

Technische Universität München
Fakultät für Physik
Physikdepartment T 38

Theorie pH-induzierter Konformations- und
Protonierungsänderungen mit Anwendung auf das
Grün Fluoreszierende Protein

Robert Raupp-Kossmann

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Physik der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. F. G. Parak

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. S. Fischer
2. Univ.-Prof. Dr. J. Friedrich

Die Dissertation wurde am 9. 10. 2002 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Physik am 6. 12. 2002 angenommen.

Für Elisabeth

*Wahr sind auch die Erinnerungen, die wir
mit uns tragen: die Träume, die wir spinnen,
und die Sehnsüchte, die uns treiben. Damit
wollen wir uns bescheiden.*

Die Feuerzangenbowle
H. SPOERL

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-------------|
| Inhaltsverzeichnis | vii |
| Abbildungsverzeichnis | xi |
| Tabellenverzeichnis | xiii |
| 1 Einleitung | 1 |
| 2 Grundlagen | 7 |
| 2.1 Ionisierungsgleichgewichte | 7 |
| 2.2 Ionisierungsgleichgewichte in Proteinen | 9 |
| 2.2.1 Protonierung in starrer Proteinstruktur | 10 |
| 2.2.2 Erweiterung auf flexible Konformationen | 13 |
| 2.3 Zusammenhang zwischen den freien Energien | 14 |
| 2.4 Beschreibung der Proteinstruktur | 15 |
| 3 Statistische Mechanik | 19 |
| 3.1 Titrationskurven und Gittergas | 19 |
| 3.1.1 Definition des Modells | 19 |
| 3.1.2 Anwendung auf Ionisierungsgleichgewichte | 21 |
| 3.2 Statistische Mechanik für das Protein | 22 |
| 3.2.1 Energiezustände | 22 |
| 3.2.2 Zustandssumme des Proteins | 24 |
| 3.2.3 Titrationskurve eines Proteins | 27 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 3.2.4 | Titrationenkurve einzelner Residuen | 27 |
| 3.2.5 | pH-Abhängigkeit anderer Größen | 29 |
| 3.2.6 | Verteilung der Protonierungszustände | 29 |
| 3.2.7 | Verwendung von Modell-pK _a 's | 32 |
| 3.3 | Anormale Titrationskurven | 37 |
| 4 | Modellierung von Proteinen | 45 |
| 4.1 | Wechselwirkungsterme | 45 |
| 4.1.1 | Bindungsenergien | 45 |
| 4.1.2 | Elektronische Struktur | 46 |
| 4.1.3 | VAN DER WAALS-Energien | 48 |
| 4.2 | Kontinuumselktrostatik | 49 |
| 4.2.1 | POISSON-BOLTZMANN-Gleichung | 51 |
| 4.2.2 | Verfahren finiter Differenzen (DelPhi) | 52 |
| 4.2.3 | Dielektrizitätskonstante des Proteins | 54 |
| 4.3 | Erzeugen und Analysieren von Proteinstrukturen | 56 |
| 4.3.1 | Hypothetische Strukturen | 57 |
| 4.3.2 | Positionieren der Protonen | 58 |
| 4.3.3 | Monte-Carlo-Methode | 60 |
| 4.3.4 | Näherung der Zustandssummen | 62 |
| 5 | Praktische Anwendung | 63 |
| 5.1 | Grün Fluoreszierendes Protein | 63 |
| 5.1.1 | Strukturelle Eigenschaften des GFP | 64 |
| 5.1.2 | Der Fluorophor | 64 |
| 5.1.3 | Photophysik | 65 |
| 5.2 | Parametrisierung des Fluorophors | 68 |
| 5.2.1 | Partiellladungen | 68 |
| 5.2.2 | Bestimmung der Modell-pK _a s im Grundzustand | 69 |
| 5.2.3 | pK _a -Werte im angeregten Zustand | 73 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 5.3 | Erzeugung der hypothetischen Strukturen | 75 |
| 5.3.1 | Konformationen von Aminosäuren | 75 |
| 5.3.2 | Orte der Wassermoleküle | 79 |
| 5.4 | Berechnung der Wechselwirkungsenergien | 80 |
| 5.4.1 | Elektrostatische Energien | 80 |
| 5.4.2 | VAN DER WAALS- und Bindungsenergien | 82 |
| 5.4.3 | Ergänzung und Modifikation von Parametern | 83 |
| 5.4.4 | Energieformel für das Modellsystem | 88 |
| 5.5 | Untersuchung eines Systems mit wenigen KP-Zuständen | 88 |
| 5.5.1 | Abhängigkeit von Ladungsparametern | 90 |
| 5.5.2 | Konformationen und Protonierungen | 100 |
| 5.6 | Untersuchung des Systems mit vielen KP-Zuständen | 104 |
| 5.6.1 | Einfache MC-Simulationen | 104 |
| 5.6.2 | Bestimmung der \mathcal{M} -Teilchen-Zustandssummen | 107 |
| 5.6.3 | Angeregter Zustand | 116 |
| 6 | Zusammenfassung und Ausblick | 121 |
| A | Aminosäuren | 129 |
| B | Abkürzungen | 131 |
| C | Einheiten | 135 |
| D | Danksagung | 137 |
| | Literaturverzeichnis | 139 |

Abbildungsverzeichnis

| | | |
|-----|--|----|
| 2.1 | Protonierung einer Carboxylgruppe. | 9 |
| 2.2 | Thermodynamischer Zyklus. | 11 |
| 2.3 | Definition interner Koordinaten. | 16 |
| 3.1 | Gittergas | 19 |
| 3.2 | Graph für die Protonierungszustände dreier Residuen | 30 |
| 3.3 | Baum des Graphen für drei Residuen | 31 |
| 3.4 | Alternativer Baum des Graphen für drei Residuen | 32 |
| 3.5 | Struktur des GFP Fluorophors. | 36 |
| 3.6 | Anormales Titrationsverhalten zweier protonierbarer Gruppen für verschiedene Parameter. | 39 |
| 3.7 | Reaktionsschema einer zweibasigen Säure. | 39 |
| 3.8 | Näherungen an die anormale Titrationskurve und Protonierung beider Gruppen. | 40 |
| 4.1 | Kontinuumsmodell für das Protein-Lösungsmittel-System. | 50 |
| 4.2 | Zur Superponierbarkeit der POISSON-BOLTZMANN-Gleichung. | 54 |
| 4.3 | Definition von Wasserstoffbrückenparametern. | 59 |
| 5.1 | Chromophor des GFP, Definition der Atomnamen. | 64 |
| 5.2 | Protonierungszustände des GFP-Chromophors. | 65 |
| 5.3 | Anregungsspektrum des GFP. | 66 |
| 5.4 | Reaktionsschema für Protonentransfer. | 67 |
| 5.5 | pH-abhängiges Fluoreszenzemissionsspektrum des GFP. | 68 |

| | | |
|------|---|-----|
| 5.6 | Aufbereitung der Daten aus den Röntgenstrukturen. | 76 |
| 5.7 | Dissoziationsschemata für HBI und Histidin. | 87 |
| 5.8 | Struktur der Chromophorumgebung im GFP. | 91 |
| 5.9 | Kleiner Satz: Protonierung von Y66 und E222 und Konformationen von T203. | 94 |
| 5.10 | Kleiner Satz: Verschiedene KP-Zustände. | 98 |
| 5.11 | Protonierungszustände von Y66 und E222 bei unterschiedlichen Konformationen von T203. | 100 |
| 5.12 | Orientierung polarer Gruppen von T203 und Y66. | 101 |
| 5.13 | Besetzung einiger KP-Zuständen in der hypothetischen S65T Mutante. | 103 |
| 5.14 | Titrationen von Y66 und E222 aus MC-Simulationen des kleinen Satzes. | 105 |
| 5.15 | Mit MC-Simulationen berechnete Titrationskurven von Y66 und E222. | 106 |
| 5.16 | Mit der ProTikKS-Methode berechnete Titrationskurven von Y66 und E222. | 109 |
| 5.17 | Graphische Definition von Verteilungsparametern für pH-abhängige Kurven. | 110 |
| 5.18 | Vergleich zwischen der Zahl angebotener und besetzter Zustände. | 112 |
| 5.19 | Korrelationsgraph für das Modellsystem. | 115 |
| 5.20 | Beispiele für indirekt entstehende lineare Korrelationen. | 116 |
| 5.21 | Titrationen von HET und E222 im angeregten Zustand des HBI. | 118 |
| 5.22 | Baum zur Berechnung von Protonierungswahrscheinlichkeiten. | 120 |

Tabellenverzeichnis

| | | |
|------|---|-----|
| 4.1 | Energiefunktionen für gebundene Atome. | 46 |
| 5.1 | Berechnete Partialladungen des GFP Chromophors. | 69 |
| 5.2 | Berechnete pK_a -Werte des HBI im Grundzustand. | 72 |
| 5.3 | Berechnete pK_a -Werte des HBI im angeregten Zustand. | 74 |
| 5.4 | Verwendete Röntgenstrukturen. | 75 |
| 5.5 | Verwendete Residuen und Zahl angebotener und besetzter Zustände. | 78 |
| 5.6 | Parameter für DelPhi-Rechnungen | 81 |
| 5.7 | Solvatisierungsenergien und pK_a -Werte der einzelnen Residuen. | 83 |
| 5.8 | Verwendete Partialladungen für Histidin und Tyrosin. | 85 |
| 5.9 | Mögliche Wasserstoffbrücken in der Chromophorumgebung des GFP. | 90 |
| 5.10 | Energien der einzelnen KP-Zustände mit Parse- und CHARMM-Parametern. | 93 |
| 5.11 | Kleiner Satz: pK_a -Werte von Y66 und E222. | 95 |
| 5.12 | Konformationen einiger polarer Gruppen. | 96 |
| 5.13 | Vergleiche von Paarwechselwirkungen einzelner Residuen. | 99 |
| 5.14 | Mit MC-Simulationen berechnete pK_a -Werte von Y66 und E222. | 106 |
| 5.15 | Mit unterschiedlich vielen Zuständen berechnete pK_a -Werte von Y66 und E222. | 107 |
| 5.16 | Mit der ProTikKS-Methode berechnete pK_a -Werte von Y66 und E222. | 109 |
| 5.17 | Verteilungsparameter einiger KP-Zustände. | 111 |
| 5.18 | pK_a -Werte der anderen Residuen. | 113 |

| | | |
|------|---|-----|
| 5.19 | Berechnete pK_a -Werte für HET und E222 im angeregten Zustand des HBI. | 117 |
| 5.20 | Mikroskopische pK_a -Werte der Residuen und Protonierungswahr- scheinlichkeiten. | 120 |

Kapitel 1

Einleitung

„Drei der vier uns bekannten Kräfte sind für die meisten Aspekte molekularer und zellulärer Biologie irrelevant; die vierte wurde von den meisten Biologen bis vor kurzem ignoriert.“
S. McLaughlin [1]

Tatsächlich werden nahezu alle biochemischen Prozesse von elektrostatischen Wechselwirkungen dominiert. Struktur und Dynamik von Proteinen werden entscheidend durch sie beeinflusst. Auch die Wechselwirkungen zwischen Hormonen und ihren Rezeptoren oder Enzymen und zugehörigen Substraten sind von den elektrostatischen Kräften zwischen den beteiligten Molekülen abhängig [2].

Proteine sind aus Aminosäuren zusammengesetzt, von denen einige Seitengruppen besitzen, die Protonen aufnehmen oder abgeben können. Mit solchen Dissoziationsreaktionen ist eine Veränderung des Ladungszustandes von Proteinen verbunden. Da der Protonierungszustand der Aminosäuren von der Protonenkonzentration (dem pH-Wert) der Umgebung abhängt, kontrolliert dieser die elektrostatische Struktur von Proteinen. Während Enzyme so aufgebaut sind, daß sie in dem normalen pH-Bereich ihrer nativen Umgebung optimal arbeiten, beteiligen sich andere Proteine aktiv am gerichteten Transport von Wasserstoffionen durch Zellmembranen [3]. Sie leisten damit einen wichtigen Beitrag zur Energieumwandlung in biologischen Systemen. Beispielsweise nutzen Mitochondrien Energie, die aus der Oxidation von Fettsäuren gewonnen wird, zum Aufbau eines Protonengradienten, der wiederum die Bildung von Adenosintriphosphat ermöglicht [3].

Das Beispiel des Bakteriorhodopsins (BR) [4] zeigt, daß auch durch Lichtenergie direkt ein Protonengradienten erzeugt werden kann. Im Gegensatz zum Protonentransport in den Mitochondrien, der von mehreren Proteinen bewerkstelligt wird, arbeitet das BR alleine als Protonenpumpe. Es reagiert auf Lichteinstrahlung mit Konformationsänderungen, die den Transport eines Protons zur Folge haben.

Wegen ihrer physiologischen Relevanz ist die Elektrostatik ein wesentlicher Forschungsbereich auf Gebieten wie der Biophysik, der physikalischen Chemie und der Molekularbiologie. Wir wollen uns in dieser Arbeit speziell mit der Verteilung von Protonen in Proteinen befassen. Diese Verteilung wird durch die Gleichgewichtskonstanten für die Dissoziationsreaktionen (pK_a -Werte) in Proteinen charakterisiert. Aus diesen pK_a -Werten können aber nicht nur die Gleichgewichtsverteilungen berechnet werden. Sie bilden auch die Grundlage zur Berechnung der treibenden Kräfte für Protonentransferprozesse.

Proteine liegen nicht in einer starren Struktur vor, sondern können unterschiedliche Konformationszustände (K-Zustände) einnehmen. Die Verteilung dieser Zustände hängt ebenso wie die der Protonierungszustände (P-Zustände) von der Temperatur ab. Neben der Theorie der Elektrostatik, die Wechselwirkungsenergien für unterschiedliche K- und P-Zustände (KP-Zustände) beschreibt, benötigen wir daher zur Beschreibung von Proteinen auch Methoden der statistischen Mechanik.

Debye und Hückel [5] haben 1923 die Elektrostatik von Ionenverteilungen im Lösungsmittel mit deren statistischer Mechanik in Verbindung gesetzt. In der nach ihnen benannten Theorie wird der Einfluß der Ionenkonzentration im Lösungsmittel auf das elektrostatische Potential über den BOLTZMANNfaktor in die POISSONGleichung eingeführt. Die so erweiterte Grundgleichung der Elektrostatik wird häufig als POISSON-BOLTZMANN-Gleichung bezeichnet. Diese ist bis heute die Grundlage für Rechnungen zur Proteinelektrostatik (z. B. [6, 7]).

Aufbauend auf dieser Theorie, hat Linderstrøm-Lang 1924 ein erstes Modell für das Titrationsverhalten von Proteinen veröffentlicht [8]. Er beschreibt ein Protein als Kugel mit niedriger Dielektrizitätskonstante. Das umgebende Lösungsmittel wird durch eine hohe Dielektrizitätskonstante modelliert und dringt nicht in das Protein ein. Die mittlere Ladung des Proteins repräsentiert er als kontinuierliche Oberflächenladung auf der Kugel.

Aufgrund der kontinuierlichen Ladungsverteilung ist mit diesem Modell nur eine Aussage über das mittlere Protonierungsverhalten des gesamten Proteins möglich. Wir könnten diese Theorie daher als „makroskopisch“ bezeichnen. Den ersten Schritt zur „mikroskopischen“ Beschreibung des Titrationsverhaltens von Proteinen machten Tanford und Kirkwood 1957 [9]. Sie modellieren die Ladung des Proteins nicht als Flächenladung, sondern plazieren diskrete Punktladungen auf der Kugeloberfläche des Modellproteins. Auf diese Weise wird es möglich, das Verhalten einzelner Residuen abhängig von ihrem Ort auf der Proteinoberfläche zu untersuchen.

Die mittlere Protonierung der einzelnen Gruppen kann aus der großkanonischen Zustandssumme des Systems berechnet werden. Bei der Beschreibung biologischer Systeme ist es meist nicht mehr möglich, die Zustandssummen exakt zu

berechnen. Dann muß entweder die Zustandssumme genähert oder thermodynamische Mittelwerte müssen durch ein Abtasten („Sampeln“) des Konfigurationsraumes ermittelt werden. Da in diese Zustandssumme der pH-Wert eingeht, ist es notwendig, für jeden pH-Wert die Energien für alle Protonierungszustände aller Residuen zu berechnen, um Titrationskurven zu erhalten.

Zur Lösung dieses Problems schlugen Tanford und Roxby 1972 [10] ein iteratives Verfahren vor. Dieses beruht auf der Annahme, daß die mittlere Ladung einer Gruppe durch die mittleren Ladungen aller anderen titrierbaren Residuen bestimmt wird. Wenn die Gruppen im Protein unabhängig voneinander protonieren, ist dieses Verfahren schnell und liefert Werte in guter Übereinstimmung mit Experimenten. Liegt aber ein „anormales“ Titrationsverhalten vor, wie wir es in Abschnitt 3.3 diskutieren werden, ist diese Näherung nicht mehr geeignet [11].

Heute werden die meisten Rechnungen zu Ionisierungsgleichgewichten in Proteinen mit Hilfe von Monte-Carlo-Methoden (MC-Methoden) durchgeführt. In den Referenzen [12] und [13] findet sich ein Überblick der aktuellen Methoden. Die Beschreibung der Kontinuumselektrostatik geschieht in diesen Modellen durch die POISSON-BOLTZMANN-Gleichung, die nur für wenige Fälle einfacher Geometrie analytische Lösungen besitzt. Erst die stetige Weiterentwicklung von Rechnern und numerischen Verfahren hat es ermöglicht, von den kugelförmigen Proteinmodellen Abstand zu nehmen und die Struktur von Proteinen bei solchen Rechnungen im atomaren Detail zu beschreiben. Dadurch ist man heute in der Lage, wirklich mikroskopische Modelle zu betrachten und das Verhalten einzelner Residuen in Proteinen gezielt als Funktion von atomaren Wechselwirkungen zu untersuchen.

Mit dieser immer genaueren Beschreibung der Strukturen muß allerdings immer mehr deren Einfluß auf die Protonierungszustände [14, 15] Rechnung getragen werden. Bashford und Karplus haben beispielsweise gezeigt, daß unterschiedliche Konformationen einzelner Residuen zu verschiedenen berechneten pK_a -Werten dieser Gruppen führen [16]. Auch in anderen Arbeiten wurden für die Berechnung von pK_a -Werten mehrere Kristallstrukturen [17–20] und verschiedene Mittelungsverfahren verwendet. Verglichen mit der Verwendung einer einzelnen Struktur wurde dabei in allen Arbeiten eine bessere Übereinstimmung mit Experimenten erreicht.

Aus der Flexibilität polarer Seitenketten ergibt sich die Möglichkeit, unterschiedliche Protonenverteilungen in einem Protein durch verschiedene Orientierungen der polaren Gruppen zu stabilisieren. Alexov und Gunner [21] haben diesen Effekt ansatzweise bei ihren Rechnungen berücksichtigt. Dabei wurde speziell die Reorientierung von Hydroxylgruppen in der Nachbarschaft protonierbarer Residuen betrachtet.

Um die ortsabhängige Dipolrelaxation bei einer Veränderung des P-Zustandes eines Proteins mikroskopisch zu beschreiben, werden wir in der vorliegenden Ar-

beit den Ansatz von Alexov und Gunner erweitern. Dabei werden wir nicht nur die Flexibilitäten von Protonen berücksichtigen, sondern auch die möglichen Reorientierungen ganzer geladener oder polarer Gruppen explizit modellieren. Um die mittleren Verteilungen von Protonierungen und Konformationen in unserem Proteinmodell zu berechnen, müssen auch wir den zugehörigen Konfigurationsraum abtasten. Dieser wird einerseits durch die Verteilung der Protonen und andererseits durch die Konformationen der Seitengruppen definiert.

Da wir möglichst viele Konformationszustände zulassen wollen, ist der Anteil der Konformationen am Konfigurationsraum sehr viel höher als der der Protonenverteilungen. In dem ersten Teil dieser Arbeit werden wir im Rahmen der statistischen Mechanik zeigen, daß es nicht notwendig ist, wie bisher üblich, den gesamten Konfigurationsraum für jeden pH-Wert einzelnen abzutasten, um pH-abhängige Größen zu bestimmen. In Kapitel 3 werden wir sehen, daß diese aus den Resultaten des einmal abgetasteten Konformationsraumes berechnet werden können.

In der vorgestellten Methode herrscht eine klare Trennung zwischen dem Beitrag des pH-Wertes und dem der Konformationsenergien zur großkanonischen Zustandssumme. Dadurch wird die Bestimmung pH-abhängiger Größen unabhängig von dem Verfahren, mit dem der Konformationsraum abgetastet wird. Exakt berechnete können ebenso wie genäherte Werte der Zustandssumme als Ausgangspunkt für die Bestimmung von pH-abhängigen Kurven verwendet werden. Da diese Trennung wesentlich für die neue Methode ist, werden wir sie „Berechnung von **Protein-Titrationskurven** durch **Konformationsraum-Sampling**“ nennen und mit ProTikKS abkürzen.

Ein grundlegendes Konzept, das den Arbeiten zur Berechnung von Protonierungsgleichgewichten in Proteinen zugrunde liegt, ist die Annahme eines engen Zusammenhanges zwischen dem pK_a -Wert eines Moleküls im Lösungsmittel und dem pK_a -Wert des gleichen Moleküls im Protein (z.B. [22]). Lange Zeit ist man davon ausgegangen, daß dieser Unterschied nur durch die elektrostatischen Wechselwirkungen des Moleküls mit den anderen Residuen des Proteins entsteht. Erst Warshel hat mit seinen Mitarbeitern gezeigt, daß Unterschiede in der freien Energie auch durch die mit der Umgebungsänderung verbundene Änderung der Solvatisierungsenergie und durch Wechselwirkungen mit permanenten und induzierten Dipolmomenten zustande kommen und diese Effekte systematisch bei Rechnungen berücksichtigt [23, 24].

Auch in der ProTikKS-Methode verwenden wir im Lösungsmittel experimentell bestimmte pK_a -Werte als Grundlage zur Bestimmung des Wertes im Protein. In Abschnitt 3.2.7 werden wir allerdings zeigen, daß der experimentelle Wert zusätzlich zu den eben erwähnten energetischen Korrekturen auch noch um entropische Beiträge korrigiert werden muß. Unser besonderes Interesse gilt dabei dem Einfluß von Freiheitsgraden, deren zugänglicher Konformationsraum vom Protonierungs-

zustand abhängt.

Anschließend werden wir in Kapitel 4 auf die Modellierung von Proteinen in Computerexperimenten eingehen und die verschiedenen Wechselwirkungsterme vorstellen, die zur Konformationsenergie des Proteins beitragen. Desweiteren werden wir ein numerisches Verfahren vorschlagen, um Systeme mit vielen Konformationsfreiheitsgraden mit der ProTikKS-Methode zu untersuchen.

Nachdem wir so die theoretischen Grundlagen zur Berechnung von Ionisierungsgleichgewichten in Proteinen im ersten Teil dieser Arbeit geschaffen haben, werden wir die ProTikKS-Methode auf das Grün Fluoreszierende Protein (GFP) anwenden. Aufgrund seiner physikalischen und chemischen Eigenschaften findet es einerseits viele Anwendungen in der mikrobiologischen und medizinischen Forschung [25–28] und eignet sich andererseits sehr gut als Testsystem für unsere Methode.

Im elektronisch angeregten Zustand ändert der Fluorophor des GFP seine Protonenaffinitäten. Dadurch wird ein Protonentransport im Protein ausgelöst. Wir werden uns speziell für die Protonenverteilung in der Umgebung des Fluorophors im Grundzustand und im angeregten Zustand interessieren. Auf diese Weise wollen wir mögliche Akzeptoren für das vom Chromophor im angeregten Zustand abgegebene Proton finden.

In diesem angewandten Teil der vorliegenden Arbeit werden wir auch die ProTikKS-Methode selbst testen. Wir werden dazu unsere Ergebnisse mit Resultaten vergleichen, die mit anderen Verfahren erzielt wurden. Außerdem werden wir den Einfluß von unterschiedlichen Ladungsparametern auf die Ergebnisse von Proteinelektrostatik-Rechnungen ebenso untersuchen, wie den Einfluß der dem Modellsystem zugänglichen Konfigurationen.

Kapitel 2

Grundlagen

2.1 Ionisierungsgleichgewichte

Für Moleküle, die Protonen aufnehmen (M) oder abgeben (MH) können, formulieren wir die Dissoziationsreaktion



unabhängig vom Ladungszustand des Moleküls. Die Differenz der GIBBSschen freien Energien zwischen Produkten und Edukten haben wir mit ΔG bezeichnet.

Nach der Definition von Brönsted bezeichnen wir den unprotonierten Zustand als basische und den protonierten als saure Form eines Moleküls [29]. Da der elektrisch neutrale Zustand einer chemischen Gruppe traditionell als Referenzzustand angesehen wird, ist es üblich ein Molekül als Säure zu bezeichnen, wenn es durch Abgabe eines Protons elektrisch neutral wird. Von einer Base spricht man falls dieser Zustand erst durch Aufnahme eines Protons erreicht wird. Auch wenn wir später den deprotonierten Zustand als Referenz verwenden werden, folgen wir hier dieser Nomenklatur.

Ionisierungsgleichgewicht nennen wir das Gleichgewicht zwischen den Konzentrationen der sauren und der basischen Form eines Moleküls. Bezeichnen wir die Konzentration einer Spezies X mit $[X]$ und deren Aktivitätskoeffizienten mit γ_x , können wir den Zusammenhang

$$\ln \left(\frac{[\text{M}^-][\text{H}^+]}{[\text{MH}]} \frac{\gamma_{\text{M}^-}\gamma_{\text{H}^+}}{\gamma_{\text{MH}}} \right) = -\frac{1}{k_{\text{B}}T} \Delta G \quad , \quad (2.2)$$

mit der Änderung der GIBBSschen freien Energie für die Reaktion (Gl. 2.1) aufstellen. Die Größe

$$K := \frac{[\text{M}^-][\text{H}^+]}{[\text{MH}]} \frac{\gamma_{\text{M}^-}\gamma_{\text{H}^+}}{\gamma_{\text{MH}}} \quad (2.3)$$

bezeichnet man als Gleichgewichtskonstante der Reaktion. Ihr Wert hängt unter anderem von der Protonenkonzentration $[H^+]$ im System ab. Im einfachsten Fall untersuchen wir die Dissoziation des Moleküls in wäßriger Lösung. Dort ist der pH-Wert als negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenaktivität

$$\text{pH} := -\log([H^+]\gamma_{H^+}) \quad (2.4)$$

definiert. Da die freie Bildungsenthalpie für ein Proton unter Standardbedingungen per definitionem null ist, gilt die Beziehung

$$\mu(H^+) = -k_B T \ln 10 \text{ pH} \quad (2.5)$$

zwischen dem pH-Wert und dem chemischen Potential $\mu(H^+)$ des Protons im Wasser [30]. Befindet sich das System im Gleichgewicht, muß das chemische Potential überall gleich sein. Also ist auch der pH-Wert im gesamten System derselbe. Dies gilt sicher nicht für die Konzentration $[H^+]$ der Protonen im System, die in der Nähe negativ geladener Moleküle höher ist als in der Umgebung positiver oder neutraler Gruppen.

