J. W. Lewis, I. Szundi, W. R. Briggs, und R. A. Bogomolni, *J. Biol. Chem.* **276** (2001), 36493.
- [21] M. Salomon, W. Eisenreich, H. Dürr, E. Schleicher, E. Knieb, V. Massey, W. Rüdiger, F. Müller, A. Bacher, und G. Richter, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98** (2001), 12357.
- [22] T. E. Swartz, P. J. Wenzel, S. B. Corchnoy, W. R. Briggs, und R. A. Bogomolni, *Biochemistry* **41** (2002), 7183.
- [23] C. W. M. Kay, E. Schleicher, A. Kuppig, H. Hofner, W. Rüdiger, M. Schleicher, M. Fischer, A. Bacher, S. Weber, und G. Richter, *J. Biol. Chem.* **278** (2003), 10973.
- [24] C. Neiß und P. Saalfrank, *Photochem. Photobiol.* **77** (2003), 101.
- [25] A. Szabo und N. S. Ostlund, *Modern Quantum Chemistry* (Macmillan Publishing Co., Inc., New York, 1982).
- [26] G. te Velde, F. Bickelhaupt, E. Baerends, C. F. Guerra, S. van Gisbergen, J. Snijders, und T. Ziegler, *J. Comp. Chem.* **22** (2001), 931.
- [27] F. Jensen, *Introduction to Computational Chemistry* (John Wiley & Sons, New York, 1999).
- [28] J. B. Foresman, M. Head-Gordon, J. A. Pople, und M. J. Frisch, *J. Phys. Chem.* **96** (1992), 135.
- [29] D. Maurice und M. Head-Gordon, *Int. J. Quantum Chem. Symp.* **29** (1995), 361.

LITERATURVERZEICHNIS

- [30] J. Ivanic und K. Ruedenberg, *Theor. Chem. Acc.* **106** (2001), 339.
- [31] T. Bally und W. T. Borden, *Rev. Comp. Chem.* **13** (1999), 1.
- [32] R. G. Parr und W. Yang, *Density Functional Theory of Atoms and Molecules* (Oxford, 1989).
- [33] P. Hohenberg und W. Kohn, *Phys. Rev.* **136** (1964), B864.
- [34] W. Kohn und L. J. Sham, *Phys. Rev.* **140** (1965), A1133.
- [35] W. Kohn, *Phys. Rev. Lett.* **51** (1983), 1596.
- [36] M. Levy, *Phys. Rev. A* **26** (1982), 1200.
- [37] E. J. Baerends, *Theor. Chem. Acc.* **103** (2000), 265.
- [38] A. Becke, *J. Chem. Phys.* **98** (1993), 5648.
- [39] A. Becke, *J. Chem. Phys.* **98** (1993), 1372.
- [40] A. Schäfer, H. Horn, und R. Ahlrichs, *J. Chem. Phys.* **97** (1992), 2751.
- [41] B. G. Johnson, P. M. W. Gill, und J. A. Pople, *J. Chem. Phys.* **98** (1993), 5612.
- [42] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, V. G. Zakrzewski, J. A. Montgomery, J. R. E. Stratmann, J. C. Burant, S. Dapprich, J. M. Millam, A. D. Daniels, K. N. Kudin, M. C. Strain, O. Farkas, J. Tomasi, V. Barone, M. Cossi, R. Cammi, B. Mennucci, C. Pomelli, C. Adamo, S. Clifford, J. Ochterski, G. A. Petersson, P. Y. Ayala, Q. Cui, K. Morokuma, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. Cioslowski, J. V. Ortiz, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. Gomperts, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, C. Gonzalez, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, J. L. Andres, C. Gonzalez, M. Head-Gordon, E. S. Replogle, und J. A. Pople, *Gaussian 98, Revision A.7* (Gaussian Inc., Pittsburgh PA, 1998).
- [43] J. A. Pople, P. M. W. Gill, und N. C. Handy, *Int. J. Quant. Chem.* **56** (1995), 303.
- [44] J. Wang, A. D. Becke, und J. V. H. Smith, *J. Chem. Phys.* **102** (1995), 3477.
- [45] J. M. Wittbrodt und H. B. Schlegel, *J. Chem. Phys.* **105** (1996), 6574.