Analog zu dem pH-Wert definiert man den pK_a -Wert eines Moleküls als

$$\text{pK}_a := -\log K = -\log\left(\frac{[M^-][H^+]}{[MH]}\frac{\gamma_M\gamma_{H^+}}{\gamma_{MH}}\right) = \frac{1}{k_B T \ln 10} \Delta G \quad . \quad (2.6)$$

Die oben eingeführten Aktivitätskoeffizienten werden unter anderem durch die DEBYE-HÜCKEL-Theorie [5] beschrieben. Ohne näher auf diese Arbeit einzugehen stellen wir fest, daß die Aktivitätskoeffizienten der Reaktanden in stark verdünnten Lösungen mit niedriger Ionenkonzentration nahe bei eins liegen. In diesem Fall können wir daher die Näherungen

$$\text{pH} \approx -\log[H^+] \quad \text{und} \quad \text{pK}_a \approx -\log\frac{[M^-][H^+]}{[MH]} \quad (2.7)$$

machen [29].

Im Rahmen dieser Näherungen folgt aus den Definitionen Gl. 2.4 und Gl. 2.6 unmittelbar die „HENDERSON-HASSELBALCH-Gleichung“ [29]

$$\log\left(\frac{[M^-]}{[MH]}\right) = \text{pH} - \text{pK}_a \quad . \quad (2.8)$$

Da die Summe der Konzentrationen von protonierter und unprotonierter Form des Moleküls dessen Gesamtkonzentration in der Lösung ergeben muß, können wir aus Gl. 2.8 eine Funktion für die Konzentration der protonierten Form in Abhängigkeit vom pH-Wert ableiten:

$$[MH] = \frac{1}{1 + 10^{\text{pH} - \text{pK}_a}} \quad (2.9)$$

Diese Funktion wird als „Titrationskurve“ des Moleküls bezeichnet. Sie ähnelt in ihrer Form einer FERMI-Verteilung und hat mit dieser auch wesentliche Eigenschaften gemeinsam. Für kleine pH-Werte geht der Wert gegen eins und die Moleküle liegen fast alle in protonierter Form vor. Bei kleinen Protonenkonzentrationen, also großen pH-Werten, liegen die Moleküle fast ausschließlich dissoziiert vor. Dort geht die Funktion gegen null. Die Abszisse des Wendepunktes dieser Funktion ist identisch mit dem pK_a -Wert des Moleküls. Der Funktionswert an dieser Stelle ist gleich $1/2$. Ist der pH-Wert der Lösung gleich dem pK_a -Wert, liegt die Hälfte der Moleküle in ihrer dissoziierten Form vor.

Titrationskurven für Moleküle, die Reaktionen vom Typ Gl. 2.1 durchführen, unterscheiden sich nur in den pK_a -Werten der Reaktanden. Sie haben die gleiche Form, sind aber entlang der pH-Achse gegeneinander verschoben. Da man diesen Kurven bei Experimenten sehr häufig begegnet, werden sie auch als „normale Titrationskurven“ oder, wegen ihrer Beziehung zu Gleichung 2.8, Titrationskurven vom „HENDERSON-HASSELBALCH-Typ“ bezeichnet.

2.2 Ionisierungsgleichgewichte in Proteinen

Das Dissoziationsverhalten eines Moleküls im Protein unterscheidet sich im allgemeinen deutlich von dem des gleichen Moleküls in wässriger Lösung. Einerseits besitzen die neutrale und die geladene Form einer Gruppe in beiden Medien unterschiedliche elektrostatische Wechselwirkungsenergien mit der Umgebung. Andererseits wird sich der zugängliche Konformationsraum für das Proton im Protein von dem im Lösungsmittel unterscheiden.

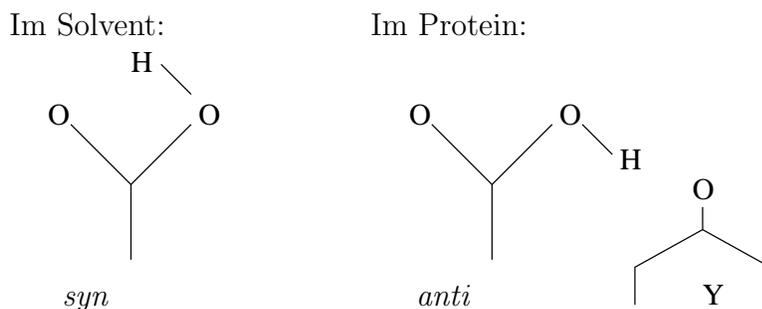


Abbildung 2.1: Eine Carboxylgruppe als Beispiel für unterschiedliche Konformationsräume eines Protons im Solvent (links) und im Protein (rechts). Die Wechselwirkung zum Residuum Y stabilisiert die *anti*-Orientierung im Protein.

Abbildung 2.1 zeigt dies exemplarisch für eine Carboxylgruppe. Betrachten wir nur das isolierte Molekül, so wird die *syn*-Konfiguration, aufgrund der günstigeren elektrostatischen Wechselwirkungen mit dem zweiten Sauerstoff der Gruppe,

energetisch bevorzugt sein. Diese Wechselwirkung bestimmt auch die Orientierung des Protons im Lösungsmittel. Da es dort keine weiteren festen Partner für das Proton gibt, wird die Gruppe in der *syn*-Konfiguration vorliegen. Befindet sich die Gruppe allerdings im Protein, können dort andere Seitenketten diese Aufgabe erfüllen. In der Abbildung bietet die Anwesenheit eines weiteren Sauerstoffs (des Residuums Y) die Möglichkeit neben der *syn*- auch die, nun energetisch gleichwertige, *anti*-Konfiguration anzunehmen. Daraus resultiert im Protein ein zusätzlicher Entropiebeitrag zum protonierten Zustand der Carboxylgruppe.

Der Zusammenhang zwischen der Proteinstruktur und dem Konformationsraum des Protons ist, ebenso wie die anderen Wechselwirkungen titrierbarer Gruppen mit dem Protein, für die Veränderung von Protonenaffinitäten einzelner Residuen durch Konformationsänderungen eines Proteins verantwortlich. Dies wurde beispielsweise im Zusammenhang mit dem Protonentransport während des Photozyklus des BR beobachtet [31, 32].

Der Beschreibung des Dissoziationsverhaltens einzelner Residuen in einem Protein wird ein Modell zugrunde gelegt, welches das Verhalten einer Modellkomponente im Lösungsmittel über einen thermodynamischen Zyklus mit dem des Residuums im Protein in Verbindung setzt. Diesen thermodynamischen Zugang zu der Problematik wollen wir im folgenden darstellen.

2.2.1 Protonierung in starrer Proteinstruktur

Betrachten wir ein Protein P mit N protonierbaren Gruppen M_i , $i = 1 \dots N$, können wir dessen Protonierungszustand durch den Protonierungsvektor

$$\mathbf{s} \in \mathbb{R}^N \quad \text{mit} \quad s_i = \begin{cases} 1 & \text{falls Residuum } i \text{ protoniert} \\ 0 & \text{falls Residuum } i \text{ unprotoniert} \end{cases} \quad (2.10)$$

angeben. Der Protonierungsgrad der Gruppe i im Protein kann in Form der HENDERSON-HASSELBALCH-Gleichung

$$\log \left(\frac{[PM_i]}{[PM_iH]} \right) = (\text{pH} - \text{pK}'_i(\mathbf{s}, \text{pH})) \quad (2.11)$$

ausgedrückt werden [7]. Dabei ist der Wert $\text{pK}'_i(\text{pH})$ durch die Änderung der GIBBSschen freien Energie

$$\Delta G^{\text{prot}} = \Delta G^{\text{diss}} + \Delta G^{\text{ww}}(\mathbf{s}, \text{pH}) \quad (2.12)$$

für die Dissoziation der Gruppe i bei einem gegebenen pH-Wert bestimmt.

Der Teil $\Delta G^{\text{ww}}(\mathbf{s}, \text{pH})$ dieser Änderung rührt von den Wechselwirkungen des Residuums mit dem ganzen Rest des Proteins her. Da diese auch von den Protonierungszuständen der übrigen titrierbaren Residuen abhängen, ist dieser Term eine Funktion des pH-Wertes.

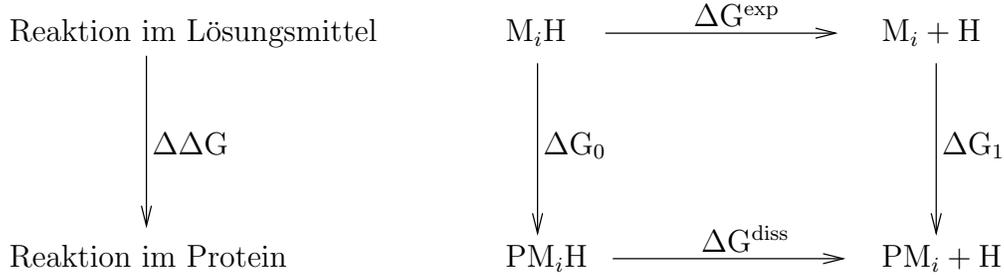


Abbildung 2.2: Thermodynamischer Zyklus, der die Änderung der GIBBSSchen freien Energie bei einer Dissoziationsreaktion im Lösungsmittel (ΔG^{exp}), mit der Änderung bei der gleichen Reaktion im Protein P (ΔG^{diss}) in Verbindung setzt.

Zusätzlich trägt zu $\text{pK}'_i(\text{pH})$ die Änderung der GIBBSSchen freien Energie ΔG^{diss} der Dissoziationsreaktion des Residuums im Protein bei. Dieser Energiebeitrag ist für die Reaktion im Protein zunächst nicht bekannt, steht aber in engem Zusammenhang mit dem ΔG^{exp} -Wert ($\propto \text{pK}_a^{\text{exp}}$), der für ein Molekül vom Typ der Gruppe i in einem Referenzsystem, z.B. dem isolierten Residuum in Wasser, gemessen werden kann [9]. Der in Abbildung 2.2 dargestellte thermodynamische Zyklus zeigt, wie diese beiden Werte in Verbindung gebracht werden können:

$$\Delta G^{\text{diss}} = \Delta G^{\text{exp}} + \Delta G_1 - \Delta G_0 = \Delta G^{\text{exp}} + \Delta\Delta G \quad . \quad (2.13)$$

Die Größe $\Delta\Delta G$ steht für die Unterschiede in den freien Energien, die aus dem Transfer der protonierten (ΔG_0) und unprotonierten (ΔG_1) Form der Gruppe vom Lösungsmittel in das Protein resultieren. Diese Differenz kann in einen enthalpischen und einen entropischen Anteil aufgespalten werden:

$$\Delta\Delta G = \Delta\Delta E - T\Delta\Delta S \quad . \quad (2.14)$$

Der erste Summand stammt im wesentlichen von den unterschiedlichen elektrostatischen Wechselwirkungen mit der Umgebung, welche das Modellmolekül im Lösungsmittel und im Protein erfährt. Der zweite berücksichtigt die verschiedenen Entropien des protonierten und des unprotonierten Moleküls in den jeweiligen Umgebungen.

Aus diesen beiden Teilen können wir den Wert

$$\text{pK}'_i(\mathbf{s}, \text{pH}) = \text{pK}_i^{\text{exp}} + \frac{1}{k_B T \ln 10} (\Delta\Delta G + \Delta G^{\text{ww}}(\mathbf{s}, \text{pH})) \quad (2.15)$$

zusammensetzen. Im Gegensatz zu $\Delta G^{\text{ww}}(\text{pH})$ ist der Ausdruck

$$\text{pK}_i^{\text{int}} := \text{pK}_i^{\text{exp}} + \frac{1}{k_B T \ln 10} \Delta\Delta G \quad (2.16)$$

nicht vom bestehenden pH-Wert und den Wechselwirkungen der Gruppe i mit den anderen titrierbaren Gruppen abhängig. Dieser Wert wird allgemein als „intrinsic pK_a “ bezeichnet. Der Wert von $\Delta\Delta G$ wird von der Wahl des Referenzzustandes für das Protein beeinflusst. Der Referenzzustand beschreibt den

festgehaltenen Zustand aller anderen titrierbaren Residuen, während des Transfers des Modellmoleküls aus dem Lösungsmittel in das Protein. Wird der Zustand, in dem alle Aminosäuren elektrisch neutral sind, als Referenz gewählt, erhalten wir Gleichung 2.16 analog zur Definition von Tanford und Kirkwood [9].

Während die Bestimmung von Wechselwirkungsenergien mit gängigen klassischen Methoden (z.B. DelPhi [7], CHARMM [33]) einfach ist (vgl. Kapitel 4), gestaltet sich die Berechnung entropischer Beiträge sehr schwierig. Aus diesem Grund gehen konventionelle pK_a -Rechnungen von der Annahme aus, daß der entropische Beitrag verschwindet (z. B. [7, 21]) und sich Gl. 2.14 zu

$$\Delta\Delta G = \Delta\Delta E \quad (2.17)$$

vereinfacht.

Diese Annahme ist korrekt, wenn sowohl die protonierte als auch die unprotonierte Form des Moleküls die gleiche Entropie in den verschiedenen Umgebungen haben, oder wenn beide Formen der gleichen Entropieänderung unterliegen, wenn sie vom Lösungsmittel ins Protein überführt werden. Viele erfolgreiche pK_a -Rechnungen zeigen, daß diese Vereinfachung offenbar ganz gut ist, zumindest für Makromoleküle die aus Standardaminosäuren bestehen. Dennoch werden wir uns in Abschnitt 3.2.7 näher mit dieser Annahme beschäftigen und feststellen, daß es Fälle gibt, in denen sie nicht gerechtfertigt ist.

Gehen wir aber bis auf weiteres von der Gültigkeit der Gleichung 2.17 aus. Es kann gezeigt werden, daß die pH-abhängige Differenz der freien Energie zwischen einem Protein im Protonierungszustand \mathbf{s} und dem vollkommen unprotonierten Zustand durch

$$\Delta G^{\text{prot}}(\mathbf{s}, \text{pH}) = k_B T \ln 10 \sum_{i=1}^N s_i (\text{pH} - \text{pK}_i^{\text{exp}}) - \sum_{i=1}^N [E_i^{\text{solv}}(s_i) - E_i^{\text{solv}}(0)] + E^{\text{prot}}(\mathbf{s}) - E^{\text{prot}}(\mathbf{0}) \quad (2.18)$$

gegeben ist [34]. Hierbei stehen $E^{\text{prot}}(\mathbf{0})$ und $E^{\text{prot}}(\mathbf{s})$ für die gesamte Energie des Proteins im total deprotonierten Zustand $\mathbf{0}$ und im Zustand \mathbf{s} . Die Energie der Gruppe i im Lösungsmittel im Zustand s_i wird mit $E_i^{\text{solv}}(s_i)$ ($i \in \{0, 1\}$) bezeichnet.

Nach der Bestimmung der in Gleichung 2.18 auftretenden Energien kann, durch Summation über alle 2^N Protonierungszustände ($\sum_{\{\mathbf{s}\}}$), die pH-abhängige Zustandssumme

$$\mathfrak{Z}(\text{pH}) = \sum_{\{\mathbf{s}\}} e^{-\Delta G^{\text{prot}}(\mathbf{s}, \text{pH})/k_B T} \quad (2.19)$$

für das Protein bestimmt werden [34].

Die mittlere Protonierung des Residuums i kann ebenfalls durch Summation

$$\langle s_i \rangle (\text{pH}) = \frac{1}{\mathfrak{Z}} \sum_{\{\mathbf{s}\}} s_i e^{-\Delta G^{\text{prot}}(\mathbf{s}, \text{pH})/k_B T} \quad (2.20)$$

über alle Zustände ermittelt werden [34].

2.2.2 Erweiterung auf flexible Konformationen

Ausgehend von Gleichung 2.18 finden wir einen einfachen Weg, die Methode der pK_a -Rechnung auf die Berücksichtigung vieler Konformationen des Proteins auszubauen. Hierzu müssen die Summationen in Gl. 2.20 zusätzlich über alle möglichen Konformationszustände ausgeführt werden. Die Konformationsenergien, die mit einer bestimmten Konfiguration des Proteins verbunden sind, können in die Energieterme $E^{\text{prot}}(\mathbf{s})$ aufgenommen werden [13, 21]. Beschreiben wir die Konfiguration eines Residuums i durch einen Vektor \mathbf{k}_i und die des gesamten Proteins durch $\mathbf{K} = (\mathbf{k}_1, \dots, \mathbf{k}_N)$, wird Gl. 2.18 in der Form

$$\begin{aligned} \Delta G^{\text{prot}}(\mathbf{s}, \mathbf{K}, \text{pH}) = k_B T \ln 10 \sum_{i=1}^N s_i (\text{pH} - \text{pK}_i^{\text{exp}}) - \sum_{i=1}^N [E_i^{\text{solv}}(s_i, \mathbf{k}_i) - E_i^{\text{solv}}(0, \mathbf{k}_i)] \\ + E^{\text{prot}}(\mathbf{s}, \mathbf{K}) - E^{\text{prot}}(\mathbf{0}, \mathbf{K}) \end{aligned} \quad (2.21)$$

auf variable Konformationszustände erweitert [13].

Zur Bestimmung der Zustandssumme muß nun zusätzlich über alle Konformationszustände $\{\mathbf{K}\}$ des Proteins summiert werden:

$$\mathfrak{Z}(\text{pH}) = \sum_{\{\mathbf{s}\}} \sum_{\{\mathbf{K}\}} e^{-\Delta G^{\text{prot}}(\mathbf{s}, \mathbf{K}, \text{pH})/k_B T}. \quad (2.22)$$

Die Reihenfolge der Summation ist hierbei wichtig, da die Konformationszustände des Proteins auch durch die Positionen der Wasserstoffatome definiert sind, deren Vorhandensein wiederum vom Protonierungszustand \mathbf{s} abhängt. Wir können uns leicht überlegen, daß diese Zustandssumme in eine äußere Summe über die Protonierungszustände und eine innere Summe

$$\mathfrak{z}^{\text{konf}}(\mathbf{s}) := \sum_{\{\mathbf{K}(\mathbf{s})\}} e^{-(E^{\text{prot}}(\mathbf{s}, \mathbf{K}) - E^{\text{prot}}(\mathbf{0}, \mathbf{K}) - \sum_{i=1}^N [E_i^{\text{solv}}(s_i, \mathbf{k}_i) - E_i^{\text{solv}}(0, \mathbf{k}_i)])/k_B T} \quad (2.23)$$

über die Konformationen zu einem Protonierungszustand umgeschrieben werden kann:

$$\mathfrak{Z}(\text{pH}) = \sum_{\{\mathbf{s}\}} \left[\prod_{i=1}^N e^{-s_i \ln 10 (\text{pH} - \text{pK}_i^{\text{exp}})} \mathfrak{z}^{\text{konf}}(\mathbf{s}) \right]. \quad (2.24)$$

Damit sind wir wieder in der Lage, durch Summation über alle Zustände, die mittlere Protonierung einzelner Residuen bei gegebenem pH zu bestimmen.

In diesem Abschnitt haben wir dargestellt, wie man ausgehend von einzelnen Modellmolekülen in Lösung über einen thermodynamischen Zyklus die mittlere Protonierung eines Residuums vom gleichen Typ im Protein bestimmen kann. Dieser Zugang zur pK_a -Berechnung geht auf die Arbeiten von Tanford und Kirkwood [9, 35] zurück und dient als Grundlage für viele Anwendungen. So wurden damit beispielsweise Rechnungen am photosynthetischen Reaktionszentrum [36–38], am Cytochrom C_4 [39], an der HIV-Protease [40], an BR [41] und dem Photoaktiven Gelben Protein (PYP) [42] durchgeführt.

Wir wollen diesen Zugang daher als traditionell bezeichnen. Ein gemeinsames Merkmal all dieser Anwendungen ist, daß die mittlere Protonierung oder andere thermodynamische Eigenschaften für jeden pH-Wert eigens berechnet werden.

2.3 Zusammenhang zwischen den freien Energien

Viele Titrationsexperimente werden an Systemen vorgenommen, bei denen der Druck p und die Temperatur T konstant sind [29]. Das zu diesen Variablen gehörende thermodynamische Potential ist die GIBBSSche freie Energie G . Die in theoretischen Arbeiten wie dieser, aus den Mikrozuständen des untersuchten Systems gewonnenen Zustandssummen führen zu der HELMHOLTZschen freien Energie A . Diese ist aber das thermodynamische Potential in den Variablen T und dem Volumen V , das zur Beschreibung von Experimenten geeignet ist, die bei konstanter Temperatur und konstantem Volumen durchgeführt werden. In diesem Abschnitt möchten wir kurz begründen, unter welchen Umständen wir diese beiden Größen gegeneinander austauschen können.

Die beiden Potentiale lassen sich durch eine LEGENDRE-Transformation verknüpfen. Mit $p = -\frac{\partial A}{\partial V}$ folgt G als Transformierte von A :

$$A(T, V) \rightarrow G(T, p) = A + pV \quad (2.25)$$

In dieser Arbeit werden wir uns im wesentlichen für die Änderungen von freien Energien interessieren. Die der GIBBSSchen freien Energie ergibt sich nach Gl. 2.25 zu

$$\Delta G = \Delta A + p\Delta V \quad . \quad (2.26)$$

Diese Differenz ist somit durch die Änderung der freien Energie ΔA und die Volumenarbeit $p\Delta V$ gegeben. Betrachten wir Reaktionen bei Atmosphärendruck

($1 \text{ atm} \approx 1 \cdot 10^5 \text{ Pa}$) und berücksichtigen, daß die in unseren Fällen typischen Volumenänderungen im Bereich weniger Kubikzentimeter pro Mol liegen [29], sehen wir, daß der Term der Volumenarbeit vernachlässigbar klein ($\approx 10^{-5} k_B T$) wird. Unter diesen Bedingungen können wir also guten Gewissens $\Delta G \approx \Delta A$ annehmen.

Diese Annahme gilt aber weniger aufgrund der geringen Volumenänderung als vielmehr aufgrund des geringen Druckes. Bei höheren Drücken ($> 100 \text{ atm}$), wie sie beispielsweise in Ultrazentrifugen oder in der Tiefsee auftreten, muß der Volumenarbeit ebenfalls Rechnung getragen werden [43]. In der vorliegenden Arbeit gehen wir immer von Atmosphärendruck aus und können so die Unterscheidung zwischen GIBBSscher und HELMHOLTZscher freier Energie fallen lassen. Wenn eine Differenzierung nicht unbedingt notwendig erscheint, werden wir nur noch von der freien Energie sprechen.

2.4 Beschreibung der Proteinstruktur

Im Rahmen der BORN-OPPENHEIMER-Näherung [44–46] ist es möglich, die Elektronenbewegung als schnell gegenüber der Kernbewegung zu betrachten. Gehen wir von einer instantanen Einstellung der Elektronen auf die Kernkonfiguration aus, können wir die dreidimensionale Struktur eines Moleküls allein durch die Koordinaten der Atomkerne beschreiben.

Bevor wir uns im nächsten Kapitel der statistischen Mechanik von Ionisierungsgleichgewichten zuwenden, werden wir erläutern, wie wir die Konformation \mathbf{K} von Proteinen formal fassen wollen. Der Modellierung der elektronischen Struktur von Molekülen werden wir uns in Abschnitt 4.1.2 zuwenden.

Die dreidimensionale Konformation eines Moleküls ist eindeutig durch die Angabe der kartesischen Koordinaten aller Atomkerne bezüglich eines beliebigen Koordinatensystems gegeben. Wenn wir ein Molekülmodell numerisch einer Translation oder Rotation unterwerfen wollen, dann ist diese Darstellung sicher die handlichste. Das gilt auch für die Berechnung von Abständen zwischen einzelnen Atomen, um etwa elektrostatische Wechselwirkungsenergien auszurechnen. Deshalb werden wir diese Koordinaten für die Repräsentation der Moleküle im Rechner verwenden.

Um aber Aussagen über physikalische oder chemische Eigenschaften eines Moleküls zu erhalten, die einfach zu interpretieren sind, ist es meistens sehr viel informativer die gegenseitige Lage ganzer Gruppen im Protein anzugeben. Gerade bei Proteinen, deren Struktur klar in ein Rückgrat und die Orientierung der Seitenketten zerlegt werden kann [2], bietet sich eine andere Form von Koordinaten an, die sogenannten internen Koordinaten.

Abbildung 2.3 zeigt wie ein aus den vier Atomen A,B,C und D bestehendes Molekül in internen Koordinaten beschrieben werden kann. Die Bindung zwischen A

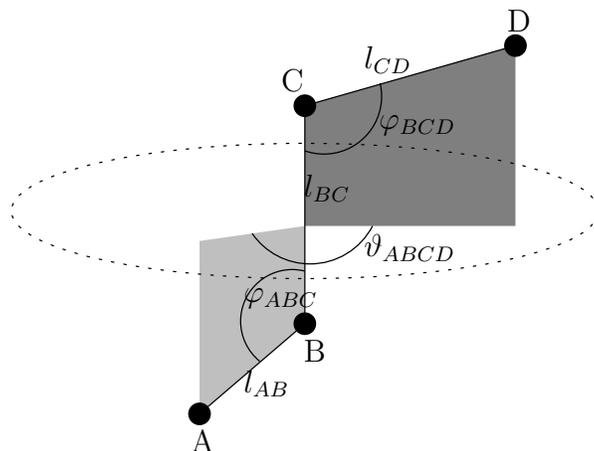


Abbildung 2.3: Zur Definition interner Koordinaten. Die gegenseitige Lage der Atome A,B,C,D ist durch die Bindungslängen l , die Bindungswinkel φ und den Torsionswinkel ϑ festgelegt.

und B wird nur durch den Abstand der Zentren beider Atome, der Bindungslänge l_{AB} , angegeben. Das dritte Atom wird durch l_{BC} und den Bindungswinkel φ_{ABC} positioniert. Diese drei Atome definieren nun ein Koordinatensystem. Die Lage jedes weiteren Atomes kann bezüglich seiner drei Vorgänger durch eine Bindungslänge l , einen Bindungswinkel φ und einen Torsionswinkel¹ ϑ angegeben werden. Für das Atom D in unserem Beispiel sind dies l_{CD} , φ_{BCD} und ϑ_{ABCD} . Letzterer ist der Winkel zwischen den Ebenen ABC und BCD. So definierte interne Koordinaten werden in Standardprogrammen zur Quantenchemie oder Molekulardynamik (MD) verwendet.

Oft bietet es sich allerdings an, von dieser Definition abzuweichen und andere Koordinaten zu verwenden. Nehmen wir beispielsweise die Bindungslängen und Winkel der beiden Benzolringe eines Biphenyls als konstant an, so können wir den Konformationsraum dieses Moleküls durch einen einzigen Winkel beschreiben, der die gegenseitige Verdrehung der beiden Ringe angibt. Ein weiteres Beispiel für eine sinnvoll angepasste Koordinatendefinition sind die (Φ, Ψ) -Winkel, mit denen die gegenseitige Lage der Peptidbindungen in einem Proteinbackbone angegeben wird [2].

In dieser Arbeit werden wir vor allem die Konformationen einzelner Aminosäuren in einem Protein betrachten. Wenn wir die zugehörigen Koordinaten formal verwenden wollen, werden wir die Konformation des Backbones mit Φ^{BB} bezeichnen und damit die (Φ, Ψ) -Winkel zwischen allen Peptidbindungen meinen. Ist das

¹Dieser Winkel wird auch häufig als „Dihedral-“ oder „Dieder-“ Winkel bezeichnet.

Backbone festgelegt, können wir die Konformation eines Residuums i durch einen Satz von internen Koordinaten² Φ_i angeben. Da wir uns speziell für Protonen interessieren, die von Seitenketten aufgenommen oder abgegeben werden können, wollen wir deren Koordinaten extra in einem Satz φ_i notieren. Φ_i enthält demnach die Koordinaten aller nicht-H-Atome der Gruppe und die Koordinaten von Protonen, die nicht an Protonierungsreaktionen Teil haben.

Die räumliche Struktur \mathbf{K} eines Proteins mit N Residuen wird damit eindeutig durch einen Satz von internen Koordinaten $\mathbf{K} := (\Phi^{\text{BB}}, \Phi_1, \dots, \Phi_N, \varphi_1, \dots, \varphi_N)$ festgelegt. Zur besseren Übersicht definieren wir noch $\Phi := (\Phi_1, \dots, \Phi_N)$ und $\varphi := (\varphi_1, \dots, \varphi_N)$. Nehmen wir weiterhin, den in Gl. 2.10 definierten, Protonierungsvektor \mathbf{s} hinzu, ist der komplette Konformations- und Protonierungszustand (KP-Zustand) $\mathbf{x} := (\mathbf{K}, \mathbf{s})$ des Proteins festgelegt.

²Die ersten drei Atome sind C, C $_{\alpha}$, N.

Kapitel 3

Statistische Mechanik der Ionisierungsgleichgewichte

3.1 Titrationskurven und Gittergas

3.1.1 Definition des Modells

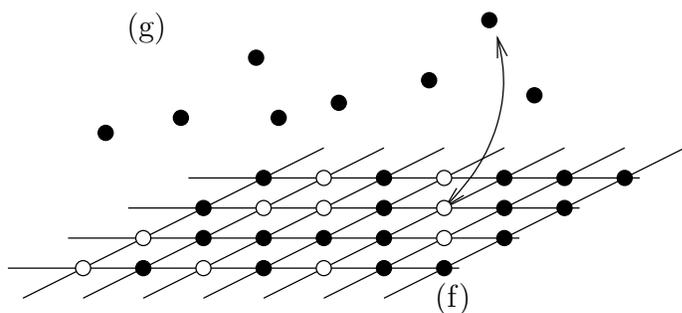


Abbildung 3.1: Das Gittergas als Modellsystem: Die Teilchen (ausgefüllte Kreise) können sich entweder frei in der Gasphase (g) befinden oder an unbesetzten Gitterplätzen (leere Kreise) adsorbiert (f) werden.

Das Gittergasmodell [47] stellt die Grundlage für viele Theorien in der statistischen Mechanik dar. Auch wir wollen die Theorie der Ionisierungsgleichgewichte in Proteinen auf dieses einfache Modell aufbauen. Beginnen wir mit der Definition des, in Abbildung 3.1 dargestellten, Modellsystems. Dort unterscheiden wir Teilchen, die sich in der Gasphase (g) befinden von den auf dem Gitter adsorbierten (f). Unser Gitter besitzt N Plätze, die jeweils ein Teilchen binden können. Ferner sind die Gitterplätze so beschaffen, daß sie abhängig von ihrem Besetzungszustand unterschiedliche Energieniveaus annehmen. Damit erhalten wir für jeden Gitterplatz zwei Zustände, denen unterschiedliche Zustandssummen zugeordnet sind. Die Zustandssumme für den besetzten Gitterplatz $\mathfrak{z}(1)$ enthält alle Zustände die das System „Gitterplatz + Teilchen“ einnehmen kann. In der Zustandssumme für den unbesetzten Gitterplatz $\mathfrak{z}(0)$ müssen wir sowohl über die Zustände des

Gitterplatzes als auch über die des noch nicht adsorbierten Teilchens aus der Gasphase summieren.

Zur Vereinfachung nehmen wir an, daß die Teilchen auf dem Gitter nicht miteinander wechselwirken und ununterscheidbar sind. Auf diese Weise können wir die Zustandssumme des Gesamtsystems als Produkt der einzelnen Zustandssummen schreiben. Konzentrieren wir uns zunächst auf einen Zustand, in dem auf dem Gitter genau M Teilchen adsorbiert wurden. Dieser Zustand kann durch $\binom{M}{N}$ Mikrozustände realisiert werden. Damit erhalten wir die M -Teilchen-Zustandssumme

$$\mathfrak{Z}_M = \frac{N!}{M!(N-M)!} \mathfrak{z}(1)^M \mathfrak{z}(0)^{(N-M)} \quad (3.1)$$

dieses Systems. Im Fall des thermischen Gleichgewichtes zwischen den beiden Phasen muß das chemische Potential der Teilchen auf dem Gitter gleich dem der Teilchen in der Gasphase sein ($\mu(f) = \mu(g) =: \mu$). Damit ist es einfach, von der M -Teilchen-Zustandssumme (Gl. 3.1) zur großkanonischen Zustandssumme des Systems

$$\Xi = \sum_{M=0}^N e^{\beta\mu M} \mathfrak{Z}_M = \sum_{M=0}^N e^{\beta\mu M} \frac{N!}{M!(N-M)!} \mathfrak{z}(1)^M \mathfrak{z}(0)^{(N-M)} = (\mathfrak{z}(0) + e^{\beta\mu} \mathfrak{z}(1))^N \quad (3.2)$$

überzugehen. Dabei haben wir die Abkürzung $\beta := 1/k_B T$ eingeführt und für den letzten Schritt dieser Umformung den polynomischen Satz [48] verwendet.

Aus der großkanonischen Zustandssumme können wir die mittlere Teilchenzahl

$$\langle M \rangle = \frac{1}{\beta} \frac{\partial}{\partial \mu} \ln \Xi \quad (3.3)$$

in einem System [47] ableiten. Mit dieser Gleichung rechnen wir nun das Verhältnis der im Mittel adsorbierten Teilchen zur Gesamtzahl der Gitterplätze

$$[M] = \frac{\langle M \rangle}{N} = \frac{1}{1 + \frac{e^{-\beta\mu} \mathfrak{z}(0)}{\mathfrak{z}(1)}} \quad (3.4)$$

aus. Dieses mit $[M]$ bezeichnete Verhältnis, das wir „Konzentration“ nennen werden, ist gleich der Wahrscheinlichkeit bei einer zufälligen Auswahl eines Gitterplatzes einen besetzten Platz zu finden.

Da in der Chemie mehr mit freien Energien als mit Zustandssummen gearbeitet wird, möchten wir diese Gleichung entsprechend umformulieren. Hierzu verwenden wir die Beziehung

$$-k_B T \ln \mathfrak{z}(s) = A(s) \quad (3.5)$$

zwischen der HELMHOLTZschen freien Energie $A(s)$ eines besetzten ($s = 1$) oder unbesetzten ($s = 0$) Gitterplatzes und dessen Zustandssumme. Damit können

wir für die Konzentration der besetzten Gitterplätze auch schreiben:

$$[M] = \frac{1}{1 + e^{-\beta\mu} e^{-\beta[A(0)-A(1)]}} \quad . \quad (3.6)$$

3.1.2 Anwendung auf Ionisierungsgleichgewichte

Nachdem wir das abstrakte Modell des Gittergases formuliert haben, beschreiben wir mit dessen Hilfe ein Titrationsexperiment. Dieses Modellexperiment soll die Titrationskurve von Molekülen aufnehmen, die eine einfache Dissoziationsreaktion nach dem in Gleichung 2.1 angegebenen Schema durchführen. Für dieses Experiment sollen die untersuchten Moleküle in stark verdünnter wäßriger Lösung vorliegen.

Beginnen wir mit einer mikroskopischen Beschreibung der Zustände des Moleküls und deren Änderung bei einer Dissoziationsreaktion. Die Zahl der Freiheitsgrade (z.B. Bindungs- oder Torsionsschwingungen) eines Moleküls hängt im allgemeinen von dessen Protonierungszustand $s \in \{0, 1\}$ ab. Diese bezeichnen wir im weiteren mit $\mathcal{Q}(s)$. Jeder dieser Freiheitsgrade kann in unterschiedlichen Quantenzuständen vorliegen. Die zugehörige Quantenzahl geben wir mit l_i , $i = 1 \dots \mathcal{Q}(s)$ an. Die Energien $E_i^{\text{qself}}(s, l_i)$ dieser Quantenzustände können ebenfalls vom Protonierungszustand abhängen.

Um die Brücke zum Gittergasmodell zu schlagen, identifizieren wir zum einen die unprotonierte Form des Moleküls mit einem unbesetzten Gitterplatz und beschreiben dessen Zustandssumme als

$$\mathfrak{z}(0) = \sum_{\{l_1\}(0)} \dots \sum_{\{l_{\mathcal{Q}(0)}\}(0)} \exp \left\{ -\beta \left[\sum_{i=1}^{\mathcal{Q}(0)} E_i^{\text{qself}}(0, l_i) \right] \right\} \quad . \quad (3.7)$$

Dabei läuft die Summe $\sum_{\{l_i\}(s)}$ über alle mögliche Realisierungen der einzelnen Quantenzahlen im vorliegenden P-Zustand.

Zum anderen identifizieren wir das protonierte Molekül mit einem besetzten Gitterplatz. Auch für diesen Fall formulieren wir die Zustandssumme:

$$\mathfrak{z}(1) = \sum_{\{l_1\}(1)} \dots \sum_{\{l_{\mathcal{Q}(1)}\}(1)} \exp \left\{ -\beta \left[\sum_{i=1}^{\mathcal{Q}(1)} E_i^{\text{qself}}(1, l_i) \right] \right\} \quad . \quad (3.8)$$

Da wir das Experiment in verdünnter Lösung durchführen, werden wir der obigen Modellannahme gerecht, daß die Gitterplätze (jetzt Moleküle) nicht miteinander wechselwirken. Deshalb können wir die Zustandssumme des Gesamtsystems, wie in Gleichung 3.1, als Produkt der einzelnen Zustandssummen schreiben. Den bei

Titrationen als Parameter auftretenden pH-Wert führen wir durch seine Beziehung zum chemischen Potential des Systems (Gl. 2.5) in Gleichung 3.6 ein.

Weiterhin können wir die in Gleichung 3.6 auftretenden freien Energien durch die in den Gleichungen 3.7 und 3.8 beschriebenen Zustandssummen ausdrücken. Dabei müssen wir aber noch berücksichtigen, daß in dem Gittergasmodell die freie Energie $A(0)$ des unbesetzten Gitterplatzes auch noch die eines nicht adsorbierten Teilchens enthält. Es gilt also $A(0) = -k_B T \ln \mathfrak{z}(0) + A(H^+)$.

Betrachten wir das Experiment bei Atmosphärendruck, so können wir die Differenzen der freien Energien, wie in Abschnitt 2.3 erläutert, durch die der GIBBSschen freien Energien ersetzen. Setzen wir nun den Term $A(0) - A(1) = G(M^-) + G(H^+) - G(MH)$ in Gl. 3.6 für die mittlere Konzentration protonierter Moleküle ein, so erhalten wir mit Gl. 2.5 die bereits bekannte HENDERSON-HASSELBALCH-Titrationskurve (Gl. 2.9):

$$[MH] = \frac{1}{1 + e^{\beta k_B T \ln 10 \text{pH} - \beta [G(M^-) + G(H^+) - G(MH)]}} = \frac{1}{1 + 10^{\text{pH} - \text{pK}_a}} \quad (3.9)$$

Für den zweiten Schritt haben wir noch die Beziehung 2.6 zwischen pK_a und ΔG verwendet.

3.2 Statistische Mechanik für das Protein

Die Dissoziationsgleichgewichte für einzelne Moleküle können, wie wir eben gesehen haben, einfach im Rahmen der statistischen Mechanik beschrieben werden. In diesem Abschnitt werden wir Gleichungen für die Protonierungsgleichgewichte wechselwirkender Gruppen innerhalb eines Proteins ableiten. Auch hier wollen wir von einfachen Prinzipien der statistischen Mechanik ausgehen.

3.2.1 Energiezustände

Das hier aufgestellte Modell soll möglichst allgemein und damit unabhängig von der speziellen Wahl der Wechselwirkungsparameter¹ sein. Aus diesem Grund werden wir hier die Energierterme sehr abstrakt einführen. Wirkliche physikalische Bedeutung erhalten sie in Kapitel 4.

Unser (allgemeines) Modellprotein bestehe aus R Aminosäuren mit N protonierbaren Residuen. Diese erhalten die Indizes $i = 1 \dots N$. Alle Residuen mit unveränderlichem Protonierungszustand werden mit $i = N + 1 \dots R$ numeriert. Die KP-Zustände des Proteins werden, wie in Abschnitt 2.4 erläutert, beschrieben.

¹Diese beschreiben auch die Wechselwirkung der Gruppen mit der Umgebung.

Jedem KP-Zustand \mathbf{x}_i des Proteins wird eine Gesamtenergie $E^{\text{tot}}(\mathbf{x}_i)$ zugeordnet. Die einzelnen Komponenten dieser Energie sollen im folgenden diskutiert werden. Die paarweisen Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Aminosäuren führen zu einem Beitrag,

$$E^{\text{WW}}(\mathbf{x}_i) = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^R \sum_{\substack{j=1 \\ i \neq j}}^R E_{ij}^{\text{WW}}(s_i, \Phi_i, \varphi_i, s_j, \Phi_j, \varphi_j) \quad , \quad (3.10)$$

der von allen Koordinaten sowie den Protonierungszuständen der beiden Wechselwirkungspartner i und j abhängt.

Einen weiteren Beitrag zur Gesamtenergie eines Zustandes liefert die Wechselwirkung der einzelnen Gruppen mit der Umgebung des Proteins. Diese Größe, die wir als $E_i^{\text{eself}}(s_i, \Phi_i, \varphi_i)$ bezeichnen, hängt im allgemeinen ebenfalls von allen Koordinaten des Residuums ab. Zusätzlich kann das Dehnen von Bindungen oder Aufweiten von Bindungswinkeln zu weiteren Energiebeiträgen führen, die wir als Konformationsenergie eines einzelnen Residuums mit $E_i^{\text{ksself}}(\Phi_i)$ bezeichnen wollen und die nur von den Koordinaten der nicht-H-Atome des Residuums abhängt. Ist eine Gruppe protoniert, können unterschiedliche Positionen des H-Atoms einen analogen Beitrag $E_i^{\text{hsself}}(\varphi_i)$ erzeugen.

Den Überlegungen des letzten Absatzes liegt die Idee zugrunde, daß wir einige Freiheitsgrade voneinander separieren können. So wurde zum einen angenommen, daß die Selbstenergiebeiträge nicht durch die Wechselwirkung mit den anderen Residuen beeinflußt werden. Zum anderen wurden einzelne Freiheitsgrade als Konformationsfreiheitsgrade des Residuums ausgezeichnet. Hier gehen wir davon aus, daß ein bestimmter Konformationszustand, etwa für einen Bindungswinkel oder eine Bindungslänge, einem lokalen Minimum des zugehörigen Freiheitsgrades entspricht, um welches die ausgewählte Koordinate Schwingungen ausführt. Nehmen wir weiterhin an, daß die zu diesen Schwingungen gehörenden Potentiale nicht durch den Konformationszustand der Gruppe und die anderen Residuen beeinflußt werden, können die damit verbundenen Energien als quantenmechanische Zustände der Gruppe verstanden werden. Bezeichnen wir mit $Q_i(s_i)$ die Zahl der Freiheitsgrade des Residuums i und ordnen jedem davon eine Quantenzahl l_{ij} , $j = 1 \dots Q_i(s_i)$ zu, läßt sich der Zustand durch die Angabe aller Quantenzahlen charakterisieren. Um die Energie des Quantenzustandes zu notieren, bezeichnen wir die zu einer Quantenzahl gehörende Energie mit $E_{ij}^{\text{qsself}}(s_i, l_{ij})$. Die Energien aller quantalen Freiheitsgrade einer Gruppe liefern einen weiteren Beitrag

$$E_i^{\text{qsself}}(s_i, l_{i1} \dots l_{iQ_i(s_i)}) = \sum_{j=1}^{Q_i(s_i)} E_{ij}^{\text{qsself}}(s_i, l_{ij}) \quad (3.11)$$

zu deren Selbstenergie. Hier haben wir die Annahme gemacht, daß die Quantenzustände einer Aminosäure nur von deren Protonierungszustand abhängen. Diese

gehört, wie auch alle weiter oben gemachten Annahmen, zur gängigen Praxis bei der Durchführung von Molekulardynamik- oder Molekularmechnik-Rechnungen. Im weiteren Verlauf der Arbeit (vgl. Abschnitt 3.2.7) werden wir einen Fall kennenlernen, in dem diese Annahme nicht gültig ist.

Fassen wir die eben diskutierten Energiebeiträge zusammen, erhalten wir mit

$$E^{\text{tot}}(\mathbf{x}_i) = \sum_{i=1}^N E_i^{\text{qself}}(s_i, l_{i1} \dots l_{iQ_i(s_i)}) + E^{\text{konf}}(\mathbf{x}_i) \quad (3.12)$$

die Gesamtenergie des KP-Zustandes. Hierbei haben wir alle Summanden, die von den Konformationen der Residuen abhängen, unter

$$E^{\text{konf}}(\mathbf{x}_i) = \sum_{i=1}^R [s_i E_i^{\text{hself}}(\varphi_i) + E_i^{\text{kself}}(\Phi_i) + E_i^{\text{eself}}(s_i, \Phi_i, \varphi_i)] + \frac{1}{2} \sum_{i=1}^R \sum_{\substack{j=1 \\ i \neq j}}^R E_{ij}^{\text{WW}}(s_i, \Phi_i, \varphi_i, s_j, \Phi_j, \varphi_j) \quad (3.13)$$

als Konformationsenergie des KP-Zustandes zusammengefaßt.

3.2.2 Zustandssumme des Proteins

Mit dieser Energie für einen KP-Zustand \mathbf{x}_i können wir die Zustandssumme für unser Modellsystem bestimmen. Da wir die Ionisierungsgleichgewichte für verschiedene Protonenzahlen im Protein berechnen wollen, müssen wir im großkanonischen Ensemble rechnen.

Beginnen wir, wie in Abschnitt 3.1.2, mit der Zustandssumme für einen festen Protonierungszustand \mathbf{s} :

$$\mathfrak{z}(\mathbf{s}) = \sum_{\{l_{11}\}(s_1)} \dots \sum_{\{l_{1Q_1}(s_1)\}(s_1)} \dots \sum_{\{l_{N1}\}(s_N)} \dots \sum_{\{l_{NQ_N}(s_N)\}(s_N)} \sum_{\{\varphi_1\}} \dots \sum_{\{\varphi_N\}} \sum_{\{\Phi_1\}} \dots \sum_{\{\Phi_R\}} \exp \left\{ -\beta \left[\sum_{i=1}^N E_i^{\text{qself}}(s_i, l_{i1} \dots l_{iQ_i(s_i)}) + E^{\text{konf}}(\mathbf{s}, \Phi, \varphi) \right] \right\} \quad (3.14)$$

Da die Energiebeiträge der Quantenzustände nicht von den Konformationen und Wechselwirkungen mit anderen Residuen abhängen, können wir diese aus der Summe über die Konformationen herausnehmen und als Produkt von Exponentialfunktionen schreiben. Somit sehen wir, daß sich diese Zustandssumme als Produkt aus den Zustandssummen der Quantenzustände

$$\mathfrak{z}_i(s_i) := \sum_{\{l_{i1}\}(s_i)} \dots \sum_{\{l_{iQ_i}(s_i)\}(s_i)} \exp \{ -\beta E_i^{\text{qself}}(s_i, l_{i1} \dots l_{iQ_i(s_i)}) \} \quad (3.15)$$

und der des Konformationsraumes für den P-Zustand

$$\mathfrak{z}^{\text{konf}}(\mathbf{s}) = \sum_{\{\varphi_1\}} \dots \sum_{\{\varphi_N\}} \sum_{\{\Phi_1\}} \dots \sum_{\{\Phi_R\}} \exp\{-\beta E^{\text{konf}}(\mathbf{s}, \Phi, \varphi)\} \quad (3.16)$$

zusammensetzt.

Um auf die \mathcal{M} -Teilchen-Zustandssumme des Systems zu kommen, müssen wir Gl. 3.14 über alle P-Zustände $\{\mathbf{s}|\mathcal{M}\}$ summieren, bei denen $\mathcal{M} := \sum_{i=1}^N s_i$ Residuen protoniert sind:

$$\mathfrak{Z}_{\mathcal{M}} = \sum_{\{\mathbf{s}|\mathcal{M}\}} \left(\prod_{i=1}^N \mathfrak{z}_i(s_i) \right) \mathfrak{z}^{\text{konf}}. \quad (3.17)$$

Von hier aus können wir den Übergang zur großkanonischen Zustandssumme vollziehen:

$$\Xi' = \sum_{\mathcal{M}=0}^N e^{\beta\mu\mathcal{M}} \mathfrak{Z}_{\mathcal{M}} = \sum_{\mathcal{M}=0}^N e^{\beta\mu\mathcal{M}} \left[\sum_{\{\mathbf{s}|\mathcal{M}\}} \left(\prod_{i=1}^N \mathfrak{z}_i(s_i) \right) \mathfrak{z}^{\text{konf}}(\mathbf{s}) \right]. \quad (3.18)$$

Da wir nicht an den absoluten Werten der Zustandssumme interessiert sein werden, sondern immer nur an Verhältnissen zwischen Zustandssummen von Untersystemen, können wir Gl. 3.18 mit einer beliebigen Konstante \mathfrak{z}_0 multiplizieren. Wir wählen hier mit

$$\mathfrak{z}_0 := \left[\prod_{i=1}^N \mathfrak{z}_i(0) \right]^{-1} \quad (3.19)$$

den Kehrwert des Produktes der Zustandssummen der Quantenzustände aller unprotonierten Residuen. An der damit multiplizierten Zustandssumme

$$\Xi = \sum_{\mathcal{M}=0}^N \exp\{\beta\mu\mathcal{M}\} \left[\sum_{\{\mathbf{s}|\mathcal{M}\}} \left(\prod_{i=1}^N \frac{\mathfrak{z}_i(s_i)}{\mathfrak{z}_i(0)} \right) \mathfrak{z}^{\text{konf}}(\mathbf{s}) \right] \quad (3.20)$$

sehen wir, daß der Beitrag der Quantenzustände bei der Protonierung eines Residuums hier genauso behandelt werden kann, wie wir es in Abschnitt 3.1.2 für die Dissoziationsreaktion gleicher Moleküle in wäßriger Lösung gemacht haben.

Auf diese Weise können wir, zur Bestimmung der Zustandssumme, auf die Berechnung der freien Energien für die Protonierungsreaktionen verzichten und experimentelle Werte aus Titrationsexperimenten an Modellgruppen in wäßriger Lösung einsetzen. Um dies auszuformulieren, setzen wir zunächst wieder, wie bei der Ableitung von Gl. 3.9, unter der Annahme von Atmosphärendruck und

der Beziehung 2.6, die Zustandssummen mit den pK_a -Werten der Gruppen in Verbindung:

$$\begin{aligned} \frac{\mathfrak{z}_i(s_i)}{\mathfrak{z}_i(0)} &= \exp\{\ln \mathfrak{z}_i(s_i) - \ln \mathfrak{z}_i(0)\} = \exp\{s_i[\ln \mathfrak{z}_i(1) - \ln \mathfrak{z}_i(0)]\} \\ &= \exp\{\beta s_i \Delta G_i\} = \exp\{s_i \ln 10 pK_i^{\text{mod}}\}. \end{aligned} \quad (3.21)$$

Hierbei haben wir, ohne es extra zu erwähnen, wiederum die Zustandssumme für das noch nicht adsorbierte Proton in die der unprotonierten Aminosäure gesteckt. Die Größe pK_i^{mod} bezeichnet den „Modell- pK_a “ des Residuums i . Dieser wird, unter Verwendung der in Abschnitt 3.2.7 vorgestellten Korrekturen, aus dem experimentellen Wert pK_a^{exp} für die Modellkomponente des Residuums i im Lösungsmittel bestimmt.

Mit dieser Umschreibung führen wir nun die Energie

$$E^{\text{kp}}(\mathbf{s}, \Phi, \varphi) := -k_B T \ln 10 \sum_{i=1}^N s_i pK_i^{\text{mod}} + E^{\text{konf}}(\mathbf{s}, \Phi, \varphi) \quad (3.22)$$

für den KP-Zustand $(\mathbf{s}, \Phi, \varphi)$ ein, berechnen damit die \mathcal{M} -Teilchen-Zustandssumme (Gl. 3.17) zu

$$\mathfrak{z}_{\mathcal{M}} = \sum_{\{\mathbf{s}|\mathcal{M}\}} \sum_{\{\varphi_1\}} \dots \sum_{\{\varphi_N\}} \sum_{\{\Phi_1\}} \dots \sum_{\{\Phi_R\}} \exp\{-\beta E^{\text{kp}}(\mathbf{s}, \Phi, \varphi)\} \quad (3.23)$$

und geben schließlich die endgültige Form für die großkanonische Zustandssumme

$$\Xi = \sum_{\mathcal{M}=0}^N \exp\{\beta \mu \mathcal{M}\} \mathfrak{z}_{\mathcal{M}} \quad (3.24)$$

eines Proteins mit verschiedenen Protonierungs- und Konformationszuständen an.

Ziehen wir in Gl. 3.24 die Exponentialfunktion mit dem chemischen Potential in die Summe über die Protonierungszustände und ordnen die Summanden so, daß wir eine Summe über alle Protonierungszustände $\{\mathbf{s}\}$ erhalten, finden wir die auf traditionellem Wege abgeleitete Zustandssumme (Gl. 2.24) wieder. Auch hier wird der pH-Wert mittels Gl. 2.5 eingeführt.