LITERATURVERZEICHNIS

- [46] J. P. Perdew, M. Ernzerhof, K. Burke, und A. Savin, *J. Quant. Chem.* **61** (1997), 197.
- [47] J. Gräfenstein, E. Kraka, M. Filatov, und D. Cremer, *Int. J. Mol. Sci.* **3** (2002), 360.
- [48] S. Grimme, *Chem. Phys. Lett.* **259** (1996), 128.
- [49] E. Runge und E. K. U. Gross, *Phys. Rev. Lett.* **52** (1984), 997.
- [50] M. E. Casida, in *Recent Advances in Density Functional Methods*, (Hg. D. P. Chong), Bd. 1 (World Scientific, 1995) S. 155–192.
- [51] M. E. Casida, C. Jamorski, K. C. Casida, und D. R. Salahub, *J. Chem. Phys.* **108** (1998), 4439.
- [52] M. Petersilka, U. J. Gossman, und E. K. U. Gross, *Phys. Rev. Lett.* **76** (1996), 1212.
- [53] R. E. Stratmann, G. Scuseria, und M. J. Frisch, *J. Chem. Phys.* **109** (1998), 8218.
- [54] A. Görling, H. H. Heinze, S. P. Ruzankin, und M. Staufer, *J. Chem. Phys.* **110** (1999), 2785.
- [55] C. V. Caillie und R. D. Amos, *Chem. Phys. Lett.* **308** (1999), 249.
- [56] C. V. Caillie und R. D. Amos, *Chem. Phys. Lett.* **317** (2000), 159.
- [57] F. Furche und R. Ahlrichs, *J. Chem. Phys.* **117** (2002), 7433.
- [58] C. Neiss, P. Saalfrank, M. Parac, und S. Grimme, *J. Phys. Chem. A* **107** (2003), 140.
- [59] P. R. T. Schipper, O. V. Gritsenko, und E. J. Baerends, *Theor. Chem. Acc.* **99** (1999), 329.
- [60] R. Singh und B. M. Deb, *Phys. Rep.* **311** (1999), 47.
- [61] J. Gräfenstein und D. Cremer, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2** (2000), 2091.
- [62] E. Gross, L. N. Oliveira, und W. Kohn, *Phys. Rev. A* **37** (1988), 2809.
- [63] L. N. Oliveira, E. K. U. Gross, und W. Kohn, *Phys. Rev. A* **37** (1988), 2821.
- [64] S. Grimme und M. Waletzke, *J. Chem. Phys.* **111** (1999), 5645.
- [65] E. R. Davidson, *J. Comput. Phys.* **17** (1975), 87.

LITERATURVERZEICHNIS

- [66] M. Crouzeix, B. Philippe, und M. Sadkane, *J. Sci. Comput.* **15** (1994), 62.
- [67] M. Waletzke, *Implementation und Anwendung von Multireferenz-DFT und -ab initio Methoden für große Moleküle*, Dissertation, Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn (2001).
- [68] L. Onsager, *J. Am. Chem. Soc.* **58** (1936), 1486.
- [69] M. W. Wong, M. J. Frisch, und K. B. Wiberg, *J. Am. Chem. Soc.* **113** (1991), 4776.
- [70] M. Born, *Z. Phys.* **1** (1920), 45.
- [71] S. Miertuš und J. Tomasi, *Chem. Phys.* **65** (1982), 239.
- [72] J. Tomasi und M. Persico, *Chem. Rev.* **94** (1994), 2027.
- [73] S. Miertuš, E. Scrocco, und J. Tomasi, *Chem. Phys.* **55** (1981), 117.
- [74] J. B. Foresman, T. A. Keith, K. B. Wiberg, J. Snoonian, und M. J. Frisch, *J. Phys. Chem.* **100** (1996), 16098.
- [75] R. Cammi und J. Tomasi, *J. Quant. Chem.* **16** (1995), 1449.
- [76] B. Mennucci und J. Tomasi, *J. Chem. Phys.* **106** (1997), 5151.
- [77] J. L. Pascual-Ahuir und E. Silla, *J. Comp. Chem.* **11** (1990), 1047.
- [78] V. Barone, M. Cossi, und J. Tomasi, *J. Chem. Phys.* **107** (1997), 3210.
- [79] F. Silla, I. Tuñón, und J. L. Pascual-Ahuir, *J. Comp. Chem.* **12** (1991), 1077.
- [80] J. L. Pascual-Ahuir, E. Silla, und I. Tuñón, *J. Comp. Chem.* **15** (1994), 1127.
- [81] A. Klamt und G. Schüürmann, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* (1993), 799.
- [82] V. Barone und M. Cossi, *J. Phys. Chem. A* **102** (1998), 1995.
- [83] P. Flükiger, H. P. Lüthi, S. Portmann, und J. Weber, *MOLEKEL 4.1*, Swiss Center for Scientific Computing, Manno (Switzerland) (2000-2001).
- [84] L. H. Hall, B. J. Orchard, und S. K. Tripathy, *Int. J. Quant. Chem.* **31** (1987), 195.
- [85] L. H. Hall, B. J. Orchard, und S. K. Tripathy, *Int. J. Quant. Chem.* **31** (1987), 217.
- [86] L. H. Hall, M. L. Bowers, und C. N. Durfor, *Biochemistry* **26** (1987), 7401.