Der Vorteil unserer Darstellung der Zustandssumme (Gl. 3.24) liegt in der klaren Trennung des Beitrages der Konformationen von dem des chemischen Potentials. Dadurch wird es möglich die pH-Abhängigkeit aller von Ξ abgeleiteten Größen aus den einmal berechneten \mathcal{M} -Teilchen-Zustandssummen zu ermitteln. Alle bisher gängigen Verfahren bestimmen diese Größen für jeden pH-Wert einzeln. Eine Methode, die pH-abhängige Werte mit Hilfe unserer Darstellung der Zustandssumme

(Gl. 3.24) bestimmt, wollen wir in dieser Arbeit als „ProTikKS-Methode“ bezeichnen. Dieses Akronym steht für: „Berechnung von **P**rotein-**T**itrationskurven durch **K**onformationsraum-**S**ampling“. Unsere Namensgebung ist unabhängig von dem Verfahren, mit dem die \mathcal{M} -Teilchen-Zustandssummen berechnet oder genähert werden.

Tatsächlich können die \mathcal{M} -Teilchen-Zustandssummen mit jeder geeigneten Methode bestimmt werden. In Abschnitt 5.5 werden wir sie z.B. exakt berechnen. Ist das nicht mehr möglich, können sie aber auch, wie in Abschnitt 5.6, genähert werden. Ausgehend von diesen Zustandssummen können wir das großkanonische Ensemble auswerten, um beispielsweise makroskopische Titrationskurven (vgl. Abschnitt 3.2.4) zu bestimmen. Aber wir können auch mikroskopische pK_a -Werte (vgl. Abschnitt 3.3) im kanonischen Ensemble bestimmen. Dies ist u. a. dann notwendig, wenn Prozesse untersucht werden sollen, die auf so kurzen Zeitskalen stattfinden, daß das Protein keine Protonen mit seiner Umgebung austauschen kann. Dies ist z. B. bei dem in Abschnitt 5.6.3 diskutierten Protonentransfer der Fall.

3.2.3 Titrationskurve eines Proteins

Experimentell am einfachsten zugänglich ist die Titrationskurve des gesamten Proteins. Diese gibt an, wieviele Protonen bei einem bestimmten pH-Wert im Mittel im Protein gebunden sind. Sobald die \mathcal{M} -Teilchen-Zustandssummen (Gl. 3.17) für das Protein bestimmt sind, können auch wir diese Funktion berechnen.

Die μ -abhängige Wahrscheinlichkeit²

$$\mathfrak{P}(\mathcal{M}; \mu) = \frac{e^{\beta\mu\mathcal{M}} \mathfrak{z}_{\mathcal{M}}}{\Xi} \quad (3.25)$$

\mathcal{M} Teilchen im System zu finden, ist durch die \mathcal{M} -Teilchen-Zustandssumme und die großkanonische Zustandssumme des Proteins gegeben. Für ein vorgegebenes chemisches Potential μ der Protonen berechnet sich daher die mittlere Zahl der adsorbierten Protonen zu

$$\langle \mathcal{M} \rangle(\mu) = \sum_{\mathcal{M}=0}^N \mathcal{M} \cdot \mathfrak{P}(\mathcal{M}; \mu) \quad . \quad (3.26)$$

3.2.4 Titrationskurve einzelner Residuen

Im Computerexperiment können wir aber auch auf einfache Weise den Dissoziationsgrad einer einzelnen Gruppe i in einem Protein bestimmen. Wir müssen

²Bei Wahrscheinlichkeiten wollen wir zuerst das Ereignis für dessen Eintreten sie angegeben werden, in die Klammern schreiben und den Parameter, von dem sie abhängen, hinter dem ‘;’ angeben.

hierzu die Zustandssumme $\Xi(M_iH)$ bestimmen, in der über alle Zustände summiert wird, in denen M_i protoniert ist. Da eine Gruppe entweder protoniert oder deprotoniert ist, gilt der Zusammenhang $\Xi(M_i) = \Xi - \Xi(M_iH)$.

Um die Wahrscheinlichkeit für die Protonierung einer einzelnen Gruppe zu berechnen, verwenden wir den Protonierungsvektor \mathbf{s} (Gl. 2.10) und berechnen zunächst die \mathcal{M} -Teilchen-Zustandssummen

$$\mathfrak{z}_{\mathcal{M}}(M_iH) = \sum_{\{\mathbf{s}|\mathcal{M}\}} s_i \left(\prod_{j=1}^N \exp\{s_j \ln 10 pK_i^{\text{mod}}\} \right) \mathfrak{z}^{\text{konf}}(\mathbf{s}) \quad (3.27)$$

für dieses Ereignis.

Die großkanonische Zustandssumme dafür erhalten wir dann wie gewohnt als

$$\Xi(M_iH) = \sum_{\mathcal{M}=0}^N e^{\beta\mu\mathcal{M}} \mathfrak{z}_{\mathcal{M}}(M_iH) \quad . \quad (3.28)$$

Damit können wir die Wahrscheinlichkeit

$$\mathfrak{P}(M_iH; \mu) = \frac{\Xi(M_iH)}{\Xi} \quad (3.29)$$

angeben, die Gruppe i bei vorgegebenem chemischen Potential protoniert zu finden.

Wir können auch die \mathcal{M} -Teilchen-Zustandssummen für das gleichzeitige Eintreffen zweier Ereignisse bestimmen. So erhalten wir beispielsweise aus

$$\mathfrak{z}_{\mathcal{M}}(M_iH \wedge M_j) = \sum_{\{\mathbf{s}|\mathcal{M}\}} s_i(1 - s_j) \left(\prod_{k=1}^N \exp\{s_k \ln 10 pK_k^{\text{mod}}\} \right) \mathfrak{z}^{\text{konf}}(\mathbf{s}) \quad (3.30)$$

die Zustandssummen für den Fall, daß die Gruppe i protoniert ist, während j deprotoniert vorliegt. Berechnen wir daraus die Wahrscheinlichkeit

$$\mathfrak{P}(M_iH \wedge M_j; \mu) = \frac{1}{\Xi} \sum_{\mathcal{M}=0}^N e^{\beta\mu\mathcal{M}} \mathfrak{z}_{\mathcal{M}}(M_iH \wedge M_j) \quad (3.31)$$

dieses Ereignisses, können wir mit Gl. 3.29 die bedingte Wahrscheinlichkeit

$$\mathfrak{P}(M_j | M_iH; \mu) = \frac{\mathfrak{P}(M_iH \wedge M_j; \mu)}{\mathfrak{P}(M_iH; \mu)} \quad (3.32)$$

dafür angeben, die Gruppe j deprotoniert zu finden, wenn i protoniert ist.

3.2.5 pH-Abhängigkeit anderer Größen

In unseren Computermodellen haben wir alle Informationen über die Struktur des Proteins griffbereit. Somit ist es ein Leichtes, auch die Änderungen der Struktur mit dem pH-Wert zu untersuchen.

Das Vorgehen zur Gewinnung dieser Informationen ist ganz analog zur Berechnung der Protonierungswahrscheinlichkeit einer einzelnen Gruppe (vgl. Gl. 3.29). Da strukturelle Daten im Gegensatz zu Protonierungszuständen meist nicht durch eins/null-Aussagen beschrieben werden, sondern durch mehrere diskrete Positionen oder einen kontinuierlichen Wert gegeben sein können, läßt sich die Summation nicht so allgemein fassen wie im vorangegangenen Abschnitt.

Die universelle Vorgehensweise zur Bestimmung pH-abhängiger Eigenschaften eines Proteins lautet wie folgt: Wir bestimmen zunächst die \mathcal{M} -Teilchen-Zustandssummen über all diejenigen Subzustände, in denen ein bestimmtes Ereignis realisiert ist. Im nächsten Schritt wird aus diesen \mathcal{M} -Teilchen-Zustandssummen die großkanonische Zustandssumme des Ereignisses berechnet, um schließlich dessen Wahrscheinlichkeit bei einem vorgegebenen pH-Wert anzugeben. Aus diesen Wahrscheinlichkeiten lassen sich auch Korrelationen zwischen Protonierungen und Konformationen oder Konformationen untereinander ermitteln (wie z. B. in Abschnitt 5.6.2 angewendet).

3.2.6 Verteilung der Protonierungszustände

Die Zustandssumme $\mathfrak{z}(\mathbf{s})$ für einen Protonierungszustand \mathbf{s} ist durch die pK_a -Werte aller in diesem Zustand protonierten Gruppen und dessen Konfigurationszustandssumme $\mathfrak{z}^{\text{konf}}(\mathbf{s})$ bestimmt. Die Wahrscheinlichkeit, einen Protonierungszustand \mathbf{s} zu finden, ist durch

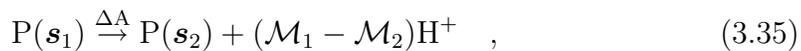
$$\mathfrak{P}(\mathbf{s}; \mu) = \frac{1}{\Xi} \left[\exp\{\beta\mu\mathcal{M}\} \left(\prod_{i=1}^N \exp\{s_i \ln 10 \text{pK}_i^{\text{mod}}\} \right) \mathfrak{z}^{\text{konf}}(\mathbf{s}_i) \right] \quad (3.33)$$

gegeben. Das Verhältnis der Wahrscheinlichkeiten zweier verschiedener Protonierungszustände \mathbf{s}_1 und \mathbf{s}_2

$$\frac{\mathfrak{P}(\mathbf{s}_1; \mu)}{\mathfrak{P}(\mathbf{s}_2; \mu)} = \frac{\exp\{\beta\mu\mathcal{M}_1\} \prod_{i=1}^N \exp\{(\mathbf{s}_1)_i \ln 10 \text{pK}_i^{\text{mod}}\} \mathfrak{z}^{\text{konf}}(\mathbf{s}_1)}{\exp\{\beta\mu\mathcal{M}_2\} \prod_{i=1}^N \exp\{(\mathbf{s}_2)_i \ln 10 \text{pK}_i^{\text{mod}}\} \mathfrak{z}^{\text{konf}}(\mathbf{s}_2)} \quad (3.34)$$

ist somit durch das Verhältnis ihrer Zustandssummen bestimmt.

Bezeichnen wir das Protein im P-Zustand \mathbf{s} mit $\text{P}(\mathbf{s})$ und betrachten den Übergang des Proteins zwischen den beiden Zuständen als chemische Reaktion



steht dieses Verhältnis in Beziehung zur Änderung der freien Energie bei der Reaktion:

$$\begin{aligned} k_B T \ln \left(\frac{\mathfrak{P}(\mathbf{s}_1; \mu)}{\mathfrak{P}(\mathbf{s}_2; \mu)} \right) &= k_B T \ln \left(\frac{\exp\{\beta\mu\mathcal{M}_1\}}{\exp\{\beta\mu\mathcal{M}_2\}} \right) + \\ k_B T \ln \left(\frac{\prod_{i=1}^N \exp\{(\mathbf{s}_1)_i \ln 10 \text{pK}_i^{\text{mod}}\} \mathfrak{z}^{\text{konf}}(\mathbf{s}_1)}{\prod_{i=1}^N \exp\{(\mathbf{s}_2)_i \ln 10 \text{pK}_i^{\text{mod}}\} \mathfrak{z}^{\text{konf}}(\mathbf{s}_2)} \right) &= \mu(\mathcal{M}_1 - \mathcal{M}_2) + \underbrace{A(\mathbf{s}_2) - A(\mathbf{s}_1)}_{=\Delta A}. \end{aligned} \quad (3.36)$$

Die HELMHOLTZschen freien Energien $A(\mathbf{s})$ sind hierbei nur durch pK_a -Werte der protonierten Gruppen und die Konformationsenergien des jeweiligen P-Zustandes bestimmt.

Analog zur Definition der Gleichgewichtskonstante K in Gl. 2.3 können wir nun Gleichgewichtskonstanten

$$K_{\mathbf{s}_1, \mathbf{s}_2} := \frac{\mathfrak{P}(\mathbf{s}_1; \mu)}{\mathfrak{P}(\mathbf{s}_2; \mu)} = \exp\{\beta(\mu(\mathcal{M}_1 - \mathcal{M}_2) + \Delta A)\} \quad (3.37)$$

zwischen den P-Zuständen des Proteins definieren.

Mit diesen Konstanten lassen sich die Protonierungsgleichgewichte zwischen allen protonierbaren Gruppen in einem Protein beschreiben. Ein Protein mit drei solchen Gruppen besitzt acht unterschiedliche P-Zustände, die durch den Protonierungsvektor \mathbf{s} angegeben werden. Diese Zustände haben wir in Abbildung 3.2 notiert und alle mit gestrichelten Linien verbunden. Jeder dieser 28 Linien ist eine Gleichgewichtskonstante zugeordnet.

Ein Protein mit N protonierbaren Gruppen kann 2^N Zustände einnehmen. Dementsprechend können $2^N(2^N - 1)/2$ Gleichgewichtskonstanten angegeben werden. Von diesen sind aber nur $2^N - 1$ voneinander unabhängig.

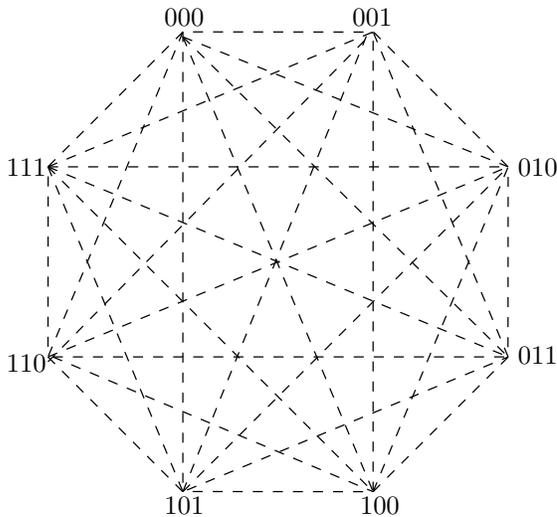


Abbildung 3.2: Graph der Protonierungszustände eines Proteins mit drei protonierbaren Gruppen. Jede Ziffer gibt den P-Zustand (0,1) einer Gruppe an. Das Verhältnis der Konzentrationen je zweier Zustände ist durch eine Gleichgewichtskonstante gegeben. Alle vorkommenden Gleichgewichtskonstanten sind hier durch gestrichelte Linien symbolisiert.

Um diese Aussage zu begründen, interpretieren wir die möglichen P-Zustände als Knoten und die Verbindungen zwischen ihnen als Kanten eines Graphen \mathcal{G} . Nun verbinden wir alle 2^N Knoten so miteinander, daß ein Baum von \mathcal{G} entsteht. Ein solcher Baum besitzt genau $2^N - 1$ Kanten. Fügen wir nun eine weitere Kante ein, erhalten wir einen Kreis in diesem Baum. Wenn dieser n Knoten enthält, wollen wir die zugehörigen P-Zustände mit 1 bis n indizieren. Jeder Kante in diesem Kreis kann eine Gleichgewichtskonstante $K_{i,j} = \mathfrak{P}(\mathbf{s}_i)/\mathfrak{P}(\mathbf{s}_j)$ zugeordnet werden. Nehmen wir nun die $n - 1$ Konstanten $K_{1,2} \dots K_{n-1,n}$ als gegeben, können wir daraus $K_{n,1}$ bestimmen:

$$K_{n,1} = \frac{\mathfrak{P}(\mathbf{s}_n)}{\mathfrak{P}(\mathbf{s}_1)} = \underbrace{\frac{\mathfrak{P}(\mathbf{s}_n)}{\mathfrak{P}(\mathbf{s}_{n-1})}}_{=K_{n-1,n}^{-1}} \underbrace{\frac{\mathfrak{P}(\mathbf{s}_{n-1})}{\mathfrak{P}(\mathbf{s}_{n-2})}}_{=K_{n-2,n-1}^{-1}} \underbrace{\frac{\mathfrak{P}(\mathbf{s}_{n-2})}{\mathfrak{P}(\mathbf{s}_{n-3})}}_{=K_{n-3,n-2}^{-1}} \dots \underbrace{\frac{\mathfrak{P}(\mathbf{s}_3)}{\mathfrak{P}(\mathbf{s}_2)}}_{=K_{2,3}^{-1}} \underbrace{\frac{\mathfrak{P}(\mathbf{s}_2)}{\mathfrak{P}(\mathbf{s}_1)}}_{=K_{1,2}^{-1}} \quad (3.38)$$

Diese Gleichgewichtskonstante ist der zusätzlichen n -ten Linie zugeordnet. Sie kann anhand der bereits vorher vorhandenen Linien, die diesen Kreis bilden, berechnet werden. Durch schrittweises Verbinden aller noch nicht direkt miteinander verbundenen Knoten werden somit alle im ursprünglichen Baum fehlenden Gleichgewichtskonstanten bestimmt.

Ein Graph mit n Knoten besitzt nach dem Satz von Cayley n^{n-2} verschiedene Bäume [49]. Zu dem in Abbildung 3.2 dargestellten Beispiel dreier protonierbarer Gruppen existieren daher bereits 8^6 unterschiedliche Bäume. Welchen Baum wir aus dieser großen Vielfalt wählen, ist uns grundsätzlich freigestellt. Unter Umständen definieren bereits experimentelle Tatsachen den am besten zu verwendenden Baum.

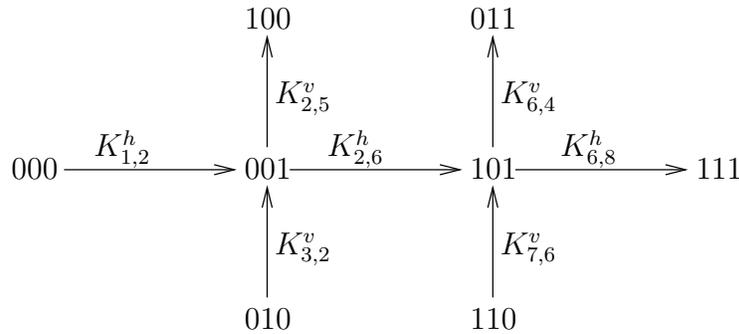


Abbildung 3.3: Möglicher Baum des Graphen aus Abbildung 3.2. In dieser Darstellung können „vertikale“ Gleichgewichtskonzentrationen (oberer Index v) zwischen Zuständen mit gleicher Teilchenzahl, von „horizontalen“ Gleichgewichtskonzentrationen (oberer Index h) zwischen Zuständen mit unterschiedlichen Protonenzahlen unterschieden werden.

Betrachten wir beispielsweise den Baum aus Abbildung 3.3. Hier erkennen wir besonders gut, daß bei den Protonierungsreaktionen im Protein zwei Typen unterschieden werden können. Die horizontalen Linien stehen für Reaktionen, bei

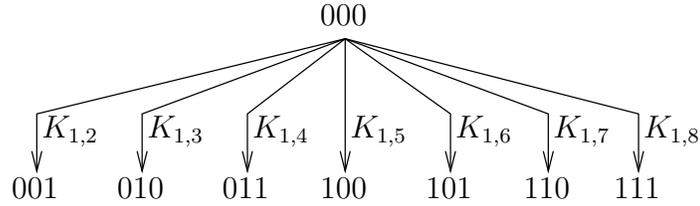


Abbildung 3.4: Alternativer Baum des Graphen aus Abbildung 3.2. Hier sind alle Gleichgewichtskonstanten auf den deprotonierten Grundzustand bezogen.

denen Protonen aus dem Lösungsmittel aufgenommen oder abgegeben werden. Die Gleichgewichtskonstanten hängen in diesen Fällen vom chemischen Potential des Protons ab:

$$K_{ij}^h = \exp\{\beta(\mu(\mathcal{M}_i - \mathcal{M}_j) + \Delta A)\}. \quad (3.39)$$

Die vertikalen Linien beschreiben hingegen den Wechsel von Protonierungsplätzen bei fester Protonenzahl im Protein. Diese Reaktionen werden daher nicht vom chemischen Potential der Protonen beeinflusst und hängen nur von den \mathcal{M} -Teilchen-Zustandssummen beziehungsweise den zugehörigen freien Energien der Protonierungszustände ab:

$$K_{ij}^v = \exp\{\Delta A\}. \quad (3.40)$$

Der in Abbildung 3.4 dargestellte Baum führt auf eine einfache Gleichung, um alle acht Konzentrationen aus den sieben vorgegebenen Gleichgewichtskonstanten zu berechnen. In dieser Form wurden alle Gleichgewichtskonstanten auf den deprotonierten Grundzustand \mathbf{s}_1 bezogen. Allgemein erhalten wir bei N P-Zuständen $N - 1$ Gleichungen der Form

$$\mathfrak{P}(\mathbf{s}_i) = \mathfrak{P}(\mathbf{s}_1) K_{1,i}^{-1} \quad i = 2 \dots N \quad (3.41)$$

für die Zustände \mathbf{s}_2 bis \mathbf{s}_N . Die Wahrscheinlichkeit für den Grundzustand bestimmen wir aus der Normierung $\sum_{i=1}^N \mathfrak{P}(\mathbf{s}_i) = 1$ zu

$$\mathfrak{P}(\mathbf{s}_1) = \frac{1}{1 + \sum_{i=2}^N K_{1,i}^{-1}} \quad (3.42)$$

Damit können wir alle unbekanntenen Werte in Gleichung 3.41 berechnen und erhalten die Konzentrationen aller P-Zustände.

3.2.7 Verwendung von Modell-pK_a's

Bereits in Abschnitt 2.2.1 dieser Arbeit haben wir die Verwendung von experimentellen pK_a-Werten als wesentliches Konzept zur Berechnung von Ionisierungsgleichgewichten in Proteinen kennengelernt. Durch die Verwendung gemessener

Daten kann auf die sehr aufwendigen numerischen Rechnungen zur Bestimmung der GIBBSschen freien Energieänderung bei Dissoziationsreaktionen verzichtet werden.

Da sich die Umgebung einer Aminosäure im Protein sehr stark von der in wäßriger Lösung unterscheidet, darf in die Gleichungen 3.24 bzw. 2.24 nicht direkt der experimentelle Wert für den Modell-pK_a eingesetzt werden. In Abschnitt 2.2.1 wurde bereits anhand des thermodynamischen Zyklus (Abbildung 2.2) gezeigt, wie der gemessene Wert modifiziert werden muß, um den veränderten Solvatisierungsenergien von saurer und basischer Form des Moleküls im Protein Rechnung zu tragen.

Für die von uns aus der statistischen Mechanik abgeleitete Form der Zustandssumme (Gl. 3.24) machen wir die gleiche Korrektur, indem wir ähnlich wie in Gl. 2.15

$$\text{pK}_i^{\text{mod}} := \text{pK}_i^{\text{exp}} - \frac{1}{k_B T \ln 10} \Delta E_i^{\text{solv}} = \text{pK}_i^{\text{exp}} - \frac{1}{k_B T \ln 10} (E_i^{\text{solv}}(M_i) - E_i^{\text{solv}}(M_i\text{H})) \quad (3.43)$$

definieren. Hierbei haben wir den pK_a-Wert aber nur um den Einfluß der Lösungsumgebung ΔE_i^{solv} korrigiert. Die Wechselwirkung der Gruppe mit dem Protein werden wir später explizit hinzunehmen. Diese bekannte Korrektur gilt aber strenggenommen nur dann, wenn das Modellmolekül im Lösungsmittel in einer einzigen Konfiguration vorliegt. Da dies nicht immer der Fall ist, werden wir uns nun überlegen, wie wir den Transfer vom Solvent zum Protein dann richtig beschreiben können.

Alexov und Gunner [21] stellten fest, daß durch die Berücksichtigung mehrerer Konformationen für die H-Atome im Protein die Entropie der protonierten Gruppe gegenüber der unprotonierten vergrößert wird. Als Konsequenz führten sie einen Faktor ein, der diesen Beitrag aus der Zustandssumme ihres Systems eliminiert. So kann es aber im Protein keinen entropischen Beitrag zu den freien Energien von saurer oder basischer Form eines Residuums geben. Die Idee, alle möglichen Positionen für das Proton zu berücksichtigen, beruht aber u. a. auf der Überlegung, daß unterschiedliche Konformationsräume im Lösungsmittel und im Protein und somit auch verschiedene Entropiebeiträge zu unterschiedlichen pK_a-Werten der Gruppe in differierenden Umgebungen beitragen. Aufgrund dieses Widerspruchs werden wir von dieser Vorgehensweise Abstand nehmen.

Hieraus folgt aber nicht, daß keine weiteren Korrekturen des experimentellen Wertes notwendig wären. Unser Ziel ist es, die Entropiebeiträge im Protein gänzlich zu berücksichtigen. Wir wollen dort also keine erzwungene Entropiekorrektur durchführen. Im Protein kann das Proton in mehreren Konformationszuständen, die sich im allgemeinen energetisch unterscheiden werden, vorliegen. Das bewirkt einen Beitrag zur Entropie des protonierten Zustandes. Erinnern wir uns an die Ableitung der Zustandssumme (Gl. 3.24). Dabei wurden mehr oder weniger

willkürlich Freiheitsgrade der Residuen separiert und explizit in der Konformationszustandssumme $\mathfrak{z}^{\text{konf}}$ berücksichtigt. Alle übrigen Freiheitsgrade haben wir als Quantenzustände bezeichnet und schließlich mit dem Modell- pK_a^{mod} -Wert der Gruppe identifiziert. Analog können wir die folgende Beschreibung der Situation wählen.

Der pK_a^{mod} gibt die freie Energie für die Protonierung des Residuums in dem Konformationszustand an, in dem alle explizit berücksichtigten Freiheitsgrade den Zustand mit der niedrigsten Konformationsenergie besetzen. Alle weiteren Zustände entstehen in unserem Modell durch eine Änderung der Koordinaten der letztgenannten Freiheitsgrade. Auf diese Weise erhalten wir den Entropiebeitrag dieser Freiheitsgrade im Protein.

Messen wir einen pK_a -Wert, so wird sich auch das Modellmolekül im Lösungsmittel im allgemeinen nicht in einem einzigen Konformationszustand befinden. Der experimentelle Wert repräsentiert in diesem Fall nicht nur die Protonierung im energetisch niedrigsten Konformationszustand, sondern enthält ebenso wie der pK_a -Wert im Protein zusätzliche entropische Beiträge. Diese Tatsache bietet grundsätzlich Anlaß zu zwei Fehlern, die wir machen können, wenn wir den gemessenen Wert im Proteinmodell verwenden. Erstens: Wir berücksichtigen einen Freiheitsgrad im Protein explizit, der auch zum Lösungsmittelwert beiträgt. Dies gilt insbesondere für den Konformationsraum des Protons und führt dazu, daß dieser Beitrag doppelt gezählt wird (Lösungsmittel+Protein). Zweitens: Wir berücksichtigen einen Freiheitsgrad im Protein nicht explizit, der im Lösungsmittel wesentlich ist. Sind die Beiträge eines solchen Freiheitsgrades zur freien Energie im Protein und im Solvent gleich, ist die Beschreibung durch den experimentellen pK_a -Wert richtig. Unterscheiden sich aber die zugänglichen Konfigurationsräume dieses Freiheitsgrades im Protein und im Lösungsmittel, ist die Beschreibung nicht mehr korrekt und der Modell- pK_a muß weiter korrigiert werden.

Um diese beiden Fälle genauer zu analysieren, betrachten wir noch einmal die statistische Mechanik eines Titrationsexperimentes (vgl. Abschnitt 3.1.2). Die Änderung der GIBBSschen freien Energie ist durch die Zustandssummen von protoniertem (MH) und dissoziiertem Molekül (M)

$$\Delta G = -k_B T \ln \frac{\mathfrak{z}(\text{M})}{\mathfrak{z}(\text{MH})} + k_B T \ln \mathfrak{z}^{\text{H}} - k_B T \ln \frac{\mathfrak{z}^{\text{konf}}(\text{M})}{\mathfrak{z}^{\text{konf}}(\text{MH})} \quad (3.44)$$

gegeben. Dabei haben wir die Zustandssummen für die Bindungsfreiheitsgrade des Protons \mathfrak{z}^{H} sowie einen weiteren Konformationsfreiheitsgrad $\mathfrak{z}^{\text{konf}}$ abgesondert.

An Gleichung 3.44 erkennen wir unmittelbar, wie der gemessene pK_a -Wert korrigiert werden muß. Der Beitrag des Protons ist durch den Logarithmus der Zustandssumme für dessen Bindungsfreiheitsgrade gegeben. Dieser Beitrag muß von dem gemessenen Wert abgezogen werden. In vielen Fällen kann der Korrekturterm aus einfachen chemischen Überlegungen in guter Näherung angegeben werden.

Gibt es beispielsweise n energetisch gleichwertige Protonierungsstellen an einem Molekül, muß von dem gemessenen pK_a -Wert $k_B T \log n$ abgezogen werden.

Die Diskussion des dritten Summanden in Gl. 3.44 gestaltet sich meistens nicht ganz so einfach. Denn dazu ist die Kenntnis aller Freiheitsgrade und der zugehörigen Potentiallandschaften eines Moleküls notwendig. Vereinfachend wirkt sich allerdings aus, daß nur die Beiträge von Freiheitsgraden berücksichtigt werden müssen, deren Konformationsraum vom Protonierungszustand der Gruppe abhängt. Finden wir aber solche, müssen wir sie entweder explizit in unserem Proteinmodell berücksichtigen oder genau untersuchen, wie die Proteinumgebung diesen Freiheitsgrad beeinflusst. Nehmen wir diesen Freiheitsgrad explizit mit, müssen wir den Term $-k_B T \ln(\mathfrak{z}^{\text{konf}}(\text{M})/\mathfrak{z}^{\text{konf}}(\text{MH}))$ vom Modell- pK_a abziehen, andernfalls muß ein Korrekturterm ermittelt werden, welcher der Bindung der Gruppe im Protein gerecht wird.

Zusammenfassend können wir den Zusammenhang zwischen dem experimentellen und dem Modell- pK_a wie folgt beschreiben:

$$\text{pK}_i^{\text{mod}} = \text{pK}_i^{\text{exp}} - \frac{1}{k_B T \ln 10} \left[\Delta E_i^{\text{solv}} - k_B T \ln \mathfrak{z}^{\text{H}} + k_B T \ln \frac{\mathfrak{z}^{\text{konf}}(\text{M}_i)}{\mathfrak{z}^{\text{konf}}(\text{M}_i\text{H})} \right]. \quad (3.45)$$

Als in diesem Zusammenhang besonders relevant haben sich bei unseren Untersuchungen die internen Rotationen von Molekülen erwiesen [50]. Betrachten wir beispielsweise den in Abbildung 3.5 dargestellten Chromophor des GFP. Hier ist die Barriere für die Verdrehung des Tyrosinringes gegenüber dem Heterozyklus abhängig vom Protonierungszustand der Phenolgruppe. Die durch die Protonierung auftretende Verschiebung der Bindungsordnungen führt dazu, daß diese Rotationsbarriere im protonierten Zustand sehr viel geringer ist als im deprotonierten [51] (vgl. Abschnitt 5.2.2).

Befindet sich das Molekül im Lösungsmittel, ist diese Rotation nahezu ungehindert möglich. Im Protein wird diese jedoch durch die Umgebung des Chromophors gehindert [52] und erhält dadurch eine sehr hohe Barriere. Dieser Freiheitsgrad kann deshalb im Lösungsmittel einen größeren Beitrag zur freien Energie der Protonierungsreaktion leisten als im Protein. Als Konsequenz verringert sich der pK_a -Wert dieses Moleküls im Protein im Vergleich zum Lösungsmittel- pK_a .

In einem vereinfachten Modell beschreiben wir den rotierenden Ring als symmetrischen Körper der an einem starren Rahmen befestigt ist und modellieren das Ausfrieren des Freiheitsgrades als Übergang vom freien Rotor zum harmonischen Oszillator. Aus den Tabellen von Pitzer und Gwinn [53] können wir eine Änderung der freien Energie von $\Delta A \approx -2.7 k_B T$ abschätzen.

Noch genauer werden wir diese Energieänderung in Abschnitt 5.2.2 bestimmen. Dort werden wir mit den Ergebnissen quantenchemischer Rechnungen das Konfigurationsintegral [40] für den Chromophor berechnen. Solche Methoden sind mit

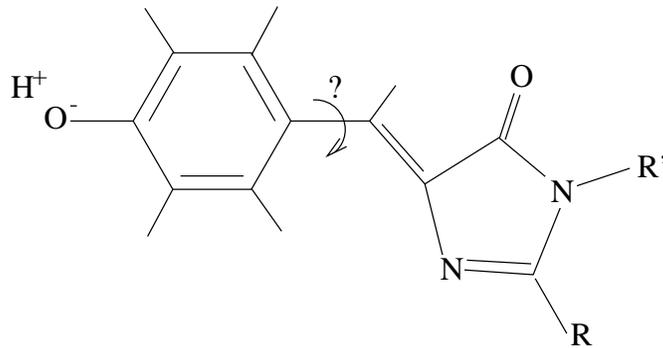


Abbildung 3.5: Der Chromophor des GFP bindet bei R und R' an das Protein. Das '?' kennzeichnet die Bindung, um die eine Drehung stattfinden kann, falls das Sauerstoffatom O^- protoniert ist.

einem hohen Rechenaufwand verbunden und oft ist eine einfache Abschätzung, wie die obige, ausreichend. K. Pitzer und seine Mitarbeiter geben in den Arbeiten [53–56] sehr klare und saubere Darstellungen über den Einfluß von internen Rotationen auf die thermodynamischen Funktionen von Molekülen.

Bei dem GFP-Fluorophor haben wir einen Freiheitsgrad, dessen Konfigurationsraum vom Protonierungszustand abhängt, identifiziert und eine Korrektur der freien Energie von etwa $2.7 k_B T$ erhalten. Bei Molekülen mit mehreren solchen Freiheitsgraden erwarten wir einen noch stärkeren Einfluß auf die pK_a -Verschiebung zwischen einem Molekül in wäßriger Lösung und im Protein. Diese Korrektur wird daher auch bei der Bestimmung des pK_a -Wertes der protonierten Schiff-Base im lichtgetriebenen Protonenpumpzyklus im BR wichtig.

Quantenchemische Rechnungen haben gezeigt, daß der Retinal-Farbstoff sogar vier protonierungsabhängige Freiheitsgrade besitzt [57, 58]. Nach diesen Rechnungen sind die Torsionsbarrieren um die Einzelbindungen im protonierten Zustand hoch und im deprotonierten niedrig. Im BR sind die Rotationen wiederum gehindert. Somit wird das Dissoziationsgleichgewicht der Schiff-Base im Protein zum protonierten Zustand hin verschoben und der Solvent- pK_a wird niedriger liegen als der Wert im Protein. Damit ist die Richtung dieser Verschiebung konsistent mit experimentellen Daten [59]. Aber auch die funktionellen Eigenschaften von Tetrapyrrolen in Antennen- und Sensorpigmenten [60] oder des Chromophors im PYP [61, 62] sind durch ihren Protonierungszustand bestimmt.

Am Ende dieses Abschnitts sei uns noch eine Anmerkung zu der Wortwahl „Entropiekorrektur“ gestattet. Wir haben uns dieser Nomenklatur angepaßt, da sie in der Literatur verbreitet und kürzer als etwa „Korrektur der Änderung der GIBBSschen freien Energie“ ist. Tatsächlich wäre letztere angebracht, da die GIBBSsche freie Energie in jedem Fall um den Logarithmus einer Zustandssumme korrigiert wird. Dieser trägt im allgemeinen sowohl zur Entropie als auch zur mittleren Energie eines Systems bei. Nur im einfachsten Fall, wenn alle möglichen Konformationszustände energetisch entartet sind, handelt es sich um eine reine Entropiekorrektur.

3.3 Anormale Titrationskurven

In den vorangegangenen Teilen dieser Arbeit haben wir uns die theoretischen Grundlagen erarbeitet, um für ein Protein mit mehreren KP-Freiheitsgraden die Energien der Mikrozustände, die Zustandssumme und somit alle thermodynamischen Eigenschaften zu bestimmen. Damit sind wir in der Lage Titrationskurven für Gruppen innerhalb einer Proteinumgebung zu bestimmen, wobei die Wechselwirkungen von vielen protonierbaren Gruppen berücksichtigt werden.

Da diese Wechselwirkungen im allgemeinen vom pH-Wert abhängen, erwarten wir im Protein Titrationskurven, die sich deutlich von den, durch die HENDERSON-HASSELBALCH-Gleichung (2.8) beschriebenen, Funktionen (2.9) unterscheiden. Es ist interessant zu bemerken, daß in Experimenten oder theoretischen Rechnungen, zum Titrationsverhalten von Gruppen in Proteinen, häufig Funktionen gefunden werden, die sich sehr gut an Gl. 2.8 anpassen lassen und somit durch einen pK_a beschrieben werden können. Daher spricht man in diesen Fällen auch von „normalen“ Titrationskurven und bezeichnet den zugehörigen pK_a -Wert als „apparenten“ pK_a der Gruppe im Protein.

Im Gegensatz dazu treten Titrationskurven, bei denen die Wechselwirkungen der protonierbaren Residuen untereinander deutlich werden, eher selten auf. Ein solches Verhalten nennt man dann „anormale“ oder „irreguläre“ Titration [63]. Residuen, deren Titrationskurve nicht durch eine HENDERSON-HASSELBALCH-Kurve und somit einen einzigen pK_a -Wert beschrieben werden können, finden sich beispielsweise im photosynthetischen Reaktionszentrum [36, 38] und im BR [41, 64]. Um uns ein tieferes Verständnis für das Zustandekommen dieser irregulären Titrationskurven zu erarbeiten, betrachten wir ein einfaches Modellprotein, das nur zwei protonierbare Gruppe enthält.

Wir wollen die beiden Residuen mit M_i und deren Protonierungszustand mit s_i , $i \in \{1, 2\}$, bezeichnen. Ihre Wechselwirkungsenergie hängt von den beiden Protonierungszuständen ab und ist durch

$$E(s_1, s_2) = s_1 s_2 [E(1, 1) - E(1, 0) - E(0, 1) + E(0, 0)] \\ + s_1 [E(1, 0) - E(0, 0)] + s_2 [E(0, 1) - E(0, 0)] + E(0, 0) \quad (3.46)$$

gegeben. Den pK_a^{mod} -Wert der Gruppe i (vgl. Abschnitt 3.2.7), die Wechselwirkungen der Gruppe i mit der restlichen Umgebung und den nur vom Protonierungszustand s_i abhängigen Term aus Gl. 3.46 fassen wir im intrinsischen pK_i^{int} -Wert der Gruppe zusammen. Damit steht dieser Wert für den pK_a -Wert der Gruppe im Protein unter der Bedingung, daß die andere nicht protoniert ist (vgl. Abschnitt 2.2.1). Der von $s_1 s_2$ abhängige Term wird wie üblich (vgl. z. B. Ref. [22, 34]) als Wechselwirkungsterm

$$W := \frac{1}{k_B T \ln 10} [E(1, 1) - E(1, 0) - E(0, 1) + E(0, 0)] \quad (3.47)$$

definiert³. Ziehen wir von $E(s_1, s_2)$ in Gl. 3.46 den letzten Summanden ab, haben wir die Wechselwirkungsenergie auf den deprotonierten Grundzustand bezogen und können $E^{\text{konf}}(s_1, s_2) = k_B T \ln 10 W$ in Gl. 3.22 als Konformationsenergie einführen. Damit lautet die großkanonische Zustandssumme (Gl. 3.24) unseres Modells:

$$\Xi = 1 + \exp\{-\ln 10(\text{pH} - \text{pK}_1^{\text{int}})\} + \exp\{-\ln 10(\text{pH} - \text{pK}_2^{\text{int}})\} \\ + \exp\{-\ln 10(2\text{pH} - \text{pK}_1^{\text{int}} - \text{pK}_2^{\text{int}} + W)\}. \quad (3.48)$$

Mit dieser Normierung können wir die Wahrscheinlichkeit

$$\mathfrak{P}(M_1\text{H}; \text{pH}) = \frac{1}{\Xi} [\exp\{-\ln 10(\text{pH} - \text{pK}_1^{\text{int}})\} + \\ \exp\{-\ln 10(2\text{pH} - \text{pK}_1^{\text{int}} - \text{pK}_2^{\text{int}} + W)\}] \quad (3.49)$$

angeben, die Gruppe M_1 im Protein protoniert zu finden. Diese ist gleich der Konzentration $[M_1\text{H}]$ der protonierten Form des Residuums 1 im Gesamtsystem. Der Graph dieser pH-abhängigen Funktion ergibt die Titrationskurve der Gruppe im Protein. Analog können wir die Wahrscheinlichkeit

$$\mathfrak{P}(M_1; \text{pH}) = \frac{1}{\Xi} [1 + \exp\{-\ln 10(\text{pH} - \text{pK}_2)\}] \quad (3.50)$$

angeben, die Gruppe 1 deprotoniert zu finden.

In Teilbild A) der Abbildung 3.6 ist die Wahrscheinlichkeit, Gruppe 1 protoniert zu finden, für zwei Residuen mit gleichen $\text{pK}_a^{\text{int}} = 2$ Werten und verschiedenen starken Wechselwirkungen nach Gl. 3.49 dargestellt. Wir sehen, daß sich die Kurve mit größer werdender Wechselwirkung zunehmend von der HENDERSON-HASSELBALCH-Kurve ($W = 0$) unterscheidet. Die Graphen der Funktion für $W > 0$ lassen sich nicht mehr durch nur einen pK_a -Wert beschreiben. Für größere Wechselwirkungen läßt sich die Funktion in drei Teile unterscheiden. Bei großen und kleinen pH-Werten sehen wir zwei monoton fallende sigmoide Funktionen, die ein Plateau einschließen⁴.

Um die Bedeutung dieser Bereiche zu diskutieren, gehen wir von dem, in Abbildung 3.7 dargestellten, Reaktionsschema für eine zweibasige Säure aus. Dort sind die vier Protonierungszustände und die Gleichgewichtskonstanten K_i dargestellt, welche die Dissoziationsreaktionen zwischen jeweils zwei Zuständen bestimmen. In der rechten Hälfte dieser Abbildung sind die Zusammenhänge zwischen den Gleichgewichtskonstanten und den Konzentrationen der Zustände aufgeführt. Diese Konstanten und die zugehörigen pK_a -Werte ($\text{pK}_i = -\log K_i$) wollen wir als „mikroskopische“ Größen bezeichnen.

³Diese Definition begründet auch die Verwendung von 'pK-Einheiten' für die Energie: 1 pK-Einheit = $k_B T \ln 10$.

⁴Das Plateau ist nicht wirklich horizontal. Auch in diesem Bereich ist die Funktion monoton fallend.

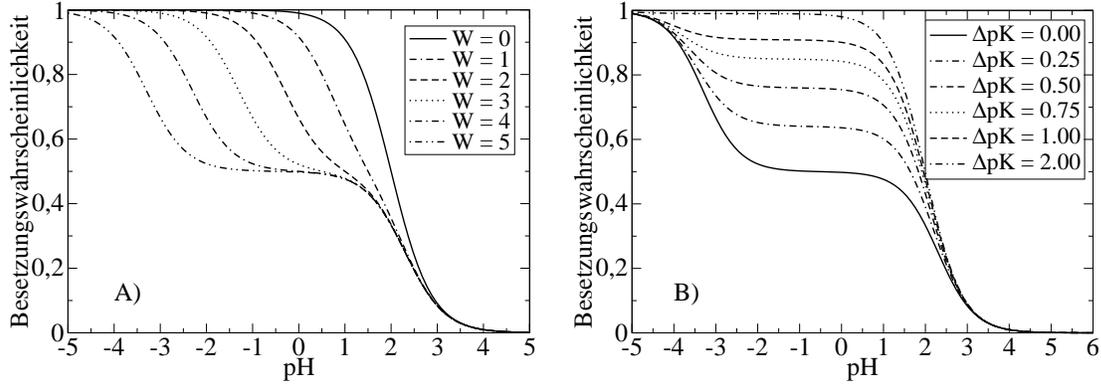


Abbildung 3.6: In beiden Diagrammen ist die Wahrscheinlichkeit angegeben, Gruppe 1 des Modellproteins protoniert zu finden. Teilbild A) zeigt das anormale Titrationsverhalten dieser Gruppe, wenn beide Gruppen den Wert $pK_a^{\text{int}} = 2$ besitzen, für verschiedene Wechselwirkungen W . Deren Werte sind in der Legende in pK Einheiten angegeben. In Teilbild B) wird die anormale Titrationskurve für $W = 5$ pK-Einheiten und verschiedene Differenzen $\Delta pK = pK_1 - pK_2$, die in der Legende angegeben sind, dargestellt.

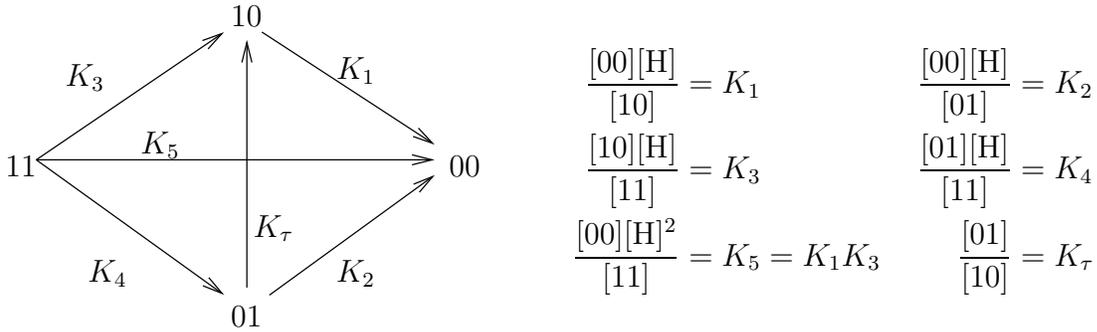


Abbildung 3.7: Reaktionsschema für eine zweibasige Säure. Der P-Zustand des Systems ist durch die Ziffern angegeben. Die Pfeile zeigen die Richtungen der Reaktionen an, für die die Gleichgewichtskonstanten K_i definiert sind. Im rechten Teil der Graphik sind die Zusammenhänge zwischen diesen Konstanten, der Protonenkonzentration $[H]$ und den Konzentrationen der P-Zustände angegeben.

Aus der Zustandssumme (Gl. 3.48) des Systems lassen sich die Wahrscheinlichkeiten bzw. Konzentrationen der einzelnen Zustände ableiten:

$$[00] = \frac{1}{[H]} \quad (3.51)$$

$$[10] = \frac{1}{[H]} \exp\{-\ln 10(\text{pH} - \text{p}K_1^{\text{int}})\} \quad (3.52)$$

$$[01] = \frac{1}{[H]} \exp\{-\ln 10(\text{pH} - \text{p}K_2^{\text{int}})\} \quad (3.53)$$

$$[11] = \exp\{-\ln 10(2\text{pH} - \text{p}K_1^{\text{int}} - \text{p}K_2^{\text{int}} + W)\}. \quad (3.54)$$

Hieran können wir unmittelbar die Zusammenhänge $K_4 = K_1 K_W$ und $K_3 = K_2 K_W$, mit $K_W = 10^W$, erkennen. Für eine verschwindende Wechselwirkung dissoziieren die beiden Gruppen also unabhängig voneinander mit den jeweiligen pK_a^{int} -Werten. Außerdem erhalten wir die pH-abhängigen Konzentrationsverhältnisse von protonierter zu unprotonierter Form der Moleküle. Das wollen wir exemplarisch für die Gruppe M_1 vorführen:

$$\frac{[M_1H]}{[M_1]} = \frac{[11] + [10]}{[00] + [01]} = \frac{[11]/[01] + [10]/[01]}{[00]/[01] + 1} = \frac{[H]/K_4 + K_2/K_1}{K_2/[H] + 1} \quad (3.55)$$

Mit

$$\mathfrak{P}(M_1H; \text{pH}) = [11] + [10] = \frac{1}{1 + \frac{[00]+[01]}{[11]+[10]}} \quad (3.56)$$

erhalten wir den Zusammenhang dieses Verhältnisses mit Gl. 3.49. In Abbildung 3.8 Teilbild A) sind zwei Grenzfälle für den Graph von Gl. 3.49 eingezeichnet, die wir an Gl. 3.55 ablesen können. Für große pH-Werte wird dort der Term $K_2/[H]$ sehr groß und $[H]/K_4$ sehr klein. Das führt zu der Näherung

$$\mathfrak{P}(M_1H; \text{pH}) \approx \frac{1}{1 + K_1/[H]} = \frac{1}{1 + 10^{\text{pH} - \text{pK}_1}} = \mathfrak{P}(M_1H \mid M_2; \text{pH}), \quad (3.57)$$

welche die Protonierung der Gruppe 1 unter der Bedingung einer deprotonierten Gruppe 2 angibt.

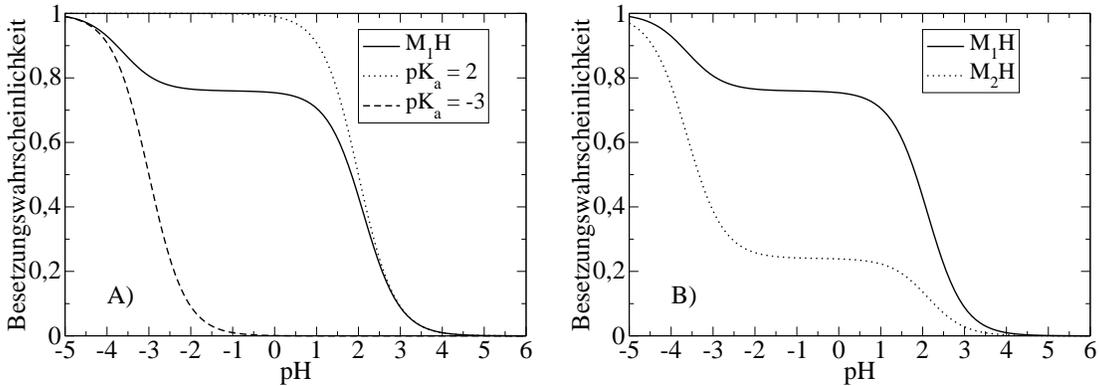


Abbildung 3.8: Die durchgezogene Linie in Teilbild A) zeigt das anormale Titrationsverhalten der Gruppe 1 mit den Parametern: $\text{pK}_1 = 2.0$, $\text{pK}_2 = 1.5$ und $W = 5$. Die unterbrochenen Linien beschreiben die normalen Titrationskurven mit den bedingten pK_a -Werten $\text{pK}_a(M_1H|M_2) = 2$ und $\text{pK}_a(M_1H|M_2H) = -3$. Teilbild B) zeigt die Besetzungswahrscheinlichkeiten für die protonierte Form der Gruppe 1 (durchgezogene Linie) und die protonierte Form der Gruppe 2 (gepunktete Linie).

Gehen wir dagegen zu sehr niedrigen pH-Werten, kann $K_2/[H]$ gegenüber eins vernachlässigt werden, während $[H]/K_4$ sehr groß im Vergleich zu K_2/K_1 wird.

In diesem Bereich nähern wir deshalb

$$\mathfrak{P}(M_1H; pH) \approx \frac{1}{1 + K_4/[H]} = \frac{1}{1 + 10^{pH - pK_1 + W}} = \mathfrak{P}(M_1H | M_2H; pH), \quad (3.58)$$

und beschreiben die Protonierung der Gruppe 1 unter der Bedingung, daß Gruppe 2 bereits protoniert ist. Bei den Funktionen für die bedingten Wahrscheinlichkeiten Gl. 3.57 und Gl. 3.58 handelt es sich um HENDERSON-HASSELBALCH-Kurven, die durch die bedingten pK_a -Werte $pK_a(M_1H|M_2) = -\log K_1$ bzw. $pK_a(M_1H|M_2H) = -\log K_4 = pK_1 - W$ beschrieben werden können.

Wenn die Wechselwirkung zwischen den beiden Residuen groß genug ist, um sinnvoll einen Bereich zwischen den beiden Näherungen unterscheiden zu können, erkennen wir ein Plateau in der Höhe

$$h \approx \frac{1}{1 + K_1/K_2} = \frac{1}{1 + 10^{pK_2 - pK_1}}. \quad (3.59)$$

Hier ist nämlich das Gros der Moleküle einfach protoniert (10 oder 01), womit sich ein kleines Verhältnis $[00]/[01]$ ergibt. Gleichzeitig ist kaum ein Molekül zweifach protoniert ($pK_4 < pK_1$), weshalb auch der Term $[11]/[01]$ sehr klein wird.

In Teilbild B) der Abbildung 3.6 ist dieser Zusammenhang mit dem Tautomeriegleichgewicht $K_\tau = K_1/K_2$ verdeutlicht. Besonders interessant ist hierbei, wie schnell sich das Plateau aus der Mitte (für $pK_1^{\text{int}} = pK_2^{\text{int}}$) nach oben verschiebt. Bereits bei einer Differenz von $\Delta pK := pK_1^{\text{int}} - pK_2^{\text{int}} = 2$ liegt es bei 0.99. Die gemessene Kurve läßt sich in diesem Fall wieder sehr gut durch eine HENDERSON-HASSELBALCH-Gleichung mit dem bedingten $pK_a(M_1H|M_2) = -\log K_1$ Wert beschreiben. Da sich die pK_a^{int} -Werte einzelner Gruppen in Proteinen oft stark unterscheiden, finden wir bei Rechnungen oder Experimenten viele normale Titrationskurven. Die Wechselwirkungen, welche die mikroskopischen (bedingten) pK_a -Werte bestimmen, sind dennoch vorhanden. Aber ihr Einfluß ist in den makroskopischen Titrationskurven nicht mehr zu erkennen.