LITERATURVERZEICHNIS

- [87] R. J. Platenkamp, M. H. Palmer, und A. J. W. G. Visser, *Eur. Biophys. J.* **14** (1987), 393.
- [88] M. Meyer, H. Hartwig, und D. Schomburg, *J. Mol. Struct. (Theochem)* **364** (1996), 139.
- [89] Y.-J. Zheng und R. L. Ornstein, *J. Am. Chem. Soc.* **118** (1996), 9402.
- [90] M. Meyer, *J. Mol. Struct. (Theochem)* **417** (1997), 163.
- [91] J. I. García, M. Medina, J. Sancho, P. J. Alonso, C. Gómez-Moreno, J. A. Mayoral, und J. I. Martínez, *J. Phys. Chem. A* **106** (2002), 4729.
- [92] H. Kurreck, M. Bock, N. Betz, M. Elsner, H. Kraus, W. Lubitz, F. Müller, J. Geissler, und P. M. H. Kroneck, *J. Am. Chem. Soc.* **106** (1984), 737.
- [93] V. Barone, *Recent Advances in Density Functional Methods* (World Scientific Publishing, Singapore, 1995).
- [94] L. Tegnér, *Photochem. Photobiol.* **5** (1966), 223.
- [95] P.-S. Song, in *Flavins and Flavoproteins* (1971) S. 37–61.
- [96] P. Heelis, B. Parsons, G. Phillips, und J. McKellar, *Photochem. Photobiol.* **28** (1978), 169.
- [97] Y. P. Tsentalovich, J. J. Lopez, P. J. Hore, und R. Z. Sagdeev, *Spectrochim. Acta Part A* **58** (2002), 2043.
- [98] P.-S. Song, *Photochem. Photobiol.* **7** (1968), 311.
- [99] S. Schreiner, U. Steiner, und H. E. A. Kramer, *Photochem. Photobiol.* **21** (1975), 81.
- [100] J. M. Lhoste, A. Haug, und P. Hemmerich, *Biochemistry* **5** (1966), 3290.
- [101] L. B. Clark, G. Peschel, und I. Tinoco, *J. Phys. Chem.* **69** (1965), 3615.
- [102] N. Iza, M. Gil, und J. Morcillo, *J. Mol. Struct.* **175** (1988), 31.
- [103] B. B. Brady, L. A. Peteanu, und D. H. Levy, *Chem. Phys. Lett.* **147** (1988), 538.
- [104] M. Fujii, T. Tamura, N. Mikami, und M. Ito, *Chem. Phys. Lett.* **126** (1986), 583.
- [105] S. Grimme, *persönliche Mitteilung* (2001).

LITERATURVERZEICHNIS

- [106] K. H. Dudley, A. Ehrenberg, P. Hemmerich, und F. Müller, *Helv. Chim. Acta* **47** (1964), 1354.
- [107] T. Kottke, *unveröffentlichte Ergebnisse* (2001).
- [108] P. W. Atkins, *Physikalische Chemie* (VCH, Weinheim, 1994).
- [109] M. Sun, T. A. Moore, und P.-S. Song, *J. Am. Chem. Soc.* **94** (1972), 1730.
- [110] R. J. Stanley und H. Jang, *J. Phys. Chem. A* **103** (1999), 8976.
- [111] M. Abe, Y. Kyogoku, und T. Kitagawa, *Spectrochim. Acta Part A* **42** (1986), 1059.
- [112] M. Sakai und H. Takahashi, *J. Mol. Struct. (Theochem)* **379** (1996), 9.
- [113] T. B. Melø, M. A. Ionescu, G. W. Haggquist, und K. R. Naqvi, *Spectrochim. Acta Part A* **55** (1999), 2299.
- [114] *Gaussian 98 Release Notes: Rev. A.11.2* (2002).
- [115] A. Losi, E. Polverini, B. Quest, und W. Gärtner, *Biophys. J.* **82** (2002), 2627.
- [116] A. Losi, *persönliche Mitteilung* (2001).
- [117] S. M. Miller, V. Massey, D. Ballou, C. H. Williams, M. D. Distefano, M. J. Moore, und C. T. Walsh, *Biochemistry* **29** (1990), 2831.
- [118] T. Iwata, S. Tokutomi, und H. Kandori, *J. Am. Chem. Soc.* **124** (2002), 11840.
- [119] K. Ataka, P. Hegemann, und J. Heberle, *Biophys. J.* **84** (2003), 466.
- [120] S. Grimme, *persönliche Mitteilung* (2003).
- [121] G. M. Ullmann und E.-W. Knapp, *Eur. Biophys. J.* **28** (1999), 533.
- [122] C. Peng, P. Y. Ayala, H. B. Schlegel, und M. J. Frisch, *J. Comp. Chem.* **17** (1996), 49.
- [123] S. B. Corchnoy, T. E. Swartz, J. W. Lewis, I. Szundi, W. R. Briggs, und R. A. Bogomolni, *J. Biol. Chem.* **278** (2003), 724.
- [124] D. van der Spoel, A. R. V. Buuren, E. Apol, P. J. Meulenhoff, D. P. Tieleman, A. L. T. M. Sijbers, B. Hess, K. A. Feenstra, E. Lindahl, R. van Drunen, und H. J. C. Berendsen, *GROMACS User Manual, Version 3.1.1*, Department of Biophysical Chemistry, University of Groningen (Netherlands) (1991-2002).
- [125] E. Lindahl, B. Hess, und D. van der Spoel, *J. Mol. Mod.* **7** (2001), 306.