Für die Gruppe M_2 können mutatis mutandis die entsprechenden Gleichungen abgeleitet werden. Ein Vergleich der Titrationskurven zweier Gruppen mit unterschiedlichen pK_a^{int} -Werten und einer starken Wechselwirkung ist in Teilbild B) der Abbildung 3.8 dargestellt. Wie wir aus der für M_1 abgeleiteten Näherung der Plateauhöhe (Gl. 3.59) schließen können, besitzt die Gruppe mit dem höheren pK_a^{int} auch das höhere Plateau.

Die bisherigen Betrachtungen haben wir unter der Annahme einer positiven Wechselwirkung gemacht. Dies gilt auf jeden Fall, wenn die Wechselwirkungsenergie (Gl. 3.46) zwischen den Gruppen nur durch die Elektrostatik ihrer Gesamtladung⁵ (-1,0,+1) gegeben ist. Bei der Verwendung eines detaillierteren Ladungsmodelles (vgl. Abschnitt 4.1.2), das auch mit höheren Multipolmomenten

⁵ Wir geben Ladungen in Einheiten der Elementarladung e an.

zur Gesamtenergie beiträgt, und vor allem durch die Hinzunahme von Konformationsfreiheitsgraden, kann aber der Fall einer negativen Wechselwirkung nicht ausgeschlossen werden.

Stellen wir uns also die Frage, wie sich die Situation im Falle $W < 0$ ändert. Oben haben wir die Entstehung des Plateaus darauf zurückgeführt, daß die totale Protonierung des Systems in zwei Schritten über den Umweg einfach protonierter Gruppen erfolgt. Die Konstanten K_1 und K_2 , welche die ersten Protonierungsreaktionen kontrollieren, sind unabhängig von der Wechselwirkung. Die Konstante $K_5 = K_1 K_2 K_W$ der Reaktion $00 \rightarrow 11$ ist hingegen von der Wechselwirkung W abhängig. Ist diese positiv, so wird das Verhältnis $[00]/[11]$ in Richtung $[00]$ verschoben und die totale Protonierung kann nur in zwei Schritten erfolgen. Ist sie jedoch negativ, wird das Gleichgewicht zur total protonierten Form hin verschoben. Damit kommt der Hauptbeitrag zu Gl. 3.55 von dem Verhältnis $[11]/[00] = K_5/[H]^2$ und wir erhalten

$$\mathfrak{P}(M_1H; pH) = \frac{1}{1 + [00]/[11]} = \frac{1}{1 + 10^{2pH - pK_1 - pK_2 + W}} \quad (3.60)$$

für die Wahrscheinlichkeit, die Gruppe 1 in protonierter Form zu finden. Diese Funktion läßt sich zwar wieder durch einen einzigen $pK_a = pK_1 + pK_2 - W$ Wert beschreiben, verläuft aber steiler als eine normale Titrationskurve.

Die negative Wechselwirkung zwischen den protonierten Gruppen führt also dazu, daß beide Gruppen gleichzeitig protonieren. Solch ein Effekt wird als „Kooperativität“ bezeichnet. Bei der Analyse von Experimenten unter der Verwendung von „HILL-Diagrammen“ erhält man in solchen Situationen HILL-Koeffizienten größer als eins [2]. Titrationsexperimente am Chromophor des PYP [65] ergaben für diesen eine Kurve, die auf kooperative Wechselwirkung mit einer anderen, bisher noch nicht identifizierten, Gruppe schließen läßt.

Welche Feststellungen können wir nun aus der Analyse dieses einfachen Modells für die Interpretation unserer an komplexen Proteinen erzielten Rechenergebnisse treffen? Zum einen sehen wir, daß es um die Definition des pK_a -Wertes keine Diskussion geben muß. Dieser Wert ist nach Gl. 2.6 ganz klar durch die Gleichgewichtskonstante K einer Dissoziationsreaktion definiert. Diese Konstante können wir für jede Reaktion der Form



in unserem System berechnen. Nur für die einfachsten Reaktionen ($n = 1$) erhalten wir HENDERSON-HASSELBALCH-Kurven.

Zum anderen ist die Funktion, für die Konzentration der protonierten Form einer bestimmten Gruppe im Protein, im allgemeinen keine normale Titrationskurve. Denn sie hängt nicht nur von dem eigenen pK_a^{int} , sondern von den Protonierungszuständen aller anderen Gruppen ab. Damit handelt es sich um Kurven mit

komplizierten pH-Abhängigkeiten. Wenn der apparente pK_a eines Residuums allerdings in einem pH-Bereich liegt, in dem sich die Protonierungszustände aller anderen Residuen nicht ändern, können wir die Kurve für die Konzentration der protonierten Gruppe wieder als HENDERSON-HASSELBALCH-Kurve beschreiben.

Ist das der Fall, können wir daraus nicht auf das Fehlen von Wechselwirkungen mit anderen Gruppen schließen. Bei einem Computerexperiment haben wir den entscheidenden Vorteil alle Wechselwirkungen zu kennen und können gezielt das Dissoziationsverhalten beeinflussen. Wissen wir beispielsweise um eine starke Wechselwirkung zwischen zwei Gruppen, deren apparente pK_a -Werte weit auseinander liegen, könnten wir die eine Aminosäure im Modellexperiment durch eine andere ersetzen, die eine ähnlich starke Wechselwirkung macht, aber einen pK_a -Wert besitzt, der näher bei dem der anderen Gruppe liegt. Auf diese Weise ist es möglich, präparativen Arbeitsgruppen Vorhersagen zu machen, bei welchen Mutanten es zu welchen (auch indirekten) Verschiebungen im Dissoziationsverhalten einzelner Residuen kommen kann.

Kapitel 4

Modellierung von Proteinen

4.1 Wechselwirkungsterme

Jeder Konformation eines Proteins kann man, aufgrund von Wechselwirkungen der Atome untereinander und mit der Umgebung, eine sogenannte „Konformationsenergie“ zuordnen. Im folgenden werden wir die einzelnen Beiträge zu dieser Größe näher erläutern.

Um alle Wechselwirkungen für ein Protein richtig zu beschreiben, müßte für das gesamte System eine quantenchemische Rechnung durchgeführt werden. Da dies wegen der großen Teilchenzahlen nicht möglich ist, wurden Modelle gebildet, welche eine schnelle Berechnung von Kräften und Energien in einem Protein ermöglichen. Diese Modelle werden als „molekulare Kraftfelder“ bezeichnet. Hierbei werden Wechselwirkungsenergien zwischen Atomen durch einfache Funktionen dargestellt. Die Parameter für diese Funktionen werden zunächst aus quantenchemischen Rechnungen an kleinen Modellsystemen ermittelt. Anschließend werden mit ihnen experimentell zugängliche Größen berechnet und die Parameter solange nachgebessert, bis eine gute Übereinstimmung mit dem Experiment erreicht ist [66–68]. In der Vergangenheit wurden verschiedene solcher semiempirischen Kraftfelder für Moleküle entwickelt [33, 67, 69–71].

4.1.1 Bindungsenergien

Ein Teil der, für ein Kraftfeld ermittelten, Parameter beschreibt die Wechselwirkungsenergien aneinander gebundener Atome. Für das Molekulardynamik-Programm CHARMM [33] sind Vierteilchen-Wechselwirkungen parametrisiert, d. h. Atome, die weniger als vier Bindungen voneinander entfernt sind, werden als aneinander gebunden betrachtet. Die Energiefunktionen für die Bindungswechselwirkungen sind in Tabelle 4.1 zusammengefaßt und in den, in Abschnitt 2.4

eingeführten, internen Koordinaten formuliert. Die Kraftkonstanten k hängen von den „Typen“ der jeweils beteiligten Atome ab. Dieses Konzept des Atomtyps liegt nahezu allen Kraftfeldern zugrunde. Es realisiert die Idee, daß Atome gleicher Elemente in gleichen chemischen Bindungsverhältnissen gleiche Wechselwirkungen haben sollen.

| | |
|----------------------------|---|
| Bindungslänge l | $E^{\text{bdg}}(l) = k_l(l - l_0)^2$ |
| Bindungswinkel φ | $E^{\text{win}}(\varphi) = k_\varphi(\varphi - \varphi_0)^2$ |
| Dihedralwinkel ϑ | $E^{\text{dih}}(\vartheta) = k_\vartheta[1 + \cos(n\vartheta - \vartheta_0)]$ |

Tabelle 4.1: Energiefunktionen für Bindungsenergien. Winkelangaben sind im Bogenmaß und mit null indizierte Größen beziehen sich auf die Gleichgewichtslage. Bei Dihedralwinkeln gibt n die Periodizität des Potentials an. Die jeweiligen Kraftkonstanten werden mit k bezeichnet.

Die logische Erweiterung dieses Konzeptes ist es, chemisch gleichen Gruppen gleiche Bindungswechselwirkungen zuzuordnen. Insbesondere sollen in Proteinen alle Aminosäuren des gleichen Typs gleiche Eigenschaften besitzen. Diese Annahme mag zwar fragwürdig erscheinen, ist aber für die praktische Anwendung eines Kraftfeldes unabdingbar. Um die Unterschiede in den Bindungspotentialen gleicher Residuen an verschiedenen Stellen im Protein zu untersuchen, müßten an diesen Stellen wieder Quantenchemie-Rechnungen mit der umgebenden Proteinstruktur durchgeführt werden.

Bei der Ableitung der Zustandssumme (Gl. 3.24) haben wir die Annahme gemacht, daß die Bindungswechselwirkungen eines Residuums im Lösungsmittel gleich denen der gleichen Aminosäure im Protein sind. Diese Annahme ist somit konsistent mit dem Konzept des molekularen Kraftfeldes.

Durch quantenchemische Rechnungen können nicht nur die Kraftkonstanten für die oben angegebenen Bindungspotentiale ermittelt werden. Man erhält auch Informationen über die Verteilung der Elektronen und somit über die elektronische Struktur des Moleküls bei vorgegebenen Kernkoordinaten.

4.1.2 Elektronische Struktur

Auch hier geht man davon aus, daß gleiche Aminosäuren die gleiche elektronische Struktur haben sollen, die durch quantenchemische Rechnungen an kleinen Modellsystemen ermittelt wird. Solche Rechnungen liefern zunächst die Verteilung der Elektronendichte zu festen Kernkoordinaten.

Aus der Elektronenwellenfunktion ließen sich die Multipolmomente des Moleküls eindeutig ermitteln, da für sie quantenmechanische Operatoren existieren. Allerdings sind Multipole Eigenschaften des ganzen Moleküls und man kann daher

keine intramolekularen Wechselwirkungen aus ihnen bestimmen. Aufbauend auf das Konzept des Atomtyps hat man sich daher auf Punktladungsmodelle zur Beschreibung der elektronischen Struktur konzentriert.

Der einfachste Ansatz ist hierbei für die Bestimmung von Ionisierungsgleichgewichten das sogenannte „*full-charge-Modell*“, wie es z. B. in den Arbeiten von Antosiewicz et al. [19], Beroza et al. [72] oder Bashford und Karplus [16] verwendet wurde. Hierbei werden Ionisierungen durch das Setzen einer Punktladung ± 1 auf ein einziges Atom in jeder titrierbaren Gruppe modelliert. Da sich bei Protonierungsreaktionen die elektronische Struktur eines ganzen Residuums ändert, ist diese Beschreibung sehr ungenau¹ und somit eine mögliche Fehlerquelle bei Proteinelektrostatik-Rechnungen. Die Übereinstimmung der Ergebnisse solcher Rechnungen mit Experimenten konnte dann auch durch die Verwendung von sogenannten „*detailed-charge-Modellen*“ verbessert werden [73, 74].

Weit verbreitet sind sogenannte „atomare Partiaalladungen“. Hierbei werden Punktladungen q_i an die Orte der Atomkerne gesetzt. Die in dieser Arbeit verwendeten Ladungsparameter (vgl. Abschnitt 5.4) definieren Partiaalladungen unabhängig von der Geometrie des Moleküls anhand des Atomtyps. Dadurch werden in den Kraftfeldern Polarisierungseffekte nicht berücksichtigt. Leider sind diese Ladungen keine experimentell zugänglichen Größen. Somit existiert keine eindeutige Vorschrift, wie diese Ladungen aus den quantenchemisch ermittelten Elektronenwellenfunktionen zu bestimmen sind. Folglich gibt es auch verschiedene Verfahren um diese Aufgabe zu erfüllen.

Partiaalladungen aus quantenchemischen Rechnungen

Viele Methoden basieren darauf, die Elektronenwellenfunktion, die durch die Besetzung der verwendeten Orbitale vorgegeben ist, auf die Atomkerne zu verteilen. Das erste Verfahren eine solche „Populationsanalyse“ durchzuführen wurde 1955 von Mulliken vorgeschlagen [75].

Diese sogenannte „MULLIKEN-Analyse“ ist einfach anzuwenden, hat aber einige Mängel, die bereits von Mulliken selbst erörtert wurden. Besonders gravierend erscheint hier die starke Abhängigkeit der erhaltenen Partiaalladungen von der Wahl der Basisfunktionen für die quantenchemische Rechnung [76].

Löwdin [77, 78] und Bader [79] entwickelten alternative Methoden zur Populationsanalyse, die weniger von der speziellen Wahl der Basis abhängen. Die MULLIKEN-Analyse besitzt allerdings den entscheidenden Vorteil, daß sie in jedem gängigen Quantenchemieprogramm implementiert ist.

¹Allerdings kann eine solche Näherung durchaus gerechtfertigt sein, vor allem dann, wenn die atomare Struktur des Systems nicht genau bekannt ist.

Parse-Parameter

Während diese Methoden zur Bestimmung von Partialladungen auf quantenchemischen Rechnungen basieren, haben Sitkoff et al. [68] einen anderen Zugang gewählt. In dieser Arbeit haben sie einen Parametersatz zur Beschreibung der Solvatisierungsenergien einfacher funktionaler Gruppen entwickelt, der „Parse“² genannt wurde.

Für diese Parameter wurden Partialladungen so auf die einzelnen Atome der Gruppen verteilt, daß experimentelle Solvatisierungsenergien bestmöglich durch numerische Rechnungen reproduziert wurden. Diese Rechnungen wurden unter Verwendung eines Kontinuumselektrostatik-Modells durchgeführt (vgl. Abschnitt 4.2).

Um den Einfluß der Ladungsparameter auf die pK_a -Rechnungen zu zeigen, werden wir, in Abschnitt 5.5.1 dieser Arbeit, alternativ zu den CHARMM-Ladungen auch Rechnungen mit Parse-Parametern durchführen. Da die Ladungsparameter implizit die Wechselwirkungen mit der Umgebung, auf die sie parametrisiert wurden, widerspiegeln, ergibt dieser Vergleich z. B. Hinweise auf die Berücksichtigung von Ladungsverschiebungen unter dem Einfluß von Wasserstoffbrücken.

4.1.3 VAN DER WAALS-Energien

Die Wechselwirkungen zwischen nicht gebundenen Atomen werden durch die Elektrostatik alleine noch nicht vollständig beschrieben. Zusätzlich wirken zwischen Atomen die sogenannte „VAN-DER-WAALS-Wechselwirkungen“. Diese haben zwei Ursachen: Fluktuationen der Elektronenwolken um die Atomkerne führen zu attraktiven Kräften [80, 81], die Pauli-Abstoßung bedingt eine stark repulsive Wechselwirkung.

Die resultierende Wechselwirkung zwischen zwei Atomen, steigt für kurze Entfernungen stark an und verschwindet auf großen Distanzen beinahe. Dazwischen liegt ein Minimum, das durch den VAN-DER-WAALS-Radius R_i^{\min} des Atoms i und die zugehörige Energie E_i^{\min} charakterisiert ist.

Für atomare Kraftfelder werden die VAN-DER-WAALS-Wechselwirkungen meistens durch ein „12-6-LENNARD-JONES-Potential“

$$E^{\text{vdw}} := \varepsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r} \right)^{12} - 2 \left(\frac{\sigma_{ij}}{r} \right)^6 \right] \quad \text{mit} \quad \begin{cases} \varepsilon_{ij} := \sqrt{E_i^{\min} E_j^{\min}} & \text{und} \\ \sigma_{ij} := R_i^{\min} + R_j^{\min} \end{cases} \quad (4.1)$$

gegeben [82]. Die Parameterdefinition (Gl. 4.1) ist konsistent mit den für das Programm CHARMM bereitgestellten Parameterdateien [83].

²Parameters for solvation energy

4.2 Kontinuumselktrostatik

In dem vorangegangenen Abschnitt haben wir für alle in einem Protein auftretenden Wechselwirkungen Funktionen angegeben, mit denen diese berechnet werden können. Einzige Ausnahme bildete dabei die Elektrostatik. Dieser wollen wir uns nun zuwenden.

Besonders wichtig bei der Beschreibung der Elektrostatik von molekularen Systemen ist deren Wechselwirkung mit ihrer Umgebung. Ändert sich die elektronische Struktur eines Moleküls, etwa durch Deprotonierung einer Gruppe oder Konformationsänderungen, wird die Umgebung darauf reagieren. Diese „Antwort“ kann sich beispielsweise durch das Entstehen von Influenzladungen oder Umorientierung von Dipolen äußern [84]. Mit diesen Prozessen im Lösungsmittel ist die sogenannte „Reorganisationsenergie“ verbunden, die bei der Energetik für die jeweilige Strukturänderung des Moleküls berücksichtigt werden muß.

Proteine befinden sich in ihrer natürlichen Umgebung häufig in wäßriger Lösung, also in einer Umgebung mit stark polarem Charakter. Es hat sich gezeigt, daß die dort auftretenden langreichweitigen elektrostatischen Wechselwirkungen einen wesentlichen Einfluß auf Struktur, Dynamik und Funktion der Proteine haben [85–87].

In der Molekulardynamik-Simulation von Proteinen versucht man deshalb das umgebende Wasser im atomaren Detail zu simulieren. Werden für die Simulationen z. B. periodische Randbedingungen [82, 88, 89] verwendet, sind alle beteiligten Moleküle durch ihre Struktur und Partialladungen repräsentiert und die elektrostatischen Kräfte zwischen einzelnen Atomen können mit dem COULOMB-Gesetz berechnet werden [82]. Die Reorientierungsprozesse im Lösungsmittel werden explizit simuliert³. Im zeitlichen Mittel wird daher die Reorganisationsenergie des Lösungsmittels berücksichtigt. Dies gilt allerdings nur für die Konformationsdynamik, die sich auf der Zeitskala abspielt, welche durch die Dauer der MD-Simulation abgedeckt wird. Hierbei handelt es sich üblicherweise um einige Nanosekunden. Auf langen Zeitskalen stattfindende großräumige und korrelierte Umlagerungen sind damit nicht zu erfassen. Um die Rechenzeit bei MD-Simulationen möglichst gering zu halten wurde eine Reihe von Methoden entwickelt, die Antwort des Lösungsmittels effektiv zu beschreiben [90–95].

Die effizienteste Methode zur Modellierung von Lösungsmittelleffekten bieten Modelle, bei denen die Proteinumgebung durch ein dielektrisches Kontinuum beschrieben wird. Hierbei wird die Antwort des Lösungsmittels auf Änderungen des elektrostatischen Feldes durch eine Dielektrizitätskonstante beschrieben.

³Je nach verwendetem Kraftfeld wird die elektronische Polarisierung mehr oder weniger gut berücksichtigt.

Zur Berechnung von elektrostatischen Wechselwirkungen und Solvatisierungsenergien, werden wir uns in dieser Arbeit auf die Methoden der Kontinuumsselektrostatik stützen. Ein Protein-Lösungsmittel-Modell, wie wir es verwenden, ist in Abbildung 4.1 skizziert. Die Proteinstruktur wird dabei im atomaren Detail mit Partialladungen und das Lösungsmittel als Kontinuum mit der Dielektrizitätskonstante $\varepsilon^{\text{solv}}$ beschrieben. Da wir nicht alle dielektrischen Reorientierungen betrachten, müssen wir auch das Protein mit einer Dielektrizitätskonstante $\varepsilon^{\text{prot}}$ versehen. Diese Größe ist Gegenstand ständiger Diskussion und wir werden in Abschnitt 4.2.3 genauer darauf eingehen.

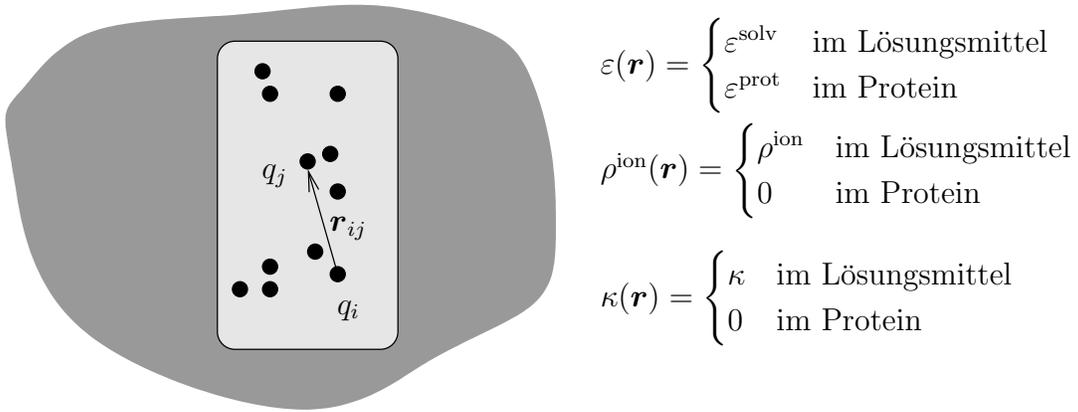


Abbildung 4.1: Kontinuumsmodell eines Protein-Lösungsmittel-Systems. Das helle Rechteck symbolisiert ein Protein, das sich im, dunkler dargestellten, Lösungsmittelkontinuum befindet. Auch das Protein wird als dielektrisches Medium betrachtet, in dem, durch ausgefüllte Kreise dargestellte, diskrete Ladungen verteilt sind. Der Abstandsvektor zwischen zwei Punktladungen q_i und q_j wurde mit $\mathbf{r}_{ij} = \mathbf{r}_j - \mathbf{r}_i$ bezeichnet. Die Medien unterscheiden sich in ihrer Dielektrizitätskonstante ε und der Ionenverteilung ρ . In diesem Modell dringen Ionen nicht in das Protein ein.

Um das von einer Ladung q_i im Inneren des Proteins am Ort \mathbf{r} erzeugte Potential $\Phi_i(\mathbf{r})$ zu ermitteln, muß zusätzlich zu dem COULOMB-Beitrag

$$\Phi_i^{\text{coul}}(\mathbf{r}) = q_i / (4\pi\varepsilon_0\varepsilon^{\text{prot}}r) \quad (4.2)$$

das Potential $\Phi_i^{\text{diel}}(\mathbf{r})$ addiert werden, das durch die Polarisierung des dielektrischen Kontinuums außerhalb des Proteins entsteht:

$$\Phi_i(\mathbf{r}) = \Phi_i^{\text{coul}}(\mathbf{r}) + \Phi_i^{\text{diel}}(\mathbf{r}). \quad (4.3)$$

Diese „Antwort“ des Kontinuums erzeugt auch am Ort \mathbf{r}_i der Ladung ein endliches Potential. Die daraus resultierende „Selbstenergie“ der Ladung

$$E_i^{\text{solv}} = \frac{1}{2}q_i\Phi_i^{\text{diel}}(\mathbf{r}_i), \quad (4.4)$$

wird als (BORNSche) Solvatisierungsenergie bezeichnet. Die Wechselwirkungsenergie einer Ladung q_j am Ort \mathbf{r}_j mit der Ladung q_i ergibt sich aus deren Potential zu

$$E_{ij}^{\text{el}} = q_j \Phi_i(\mathbf{r}_j) = \frac{q_j q_i}{4\pi \varepsilon_0 \varepsilon^{\text{prot}} |\mathbf{r}_j - \mathbf{r}_i|} + q_j \Phi_i^{\text{diel}}(\mathbf{r}_j). \quad (4.5)$$

Abschirmeffekte sind über den Term $q_j \Phi_i^{\text{diel}}(\mathbf{r}_j)$ eingeschlossen.

4.2.1 POISSON-BOLTZMANN-Gleichung

Das ortsabhängige elektrostatische Potential $\Phi(\mathbf{r})$ in einem solchen System wird durch die POISSON-Gleichung

$$\nabla [\varepsilon(\mathbf{r}) \nabla \Phi(\mathbf{r})] + \frac{\rho(\mathbf{r})}{\varepsilon_0} = 0 \quad (4.6)$$

bestimmt. Hierbei ist $\varepsilon(\mathbf{r})$ die ortsabhängige Dielektrizitätskonstante des Mediums, in dem die Ladungsverteilung $\rho(\mathbf{r})$ plaziert ist. Die in der Biologie auftretenden Lösungsmittel enthalten oft Elektrolyte, wie zum Beispiel NaCl oder KCl. Um deren Einfluß auf die Elektrostatik der explizit vorgegebenen Ladungen im Rahmen eines Kontinuumsmodelles beschreiben zu können, unterteilt man die Ladungsdichte $\rho(\mathbf{r})$ in zwei Anteile. Die ortsgebundenen Ladungen werden mit der Dichte $\rho^{\text{int}}(\mathbf{r})$ und die beweglichen Ionen mit der Dichte $\rho^{\text{ion}}(\mathbf{r})$ beschrieben.

Die DEBYE-HÜCKEL-Theorie setzt die Ionendichte $I_{\pm}(\mathbf{r})$ der negativen bzw. positiven Ionen mit der Ladung $\pm q$ über die BOLTZMANNverteilung mit der Ionenkonzentration im Unendlichen I_{\pm}^{∞} in Verbindung [5]:

$$I_{\pm}(\mathbf{r}) = I_{\pm}^{\infty} e^{\mp q \Phi(\mathbf{r}) / k_B T} \quad (4.7)$$

Für einen 1,1-Elektrolyten erhält man aus den Gleichungen 4.6 und 4.7 die als POISSON-BOLTZMANN-Gleichung bekannte Beziehung

$$-\frac{\rho^{\text{int}}(\mathbf{r})}{\varepsilon_0} = -\frac{k_B T}{4\pi \varepsilon_0 e} \kappa^2 \sinh\left(\frac{e \Phi(\mathbf{r})}{k_B T}\right) + \nabla [\varepsilon(\mathbf{r}) \nabla \Phi(\mathbf{r})] \quad (4.8)$$

Dabei wurde die inverse Länge

$$\kappa = \sqrt{\frac{8\pi I_{\pm}^{\infty} e^2}{k_B T}} \quad (4.9)$$

eingeführt. Da nur Ionen außerhalb des Proteins im Rahmen des Kontinuumsmodells beschrieben werden sollen, gilt im Proteininneren $\kappa = 0$.

Die POISSON-BOLTZMANN-Gleichung 4.8 kann nur in seltenen Fällen analytisch gelöst werden. Das ist u. a. für die geladene Ebene der Fall [96]. Die zugehörige Lösung führt auf das GOUY-CHAPMAN-Model [97, 98] zur Bestimmung des elektrostatischen Potentials vor einer Membranoberfläche.

Wenn die elektrostatische Wechselwirkung kleiner ist als die thermische Energie ($e\Phi/k_B T \ll 1$), kann der hyperbolische Sinus in Gl. 4.8 linear genähert werden und man erhält die „linearisierte POISSON-BOLTZMANN-Gleichung“

$$-\frac{\rho^{\text{int}}(\mathbf{r})}{\varepsilon_0} = -\frac{\kappa^2 \Phi(\mathbf{r})}{4\pi\varepsilon_0} + \nabla[\varepsilon(\mathbf{r})\nabla\Phi(\mathbf{r})] \quad . \quad (4.10)$$

Für diese Gleichung können analytische Lösungen gefunden werden, wenn die Grenzflächen zwischen den verschiedenen Dielektrika einfache Formen wie z. B. Ebenen oder Kugeloberflächen haben [99]. Protein-Wasser-Grenzflächen lassen sich meistens nicht durch so einfache Formen beschreiben. In diesen Fällen müssen numerische Verfahren zur Lösung der POISSON-BOLTZMANN-Gleichung herangezogen werden. Seit Warwicker und Watson 1982 eine Methode entwickelt haben, die auf einem Differenzenverfahren [100] beruht, wurden viele andere numerische Lösungsmethoden vorgeschlagen oder weiterentwickelt [6, 7, 101–105]. Das, von B. Honig und seinen Mitarbeitern entwickelte, finite Differenzenverfahren ist als Programmpaket DelPhi erhältlich [7, 101] und wird in dieser Arbeit verwendet werden. Gilson et al. [106] zufolge liegt der numerische Fehler hierbei in der Größenordnung von 5–10% .

4.2.2 Verfahren finiter Differenzen (DelPhi)

Die POISSON-BOLTZMANN-Gleichung wird bei einer DelPhi-Rechnung iterativ auf einem kubischen Gitter gelöst. Hierzu ist es notwendig das Molekül auf dieses Gitter abzubilden, d. h. das Gitter in Bereiche innerhalb und außerhalb des Proteins zu unterteilen. Die Bestimmung dieser Protein-Wasser Grenzfläche geschieht anhand der VAN-DER-WAALS-Radien der Atome und einer Testkugel [107], deren Radius vorgegeben werden kann. Um das Eindringen von Ionen aus dem Solvens in das Proteininnere zu verhindern, kann ein „Ionenausschluß-Radius“ um die Proteinoberfläche angegeben werden [101].

Inwieweit das Protein das Gitter ausfüllt, wird ebenfalls durch den Benutzer vorgegeben. Die Gitterpunkte an den Seiten haben keine äußeren Nachbarn. Deshalb müssen an den Rändern des Gitters künstliche Randbedingungen eingeführt werden [108]. Da diese das elektrostatische Potential im Inneren des Gitters beeinflussen, werden die Ergebnisse umso besser, je weiter die Proteinoberfläche vom Rand des Gitters entfernt ist. Daraus könnte man folgern, das Gitter solle das gesamte Protein und möglichst viel Lösungsmittel enthalten, um Randeffekte zu vermeiden. Dieses Vorgehen führt allerdings dazu, daß ein sehr großes Volumen von

einer geringen Zahl an Gitterpunkten beschrieben wird, was zu einer ungenauen Beschreibung der Proteinstruktur führt. Ein Ausweg auf Kosten der Rechenzeit wird durch die Methode des „Fokussierens“ angeboten [108, 109]. Hierbei werden eine Reihe von DelPhi-Rechnungen durchgeführt, wobei ein immer größerer Teil des Gitters vom Protein eingenommen wird. Fallen dabei Teile des Proteins aus dem Gitter, wird deren Beitrag zum Potential im Inneren in den Randbedingungen berücksichtigt, die aus den Potentialen des jeweils vorangegangenen Programmlaufs berechnet werden. Auf diese Weise können Wechselwirkungen in einem bestimmten Teil eines Proteins sehr exakt berechnet werden.

In dieser Arbeit werden wir die elektrostatischen Wechselwirkungsenergien unter Verwendung der linearisierten Gleichung (4.10) bestimmen. Diese Näherung ist für unsere Untersuchungen zulässig, weil wir ein Lösungsmittel mit physiologischer Ionenkonzentration (≈ 1 mM NaCl) modellieren wollen. In diesem Bereich sind die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Ionen klein genug, um die Linearisierung zu rechtfertigen [110].

Zusätzlich sprechen auch praktische Gründe für unsere Wahl. Einerseits ist die numerische Lösung der nichtlinearen Differentialgleichung mit höherem Aufwand verbunden als die der linearisierten Gleichung. Andererseits sind die Lösungen der linearen Differentialgleichung superponierbar. Eine Eigenschaft, die für Gleichung 4.8 nicht gilt.

Da die Lösung der linearisierten POISSON-BOLTZMANN-Gleichung den größten Teil der Rechenzeit in Anspruch nimmt, versuchen wir die Zahl der DelPhi-Läufe möglichst gering zu halten. Untersuchen wir z. B. nur die Protonierungszustände eines Proteins mit N protonierbaren Gruppen, müssen Energien für 2^N verschiedene P-Zustände des Systems berechnet werden. Wenn wir aber für jeden Zustand eines Residuums das Potential bestimmen, das von dem Residuum an den Orten aller anderen Gruppen erzeugt wird, ermöglicht uns das Superpositionsprinzip, die elektrostatische Gesamtenergie für jeden der 2^N P-Zustände des Proteins zu berechnen. Auf diese Weise müssen nur $2N$ DelPhi-Rechnungen ausgeführt werden.

Dieses Vorgehen ist jedoch nicht immer zulässig. Zwar sind die Lösungen einer linearen Differentialgleichung immer superponierbar, aber in Abbildung 4.2 haben wir einen Fall skizziert, in dem nicht immer dieselbe Gleichung gelöst wird. Wir sehen dort zwei unterschiedliche KP-Zustände eines Modellsystems. Diese unterscheiden sich in der Protonierung der Gruppe M_2 und der Konformation von M_3 . Gingen wir wie eben beschrieben vor, wäre der Beitrag der Wechselwirkung von M_1 und M_4 zur gesamten elektrostatischen Energie des Systems in beiden Fällen gleich groß, da der Zustand dieser Gruppen unverändert bleibt.

Allerdings ändert sich die, durch die durchgezogenen Linie angedeutete, Proteinoberfläche durch das zusätzliche Proton und die Konformationsänderung. Damit verändert sich auch die Ortsabhängigkeit der Dielektrizitätskonstante die in

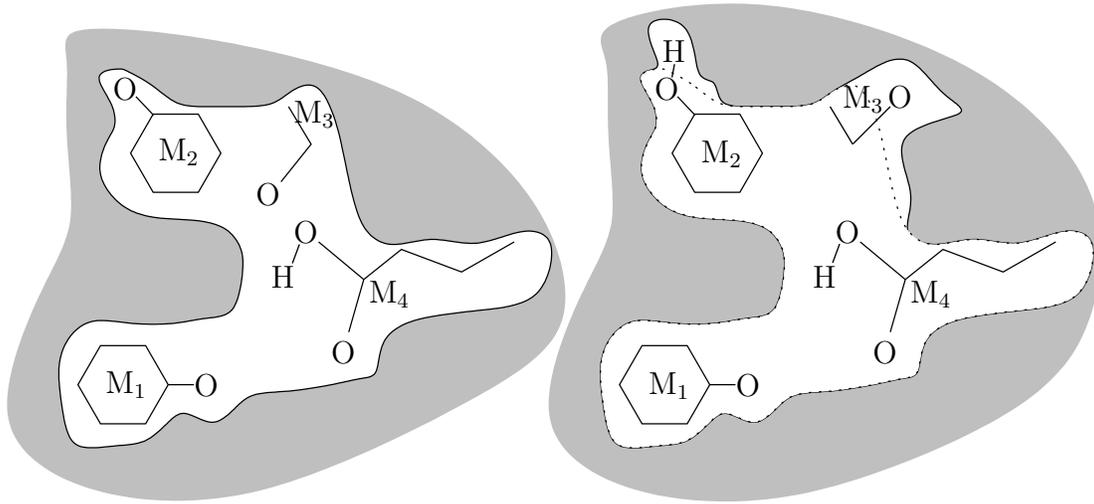


Abbildung 4.2: Zur Superponierbarkeit der Lösungen der POISSON-BOLTZMANN-Gleichung für unterschiedliche KP-Zustände. Die Skizze zeigt ein Modellsystem mit vier protonierbaren Gruppen. Im links abgebildeten Zustand ist M_4 protoniert. Die Grenzfläche zwischen Protein (hell) und Lösungsmittel (dunkler) ist mit der durchgezogenen Linie angedeutet. Im rechten Bild ist zusätzlich Gruppe M_2 protoniert und M_3 hat sich umorientiert. Das führt zu einer neuen, wieder durch die durchgezogene Linie angedeuteten, Grenzfläche zwischen Protein und Lösungsmittel. Zum Vergleich ist der alte Grenzverlauf gestrichelt eingezeichnet.

Gl. 4.10 eingeht. Infolgedessen unterscheiden sich auch die Potentiale, die von M_1 und M_4 an den Orten der anderen Gruppen erzeugt werden. Also muß auch die Wechselwirkung der beiden Gruppen miteinander in beiden Fällen eine andere sein.

An diesem einfachen Beispiel erkennen wir, daß das von uns vorgeschlagene Procedere zur Rechenzeitersparnis nur mit Vorsicht einzusetzen ist. So muß jedesmal überprüft werden, inwieweit eine Änderung des KP-Zustandes eine Veränderung der Proteinoberfläche mit sich zieht.

4.2.3 Dielektrizitätskonstante des Proteins

Ein Dielektrikum reagiert auf eine Änderung des elektrischen Feldes durch Polarisation. Die Polarisation setzt sich aus einem elektronischen, atomaren und dipolaren Anteil zusammen. Die beiden erstgenannten Effekte werden oft als induzierte Polarisation bezeichnet und rühren von Veränderungen in den Elektronenwolken der Moleküle sowie der gegenseitigen Verschiebung von Atomen her. Die dipolare Polarisation bezieht sich auf die sehr viel langsamere Umorientierung ganzer Gruppen mit permanentem Dipolmoment. Diese ist verantwortlich

für die großen Dielektrizitätskonstanten polarer Lösungsmittel [84]. In der makroskopischen Beschreibung elektrostatischer Eigenschaften geht die Polarisierung in Form der Dielektrizitätskonstante des Mediums ein [111], welche die Stärke der Wechselwirkungen innerhalb des Mediums wesentlich beeinflusst.

Während es experimentell einfach ist, die Dielektrizitätskonstante ϵ^{solv} eines Lösungsmittels zu bestimmen [112, 113], kann der Wert ϵ^{prot} im Inneren von nativen Proteinen nicht gemessen werden. Proteine enthalten einerseits viele unterschiedliche polare Gruppen (z. B. Amid- oder Hydroxylgruppen) und können daher als stark polare Substanzen betrachtet werden. Andererseits sind diese Gruppen im Inneren meist in einer fest definierten Struktur angeordnet und reagieren durch Reorientierung deshalb nur eingeschränkt auf eine Änderung des elektrischen Feldes. Das Proteininnere kann somit als gering polarisierbar bezeichnet werden [114]. Tatsächlich ergaben Messungen an getrocknetem Proteinpulver niedrige Werte für die Dielektrizitätskonstante von Proteinen [115]. Allerdings sind die Eigenschaften eines solchen Pulvers kaum vergleichbar mit denen von Proteinen in ihrer nativen Umgebung, so fehlen in der Pulverform beispielsweise geladene Oberflächengruppen, die aufgrund ihrer Beweglichkeit wesentlich zur Polarisierbarkeit von nativen Proteinen beitragen können. Deshalb werden theoretische Modelle zur Bestimmung der Dielektrizitätskonstante von Proteinen verwendet.

Aus Simulationen von Dipolfuktuationen in Proteinen erhält man neben niedrigen Werten ($\epsilon^{\text{prot}} = 1 \dots 20$ [116]) auch hohe Werte ($\epsilon^{\text{prot}} = 30 \dots 36$ [117]) für die Dielektrizitätskonstante. Smith et al. [117] argumentierten, daß diese durch Fluktuationen von Seitengruppen hervorgerufen werden. Simulationen, die nur die Flexibilität der Amidgruppen berücksichtigten, lieferten niedrige Werte im Bereich $\epsilon^{\text{prot}} = 2 \dots 3$. Welcher Wert für ϵ^{prot} nun der richtige für Proteinelektrostatik-Rechnungen ist, wird in der Literatur immer wieder diskutiert [91, 118–121]. Unter Verwendung des einfachen *full-charge*-Modells fanden Antosiewicz et al. [19] heraus, daß im Vergleich zum Experiment die besten Ergebnisse für pK_a -Werte mit $\epsilon^{\text{prot}} = 20$ erzielt werden konnten. In einer neueren Arbeit mit einem *detailed-charge*-Modell [74] erhielten sie bessere Ergebnisse mit $\epsilon^{\text{prot}} = 4$.

Andererseits haben Demchuck und Wade [122] gezeigt, daß ein hoher Wert für ϵ^{prot} bei der Berechnung von pK_a -Werten bessere Übereinstimmung mit experimentellen Werten brachte als ein niedriger, wenn Residuen an der Oberfläche von Proteinen untersucht werden. pK_a -Werte für Gruppen im Inneren wurden besser mit einem niedrigen Wert für die Dielektrizitätskonstante reproduziert. Auch von Simonson et al. durchgeführte Berechnungen von ϵ^{prot} ergaben Werte von $\epsilon^{\text{prot}} = 2 \dots 4$ im Inneren und $\epsilon^{\text{prot}} = 10 \dots 20$ auf der Oberfläche von Proteinen [119, 123–125].

Hieraus wird deutlich, daß es sich bei der Dielektrizitätskonstante des Proteins nicht um eine universelle physikalische Größe, sondern um einen Modellpa-

parameter handelt. Der Wert dieses Parameters hängt schließlich auch davon ab, welche möglichen Reaktionen eines Systems auf die Änderung des elektrischen Feldes in einem Modell explizit berücksichtigt sind. Mit dem von uns verwendeten CHARMM-Kraftfeld wird beispielsweise die induzierte Polarisierbarkeit nicht simuliert. Um diesen Effekten Rechnung zu tragen, brauchen wir in dem Kontinuumsmodell mindestens einen Wert von $\epsilon^{\text{prot}} = 2$ [84]. Da wir uns auf einen Bereich im Inneren des GFP's beschränken, erwarten wir hier eine niedrige Dielektrizitätskonstante des Proteins und wählen $\epsilon^{\text{prot}} = 4$.

4.3 Erzeugen und Analysieren von Proteinstrukturen

In den vorangegangenen Abschnitten haben wir zunächst gesehen, wie für Proteine die in mehreren KP-Zuständen auftreten, die Zustandssumme ermittelt und damit alle thermodynamischen Eigenschaften bestimmt werden können. Anschließend haben wir einige Vorschläge zur Parametrisierung und Modellierung der dazu notwendigen Wechselwirkungen gemacht.

Um aber die Wechselwirkungsenergien tatsächlich zu berechnen, ist es notwendig die Positionen der einzelnen Atome zu kennen. Daten über die Proteinstruktur erhält man durch experimentelle Methoden wie NMR- oder die Röntgenstrukturanalyse [126] oder Neutronenstreuexperimente [127]. Die meisten Proteinstrukturen werden bis heute mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt.

Daher werden wir in der vorliegenden Arbeit davon ausgehen, die ersten Informationen über die Proteinkonformation aus röntgenkristallographischen Experimenten erhalten zu haben. Dabei ist zu berücksichtigen, daß diese Strukturen die Proteinkonfiguration unter den gegebenen experimentellen Bedingungen widerspiegeln.

Auch wenn in den letzten Jahren Röntgenstrukturen in immer besseren Auflösungen veröffentlicht wurden, kommt es immer noch vor, daß die Positionen einzelner Atome oder gar ganzer Residuen nicht geklärt werden konnte. Solche Residuen müssen dann nachträglich in die Struktur modelliert werden. Manchmal tritt auch der Fall ein, daß ein Residuum in der Röntgenstruktur in mehreren Konformationen aufgetreten ist. Dann werden diese Alternativen in den Strukturdaten Angeboten. Ein Beispiel hierfür ist die Position des T203⁴ in der 1emb-Struktur des GFP [128] (vgl. Abschnitt 5.3).

Es hat sich gezeigt, daß die pK_a -Werte einzelner Gruppen im Protein von dessen Struktur abhängen [16]. Andererseits kann letztere durch die Verteilung der

⁴Wir verwenden zur Bezeichnung von Aminosäuren den Einbuchstabencode (vgl. Anhang A).

Protonen beeinflusst werden. Eine Möglichkeit unterschiedliche Konformationszustände zu erhalten bietet die Molekulardynamik-Simulation [17, 129–132]. Eine Schwäche dieser Methode liegt darin, daß großräumige Konformationsänderungen von Proteinen auf Zeitskalen von einigen Millisekunden oder gar Sekunden stattfinden können, MD-Simulationen derzeit aber nur Zeiträume einiger hundert Nanosekunden abdecken [133]. Daher ist es nicht gewährleistet, im Verlaufe einer Simulation viele Konformationssubzustände zu erreichen. Der Konfigurationsraum des Proteins wird dann nur ungenügend gut repräsentiert.

Eine zweite Problematik bei der Erzeugung von Konformationen mittels MD-Simulationen liegt in der Abhängigkeit der Proteindynamik von den elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Atomen des Proteins [73]. Diese ist aber wiederum durch den Protonierungszustand des Proteins mitbestimmt. Um eine MD-Simulation durchzuführen muß zuvor ein Protonierungszustand für das Molekül festgelegt werden. Die Dynamik wird durch diesen Zustand beeinflusst und die Konformation des Proteins entwickelt sich in eine Richtung, die gerade den gewählten Protonierungszustand stabilisiert [131, 134].

Um das Wechselspiel zwischen Protonenverteilung und Strukturänderung eines Proteins in einer Dynamik-Simulation besser zu berücksichtigen, wurden neue Ansätze entwickelt. Dabei werden Protonierungsfluktuationen durch instantane Sprünge von Protonen zwischen einzelnen titrierbaren Gruppen modelliert [135–138].

Während sich bei MD-Simulationen alle erreichten Zustände aus einem vorgegebenen Anfangszustand entwickeln, werden wir ein Verfahren verwenden, bei dem wir eine große Menge von K-Zuständen anbieten und aus diesen diejenigen auswählen, welche energetisch günstige Konfigurationen, zu einer Vielzahl von P-Zuständen, sind. Bei diesem Vorgehen können wir beliebig zwischen einzelnen Zuständen des Proteins hin- und herspringen und daher lokale Minima in der Energielandschaft finden ohne Rücksicht auf die Zeitskalen zu nehmen, die für den Übergang zwischen zwei lokalen Minima gelten (vgl. Abschnitt 4.3.4).

4.3.1 Hypothetische Strukturen

Um eine große Ausgangsmenge möglicher Strukturen zu erzeugen, könnten wir u. a. auf sogenannte „Rotamer Datenbanken“ zurückgreifen. Hier liegt die Idee zugrunde, daß die Seitenketten nur in bestimmten energetisch günstigen Konformationen, eben den Rotameren, vorliegen. Diese Informationen über lokale Minima in dem Konfigurationsraum der Aminosäuren wurden aus statistischen Analysen bekannter Strukturen gewonnen [139–142].

Natürlich können Konformationen für die Seitenketten auch kontinuierlich erzeugt werden, indem die Winkel aller internen Koordinaten der Residuen ge-

dreht werden [143–145]. In beiden Fällen kann die Anfangsmenge der hypothetischen Strukturen durch Kombination der unterschiedlichen Seitenketten-Konformationen aufgebaut werden. Die Aufgabe besteht nun darin, aus der Anfangsmenge diejenigen Strukturen zu selektieren, welche zu lokalen Minima im Konformationsraum des Proteins gehören. Hierfür ist eine Reihe von Algorithmen entwickelt worden. Bei der von Glick et al. vorgeschlagene Methode [146] werden beispielsweise diejenigen Rotamere entfernt, die in einem zufällig gewürfeltem Satz von Subzuständen des Proteins zu den energetisch höchsten, jedoch nicht zu den energetisch niedrigsten gehören⁵.

Wird die Anfangsmenge durch Kombination aller möglichen Rotamere miteinander gebildet, steigt die Zahl der Zustände in dieser Menge schnell. Um diese möglichst klein zu halten, werden wir in dieser Arbeit die hypothetischen Strukturen aus unterschiedlichen Röntgenstrukturen des Proteins gewinnen. Da diese tatsächlich existierende Strukturen des Proteins darstellen, gehen wir davon aus, daß sie sich zumindest in der Nähe lokaler Minima der Konformationslandschaft des Proteins befinden.

4.3.2 Positionieren der Protonen

Auf diese Weise legen wir zunächst die möglichen Konfigurationen der einzelnen Residuen bis auf die Koordinaten der Wasserstoffatome fest. Diese werden anschließend in die Struktur eingefügt. Da wir uns für die Protonierungszustände des Proteins interessieren, werden wir zwei Arten von Protonen besondere Aufmerksamkeit schenken. Das sind zum einen diejenigen, die direkt an einer Protonierungsreaktion an Sauerstoff- oder Stickstoffatomen teilnehmen. Zum anderen sind es Wasserstoffatome, die in polaren Gruppen gebunden sind und durch ihre Orientierung das elektrostatische Potential im Protein beeinflussen. Protonen dieser beiden Gruppen werden einen möglichst großen Konfigurationsraum erhalten. Alle übrigen Wasserstoffatome werden mit dem in CHARMM implementierten `hbuild`-Algorithmus [33] positioniert.

Wenn wir von den Torsionspotentialen ausgehen, die in dem CHARMM-Kraftfeld für Wasserstoffatome angeboten werden (vgl. Tabelle 4.1), stellen wir fest, daß es abhängig von den Bindungsverhältnissen zwei oder drei Positionen mit minimaler Torsionsenergie für das Proton gibt. Wir werden dem Proton die Möglichkeit geben jedes dieser Minima unabhängig von der Umgebung zu besetzen und sprechen dabei von der „Standardgeometrie“.

Soll das Proton eine Position außerhalb dieser optimalen Geometrie annehmen, muß die damit verbundene Torsionsenergie durch eine Wechselwirkung mit der

⁵In dieser Veröffentlichung wird auch ein guter Überblick über alternative Methoden gegeben.

Umgebung kompensiert werden. Da Wasserstoffbrücken bekanntermaßen [2] wesentlich zur Stabilisierung von Proteinstrukturen beitragen, werden wir für jedes Proton passende Partner für solche Anordnungen suchen.

Die dafür eingesetzten Kriterien sind in Abbildung 4.3 dargestellt. Das Atom, an welches ein Proton modelliert werden soll, wird hierbei als Donor D für eine Wasserstoffbrücke betrachtet. Zunächst suchen wir innerhalb einer Distanz d_{DA} um den Donor einen Akzeptor A. Als solche können polare Sauerstoff- und Stickstoffatome dienen. Finden wir einen solchen Partner, untersuchen wir, ob damit tatsächlich eine Wasserstoffbrücke etabliert werden kann. Hierfür berücksichtigen wir sowohl die elektrostatische (E^{el}) und die VAN-DER-WAALS-Wechselwirkung (E^{vdw}) zwischen dem Proton und dem potentiellen Akzeptor, als auch die Torsionsenergie (E^{dih}) des Protons an der zugehörigen Donorgruppe. Die Energien werden mit den Parametern des verwendeten Kraftfeldes berechnet. Andererseits soll auch die Geometrie der Wasserstoffbrücke einen Einfluß auf die Entscheidung haben.

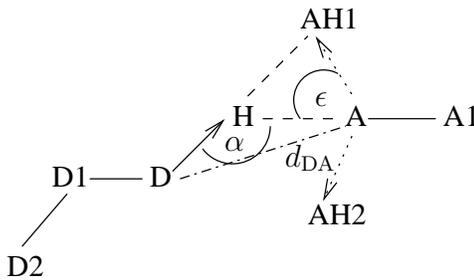


Abbildung 4.3: Das Proton H ist an den Donor D gebunden. D1 und D2 symbolisieren weitere Atome des Residuums an dem sich der Donor befindet. Diese definieren den Dihedralwinkel von H. Das Akzeptoratom A ist an A1 gebunden. Diese Bindung genügt, um die Richtungen der Hybridorbitale AH1 und AH2 zu bestimmen. Der Abstand zwischen D und A ist mit d_{DA} bezeichnet. Die Winkel α und ϵ beschreiben die Geometrie der Wasserstoffbrücke.

Für die Definition geometrischer Kriterien stützen wir uns auf die Parameter, die in dem Programm `HBexplore` von K. Lindauer et al. [147] verwendet wurden. Hierbei soll der Winkel α zwischen den Atomen DHA möglichst bei 180° liegen und größer als 90° sein. Um die Geometrie der Hybridorbitale des Akzeptoratomes zu berücksichtigen definieren wir ϵ als den Winkel zwischen der Bindung HA und der Richtung des Hybridorbitales von A, welches dem Proton am nächsten liegt. Dieser Winkel soll kleiner als 60° sein.

Mit den Energien und den Winkeln definieren wir die Energiegröße

$$E^{\text{hbd}} := [\cos^2(\alpha - \alpha_0) \cos^2((\epsilon - \epsilon_0) \cdot 1.5)] [E^{\text{el}} + E^{\text{vdw}} + E^{\text{dih}}] \quad (4.11)$$

und akzeptieren die fragliche Position des Protons als mögliche Wasserstoffbrücke nur, falls E^{hbd} kleiner als eine vorgegebene Energie $E_{\text{cut}}^{\text{hbd}}$ ist.