LITERATURVERZEICHNIS

- [126] H. J. C. Berendsen, D. van der Spoel, und R. van Drunen, *Comp. Phys. Comm.* **91** (1995), 43.
- [127] W. F. van Gunsteren, S. R. Billeter, A. A. Eising, P. H. Hünenberger, P. Krüger, A. E. Mark, W. R. P. Scott, und I. G. Tironi, *Biomolecular Simulation: The GROMOS96 Manual and User Guide*. (Hochschulverlag AG an der ETH Zürich, Zürich (Switzerland), 1996).
- [128] W. F. van Gunsteren und H. J. C. Berendsen, *Angew. Chem.* **102** (1990), 1020.
- [129] P. P. Ewald, *Ann. Phys.* **64** (1921), 253.
- [130] T. Darden, D. York, und L. Pedersen, *J. Chem. Phys.* **98** (1993), 10089.
- [131] U. Essmann, L. Perera, M. L. Berkowitz, T. Darden, H. Lee, und L. G. Pedersen, *J. Chem. Phys.* **103** (1995), 8577.
- [132] R. W. Hockney und S. P. Goel, *J. Comp. Phys.* **14** (1974), 148.
- [133] S. Miamoto und P. A. Kollman, *J. Comp. Chem.* **13** (1992), 952.
- [134] B. Hess, H. Bekker, H. J. C. Berendsen, und J. G. E. M. Fraaije, *J. Comp. Chem.* **18** (1997), 1463.
- [135] W. F. van Gunsteren und H. J. C. Berendsen, *Mol. Phys.* **34** (1977), 1311.
- [136] W. F. van Gunsteren und M. Karplus, *Macromolecules* **15** (1982), 1528.
- [137] H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, W. F. van Gunsteren, und J. Hermans, in *Intermolecular Forces*, (Hg. B. Pullman) (Reidel, Dorndrecht, The Netherlands, 1981) S. 331–342.
- [138] H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, A. DiNola, und J. R. Haak, *J. Chem. Phys.* **81** (1984), 3684.
- [139] B. L. de Groot, D. M. F. van Aalten, R. M. Scheek, A. Amadei, G. Vriend, und H. J. C. Berendsen, *Proteins: Struct. Funct. Gen.* **29** (1997), 240.
- [140] <http://www.mpibpc.gwdg.de/abteilungen/071/bgroot/concoord.html>.
- [141] W. Kabsch und C. Sander, *Biopolymers* **22** (1983), 2577.
- [142] S. Crosson, S. Rajagopal, und K. Moffat, *Biochemistry* **42** (2003), 2.
- [143] A. Amadei, A. B. M. Linssen, und H. J. C. Berendsen, *Proteins: Struct. Funct. Gen.* **17** (1993), 412.

LITERATURVERZEICHNIS

- [144] A. Kitao und N. Go, *Curr. Op. Struct. Biol.* **9** (1999), 164.
- [145] B. Hess, *Phys. Rev. E* **62** (2000), 8438.
- [146] B. Hess, *Phys. Rev. E* **65** (2002), 031910.
- [147] M. A. Balsera, W. Wriggers, Y. Oono, und K. Schulten, *J. Phys. Chem.* **100** (1996), 2567.
- [148] J. T. M. Kennis, S. Crosson, M. Gauden, I. H. M. van Stokkum, K. Moffat, und R. van Grondelle, *Biochemistry* **42** (2003), 3385.
- [149] P. Hegemann und M. Merrow, *persönliche Mitteilung* (2003).
- [150] S. Dapprich, I. Komáromi, K. S. Byun, K. Morokuma, und M. J. Frisch, *J. Mol. Struct. (Theochem)* **461-462** (1999), 1.
- [151] M. Torrent, T. Vreven, D. G. Musaev, K. Morokuma, O. Farkas, und H. B. Schlegel, *J. Am. Chem. Soc.* **124** (2002), 192.
- [152] T. Vreven und K. Morokuma, *Theor. Chem. Acc.* **109** (2003), 125.

Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich diese Arbeit selbst verfaßt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Alle aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

Regensburg, September 2003

.....
(Christian Neiß)