4.3.3 Monte-Carlo-Methode

Nachdem wir so die Menge der Ausgangszustände konstruiert haben, werden wir uns auf die Suche nach energetisch günstigen Strukturen begeben. Da wir die verschiedenen Konformere der Aminosäuren so gewählt haben, daß sie immer zu mindestens einer Umgebungskonformation optimal sind werden wir keine Rotamere finden, die nur zu den energetisch hohen aber nicht zu den niederenergetischen Proteinzuständen gehören. Das oben beschriebene Verfahren nach Glick et al [146] ist somit hier nicht anwendbar.

Motiviert durch die Arbeiten von Beroza et al. [72] werden wir alternativ eine Monte-Carlo-Methode [148] verwenden. Solche wurden bereits in vielen Arbeiten auf dem Gebiet der Proteinelektrostatik-Rechnungen erfolgreich eingesetzt [18, 21, 36, 37, 39, 40, 121, 149–152]. Dort wurden mit ihrer Hilfe u. a. mittlere Protonierungen einzelner Residuen in Proteinen sowie Titrationskurven berechnet.

Die dort verwendeten Algorithmen basieren auf der von Metropolis et al. [153] entwickelten „METROPOLIS-Monte-Carlo-Methode“. Dabei wird mittels eines MARKOV-Prozesses ein charakteristischer Pfad im Konfigurationsraum des Systems abgetastet. Diese Methode läßt sich wie folgt formulieren:

1. Wähle eine zufällige Startkonfiguration \mathbf{x}_0 .
2. Berechne deren Energie $E(\mathbf{x}_0)$.
3. Erzeuge eine benachbarte Konfiguration \mathbf{x}_1 .
4. Berechne $E(\mathbf{x}_1)$ und $\Delta E = E(\mathbf{x}_1) - E(\mathbf{x}_0)$.
5. Falls $\Delta E < 0$ dann akzeptiere \mathbf{x}_1 als neue Startkonfiguration $\mathbf{x}_0 := \mathbf{x}_1$; gehe zu Schritt 2.
6. Sonst akzeptiere \mathbf{x}_1 mit der Wahrscheinlichkeit $e^{-\beta\Delta E}$ als neue Startkonfiguration $\mathbf{x}_0 := \mathbf{x}_1$; gehe zu Schritt 2.
7. Sonst akzeptiere \mathbf{x}_0 als neue Startkonfiguration; gehe zu Schritt 2.

Da durch das spezielle Akzeptanzkriterium (Schritte 5 und 6) detailliertes Gleichgewicht [154] für die Energieverteilungen der akzeptierten Zustände gewährleistet wird, können thermische Mittelwerte als arithmetisches Mittel über diese Zustände ohne weitere Gewichtungsfaktoren berechnet werden. Außerdem werden hierbei besonders die statistisch wichtigen niederenergetischen Zustände erzeugt und die eher unwichtigen hochenergetischen vermieden. Dadurch können statistische Mittelwerte gut bestimmt werden, wobei nur ein geringer Teil der

Zustände erzeugt werden muß, die zur exakten Berechnung der Zustandssumme notwendig wären [155, 156].

Die einzelnen Schritte des METROPOLIS-Algorithmus müssen auf das jeweils vorliegende Problem angepaßt werden. Wir starten bei Schritt 1, indem wir aus der erzeugten Menge aller möglichen KP-Zustände einen Anfangszustand würfeln. In Schritt 3 wollen wir dann eine benachbarte Konformation erzeugen. Daher wählen wir nun eine Struktur die sich nur in einer Eigenschaft eines einzigen Residuums von der vorherigen Struktur unterscheidet. Hier können wir die Konformation oder den Protonierungszustand einer Gruppe ändern. Bei der letztgenannten Änderung wird ein Proton erzeugt oder vernichtet. Die MC-Simulation findet daher in einem großkanonischen Ensemble statt [82]. Hierbei geht das chemische Potential des Protons in den Energieunterschied ΔE zwischen den beiden Zuständen ein. Zur Berechnung von Titrationskurven müssen daher für jeden pH-Wert eigene MC-Simulationen durchgeführt werden.

Bei dem METROPOLIS-Verfahren werden, ausgehend von der Startstruktur, immer neue Strukturen erzeugt. Auf diese Weise wird ein Pfad in der Landschaft der Konformationsenergie des Proteins durchwandert. Nur wenn dieser Pfad repräsentativ für den Konfigurationsraum des Proteins ist, werden die so berechneten Mittelwerte mit den tatsächlichen thermodynamischen Eigenschaften des Systems übereinstimmen. Zerfällt aber der Konformationsraum des Proteins in mehrere Unterräume, zwischen denen eine geringe Übergangswahrscheinlichkeit besteht, kommt es vor, daß der Pfad nicht durch alle diese Unterräume führt. Als Konsequenz wird der Konfigurationsraum ungenügend abgetastet und die Mittelwerte falsch berechnet [157].

Für die Berechnung mittlerer Protonierungszustände kann das zur Folge haben, daß einige Protonierungszustände niemals in einer MC-Rechnung erreicht werden, weil die Energiebarriere zum Ausgangszustand zu hoch ist. Um für eine bessere Abdeckung des Konfigurationsraumes zu sorgen, werden daher mehrere MC-Rechnungen für unterschiedliche Startstrukturen durchgeführt. Beroza et al. haben für die Berechnung mittlerer Protonierungszustände einen Algorithmus entwickelt, bei dem zwei stark wechselnde Residuen gleichzeitig ihren Protonierungszustand ändern können [72]. So können Energieberge übersprungen werden, die auftreten wenn zwei dicht beieinander liegende Residuen die gleiche Ladung tragen.

Beroza et al. haben sich in dieser Arbeit [72] mit einem Modell beschäftigt, welches nur verschiedene Protonierungszustände bei fester Proteinkonfiguration annehmen kann. Wir werden hingegen ein System untersuchen, welches neben wenigen (zehn verschiedenen) P-Zuständen auch eine sehr große Zahl von K-Zuständen ($\approx 10^{34}$) besetzen kann. Zum einen erhalten wir dadurch eine schlechtere Konvergenz des reinen MC-Samplings, zum anderen wird der größte Teil des bei den Simulationen anfallenden Rechenaufwandes auf das Abtasten des, dem Prote-

in zugänglichen, Konformationsraumes verwendet. Für einen vorgegebenen Protonierungszustand sind aber die Konformationsenergien unabhängig von dem herrschenden pH-Wert. Bei der eben vorgestellten Vorgehensweise müssen, um pH-abhängige Kurven zu erzeugen, MC-Simulationen für verschiedene diskrete pH-Werte durchgeführt werden. Somit wird immer wieder der gleiche Konformationsraum mit den gleichen Konfigurationsenergien abgetastet.

In Abschnitt 3.2.2 haben wir gesehen, daß sich die großkanonische Zustandssumme aus einem pH-abhängigen Teil und den \mathcal{M} -Teilchen-Zustandssummen zusammensetzt. Gelingt es uns, letztere zu bestimmen, können wir daraus alle pH-abhängigen Größen ermitteln und müssen den Konformationsraum des Systems nur einmal abtasten.

4.3.4 Näherung der Zustandssummen

Im allgemeinen Fall wird es nicht möglich sein, die Zustandssumme der Protonierungssubzustände durch explizites Auswerten aller Zustände zu ermitteln. Da es, in der von uns konstruierten Startmenge, energetisch sehr günstige aber auch sehr ungünstige Zustände gibt, sind die Konformationsenergien der einzelnen Subzustände über ein breites Energieintervall verteilt. Durch den BOLTZMANNfaktor wird der Beitrag energetisch hoher Zustände zur Zustandssumme im Vergleich zu dem energetisch niedriger nur gering gewichtet. Diese Zustände treten dann auch nur mit geringen Wahrscheinlichkeiten auf.

Unter Ausnutzung dieser Eigenschaft können wir die Zustandssummen der Subzustände nähern, wenn wir die Zustände minimaler Energie in unserer Ausgangsmenge finden. Während Head et al. in ihrer Arbeit [158] lokale Minima suchen und die Beiträge der übrigen Konformationen durch MC-Simulationen in den Bereichen um diese Minima bestimmen, werden wir versuchen konsequent alle niederenergetischen Zustände in unserem Satz aufzusuchen.

Hierfür werden wir, wiederum von einer Startkonfiguration ausgehend, mit einer METROPOLIS-MC-Rechnung einen Pfad durch den Konfigurationsraum simulieren und uns die niederenergetischen Zustände merken. Da wir gezielt auf der Suche nach niederenergetischen Zuständen sind, werden wir unser System mittels *simulated-annealing* [159] abkühlen und somit in lokale Minima laufen. Darunter verstehen wir KP-Zustände des Systems, aus dem wir nach einer vorgegebenen Anzahl von MC-Versuchen nicht mehr entkommen. Um aber nicht in diesen Minima gefangen zu bleiben, werden wir das System schließlich wieder auf eine höhere Temperatur aufheizen.

Kapitel 5

Praktische Anwendung

5.1 Grün Fluoreszierendes Protein

Die Qualle *aequoria victoria* lebt in den Küstengewässern des Nordwestpazifiks und beeindruckt besonders durch ihr grünliches Leuchten. Diese Biolumineszenz kann durch das Zusammenwirken dreier Moleküle erklärt werden. Das Protein *Aequorin* erzeugt mit *Coelenterazin* ein blaues Licht, das von dem Grün Fluoreszierenden Protein absorbiert und bei einer Wellenlänge von etwa 510 nm mit hoher Ausbeute emittiert wird [160–164].

Das GFP besitzt eine Reihe interessanter physikalischer und chemischer Eigenschaften, die wir weiter unten diskutieren werden. Für die Anwendung ist dabei besonders wichtig, daß der Fluorophor aus Residuen der Primärstruktur des Proteins gebildet wird. So kann das GFP, einschließlich des Chromophors, in Zellen exprimiert werden. Die Fluoreszenz des GFP läßt sich auch durch künstliches Licht anregen und das Protein kann somit direkt als Marker für Experimente eingesetzt werden. Da Absorptions- und Fluoreszenzspektrum durch Mutationen im Protein und am Chromophor verschoben werden, stehen Marker unterschiedlicher Farbe zur Verfügung [165].

Da das GFP in einer Vielzahl von Organismen gebildet werden kann [166–169], ist es eine wichtige Sonde in der medizinischen und biologischen Forschung, z. B. als Marker bei der Genexpression [166]. Auch die Bewegung und das Schicksal von Zellen kann mit Hilfe des GFP verfolgt werden [170, 171]. Einen Überblick über die Eigenschaften und das breite Anwendungsspektrum des GFP geben die Artikel [25, 27, 28, 166].

5.1.1 Strukturelle Eigenschaften des GFP

Das grün fluoreszierende Wildtyp-GFP (wtGFP) besteht aus 238 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 27 kDa [172]. Die Röntgenstrukturen des wtGFP und einiger Mutanten zeigen, daß die dreidimensionale Struktur des Proteins als nahezu starrer Zylinder beschrieben werden kann, der durch 11 antiparallele β -Faltblätter geformt wird. Im Inneren dieses β -Fasses liegt eine α -Helix, die, etwa im geometrischen Mittelpunkt des Zylinders, den Fluorophor fixiert [173, 174]. Dieser wird durch die β -Faltblattstruktur gut vom umgebenden Lösungsmittel abgeschirmt. Die funktionellen Eigenschaften des Chromophors werden durch die Konformationen eines Wasserstoffbrückennetzes beeinflusst, das ihn umgibt (vgl. Abbildung 5.8 in Abschnitt 5.5).

5.1.2 Der Fluorophor

Der in Abbildung 5.1 dargestellte Chromophor des wtGFP bildet sich durch autokatalytische Zyklisierung der Aminosäuresequenz S65-Y66-G67 [165, 175]. Bei dieser Gruppe handelt es sich um ein 4-Hydroxy-Benzyliden-Imidazolidinon und wir wollen ihn deshalb im weiteren auch einfach als HBI bezeichnen. Er besteht aus dem Tyrosinring von Y66 und einem Imidazolidinon-Heterozyklus, den wir als HET bezeichnen wollen. Dieser entsteht durch die Zyklisierung der Backbone-Atome von S65 und G67, wobei es sich beim zweiten Stickstoffatom N2 um den Backbone-Stickstoff von Y66 handelt. Beide Ringe sind durch ein konjugiertes π -System verbunden.

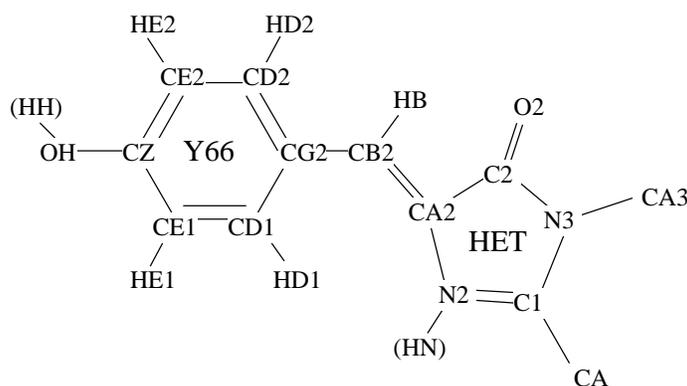


Abbildung 5.1: Struktur des GFP-Fluorophors HBI. Der Tyrosinring wird als Y66 bezeichnet und der Imidazolring als HET. Der HBI bindet mit den Atomen CA und CA3 an das Rückgrat des Proteins. Die an Dissoziationsreaktionen beteiligten Wasserstoffatome sind in Klammern gesetzt.

Da bei dem HBI sowohl der Sauerstoff aus der Hydroxylgruppe von Y66 (OH) als auch der Imino-Stickstoff von HET (N2) protonieren können, handelt es sich bei diesem Molekül um eine zweibasige Säure. Das Protonierungsgleichgewicht zwischen den beiden Gruppen wird daher ebenso durch vier mikroskopische Gleichgewichtskonstanten beschrieben, wie das System das wir in Abschnitt 3.3 mit dem Reaktionsschema 3.7 betrachtet haben.

In Abbildung 5.2 haben wir zur Erläuterung der Nomenklatur das Reaktionsschema für den Fluorophor dargestellt und die mikroskopischen pK_a -Werte eingetragen. Wir kodieren den P-Zustand wieder mit zwei Ziffern (0,1), wobei die

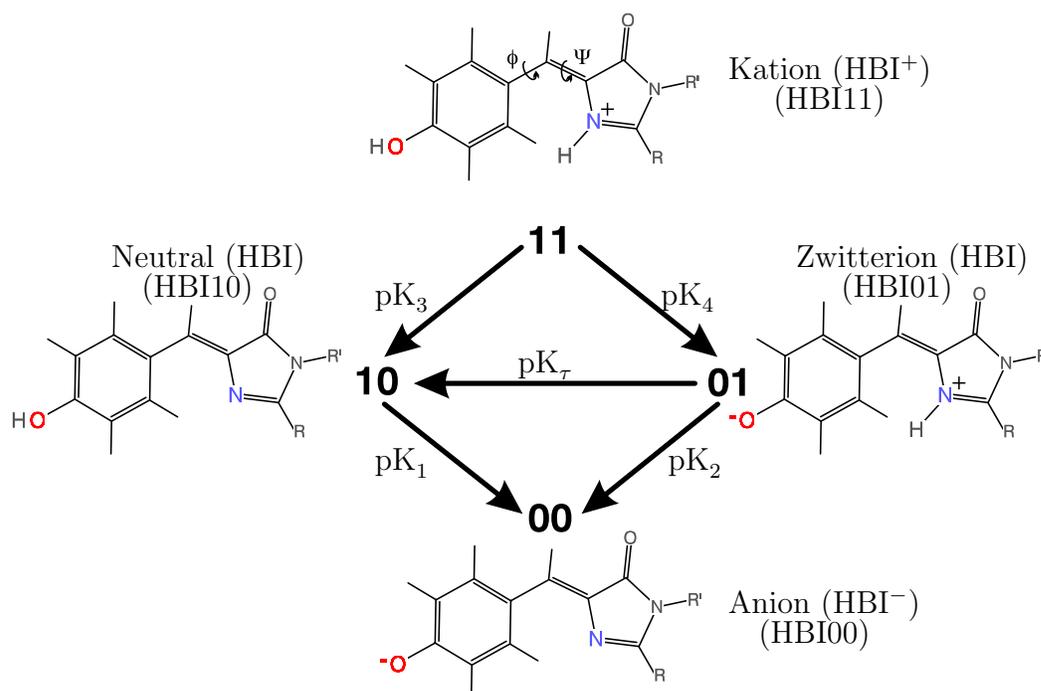


Abbildung 5.2: Dieses Reaktionsschema für den HBI stellt alle möglichen Protonierungszustände dieser Gruppe dar. Dabei kodieren wir den P-Zustand durch zwei Ziffern. Die erste steht für die Protonierung von Y66 und die zweite für die von HET. Die Pfeile geben die Richtungen an der Reaktionen an. Die zugehörigen Gleichgewichtskonstanten sind durch ihre pK_a -Werte vertreten.

erste für die Protonierung von Y66 und die zweite für die von HET steht. Somit bezeichnen wir beispielsweise das Zwitterion als 'HBI01'.

In den verschiedenen P-Zuständen besitzt der HBI unterschiedliche spektroskopische Eigenschaften. In den bis dato aufgelösten Röntgenstrukturen wurden keine Muster gefunden, die auf eine Stabilisierung des protonierten Imino-Stickstoffes hinweisen [176]. Auch Untersuchungen mit Raman-Spektroskopie sprechen gegen das Vorhandensein eines zweiten Protons am Chromophor [177–179]. Deshalb diskutieren wir die Photophysik des GFP zunächst unter der Voraussetzung eines deprotonierten N2 am Imidazolring.

5.1.3 Photophysik

In Abbildung 5.3 haben wir die, von Terry et al. [180] aufgenommenen, Anregungsspektren des rekombinanten GFP für verschiedene pH-Werte dargestellt.

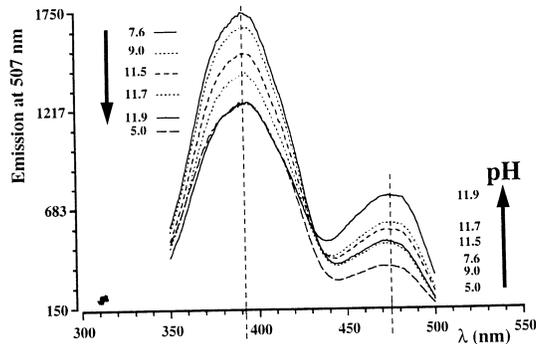


Abbildung 5.3: Anregungsspektren des rekombinanten GFP. Die Fluoreszenzemission wurde bei 507 nm gemessen und der pH-Wert in einem Bereich von 5.0 bis 11.9 variiert. Die Abbildung ist der Arbeit von Terry et al. [180] entnommen.

Dort können wir bei 392 nm und 475 nm Maxima in der Absorption¹ erkennen, die mit denen des wtGFP übereinstimmen [181, 182]. Mit steigendem pH-Wert nimmt die Absorption bei 475 nm zu, während die bei 392 nm abnimmt.

Diese pH-Abhängigkeit der Spektren, sowie Analysen der molekularen Struktur [128, 183] und quantenchemische Rechnungen [184] lassen darauf schließen, daß die beiden Absorptionsmaxima von unterschiedlichen Protonierungsformen des Fluorophors stammen. Die Fluoreszenz tritt unabhängig von der Anregungswellenlänge fast ausschließlich bei 507 nm auf [180]. Daraus läßt sich schließen, daß im angeregten Zustand ein Protonentransfer stattfindet und der HBI immer aus dem gleichen P-Zustand fluoresziert. Da Phenole² im angeregten Zustand sauer reagieren [185], wird die Emission bei 507 nm dem deprotonierten Zustand des angeregten Chromophors³ Y66* zugeschrieben [186, 187]. Durch Lichtemission gelangt der HBI wieder in den elektronischen Grundzustand und kann erneut protonieren.

Beide Protonierungszustände werden im wtGFP und in Mutanten gefunden. Da der jeweilige P-Zustand durch Reorientierung eines Wasserstoffbrückennetzes in der Chromophorumgebung stabilisiert wird, erfolgt die Umwandlung von dem, mit 'A' bezeichneten, protonierten Zustand (Y66h) in den, 'B' genannten, deprotonierten Zustand (Y66) über einen Zwischenzustand 'I', der in Röntgenstrukturen bisher nicht gesehen wurde [128]. Chatteraj et al. [186] haben dafür das in Abbildung 5.4 skizzierte Modell vorgeschlagen. Danach wandelt sich der Zustand A nach Anregung zu A* schnell und effizient in I* um, welcher durch Emission von Licht mit 507 nm zu I wird. Diesem Modell zufolge kann sich A langsam und uneffektiv in B verwandeln. Creemers et al. [188, 189] konnten durch spektrale Lochbrennexperimente bei tiefen Temperaturen zeigen, daß die Reaktionen $A \leftrightarrow I$ und $I \leftrightarrow B$ reversibel verlaufen und keine direkte Verwandlung $A \leftrightarrow B$ stattfindet. Damit kann I als echtes Intermediat betrachtet werden.

¹Maxima in Absorptions- und Emissionsspektren hängen u. a. von dem verwendeten Lösungsmittel und der Temperatur ab.

²Die Möglichkeit eines protonierten HET haben wir zunächst ausgeschlossen.

³Angeregte Zustände bezeichnen wir mit einem hochgestellten *.

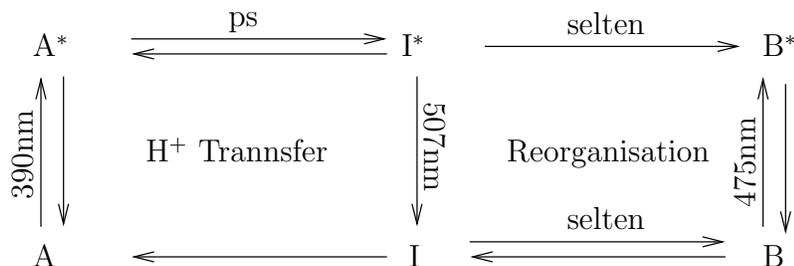


Abbildung 5.4: Von Chatteraj et al. [186] vorgeschlagenes Reaktionsschema für den Protonentransfer im GFP. Der Zustand mit protoniertem Y66 wird mit A bezeichnet. I und B bezeichnen Zustände mit deprotoniertem Y66. Die Wellenlängen sind für das rekombinante GFP angegeben.

Auch wenn es, auf Experimenten basierende, molekulare Modelle für die verschiedenen Zustände gibt, ist immer noch ungeklärt, welches Residuum als Akzeptor für das Proton von Y66 beim Protonentransfer im GFP dient. In der engeren Auswahl stehen hier vor allem H148 und E222. Im angeregten Zustand kann aber auch der Imidazolring (HET) basisch werden und ein Proton aufnehmen. Auch die Frage nach dem Ort des Protons im I-Intermediat ist von Interesse. Sie hängt eng mit der Dynamik des Protonentransfers im angeregten Zustand zusammen.

Um diese Dynamik zu beschreiben, müssen wir aber zunächst Kenntnis über die Gleichgewichtszustände des Systems gewinnen, die als Ausgangspunkt, Endpunkt und Zwischenzustände für den Protonentransferweg dienen. In dieser Arbeit werden wir uns deshalb mit den thermodynamischen Gleichgewichtszuständen beschäftigen und Ionisierungsgleichgewichte protonierbarer Gruppen im GFP berechnen.

Die Arbeit von Bokman und Ward [190] liefert einen experimentellen Hinweis auf die pH-abhängige Protonierung des Fluorophors. Abbildung 5.5 zeigt die bei 514 nm aufgenommene Fluoreszenzemission. Die Anregung der Proteine erfolgte dabei mit einer blauen Lampe, die vornehmlich diejenigen Chromophore mit deprotoniertem Tyrosinring anregt. Dadurch wird auch das Ansteigen der Emission mit zunehmendem pH-Wert erklärt. Daß die Emission in einem weiten Bereich (zwischen $\text{pH} \approx 6$ und 11) nahezu konstant ist, deutet auf eine in diesem Bereich konstante Konzentration des deprotonierten Fluorophors hin. Daraus können wir auf ein anomales Titrationsverhalten des Chromophors schließen, wie wir es in Abschnitt 3.3 allgemein beschrieben haben.

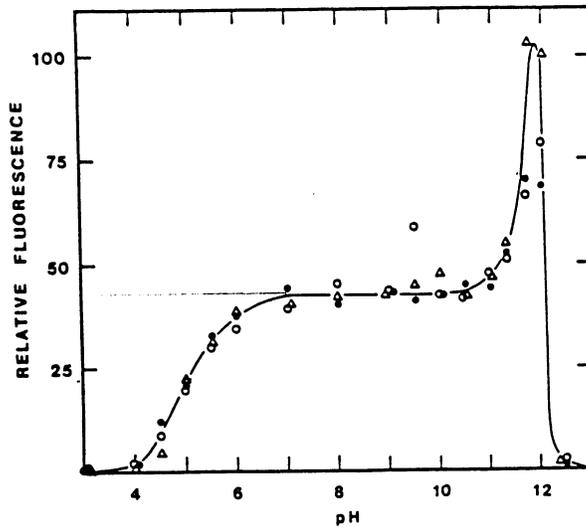


Abbildung 5.5: pH-abhängiges Fluoreszenzemissionsspektrum des wtGFP. Die Emission wurde bei einer Wellenlänge von 514 nm gemessen, während die Anregung durch eine blaue Lampe erfolgte. Die durchgezogene Linie beschreibt das Verhalten eines nativen GFPs, während die Symbole für renaturierte Proteine aufgenommen wurden. Das Bild ist der Arbeit von Bokman und Ward [190] entnommen.

5.2 Parametrisierung des Fluorophors

Obwohl der GFP-Chromophor aus drei Aminosäuren gebildet wird (vgl. Abschnitt 5.1.2), sind seine physikalischen Eigenschaften nicht durch die Parameter, die für diese drei Residuen zur Verfügung stehen, zu beschreiben. Daher müssen wir sowohl die Partiaalladungen als auch die Modell- pK_a -Werte für dieses Molekül modellieren (vgl. Abschnitt 3.2.7). Die VAN-DER-WAALS- und Bindungsparameter werden wir den vorkommenden Atomtypen entsprechend aus dem verwendeten Parametersatz entnehmen (vgl. Abschnitt 4).

5.2.1 Partiaalladungen

Die Partiaalladungen für den Chromophor haben wir für jeden Protonierungszustand mit quantenchemischen Rechnungen bestimmt. Da auch Ladungsmodelle für den angeregten Zustand benötigt werden, verwenden wir die semiempirische INDO/S SCF-CI-Methode (Programm ARGUS [191]). Als Koordinaten haben wir die Röntgenstruktur des Chromophors [128] genommen, wobei wir die Verbindungen zum Protein an den Atomen CA und CA3 (vgl. Abbildung 5.1) durch Methylgruppen ersetzt haben. Die in Tabelle 5.1 zusammengefaßten Partiaalladungen wurden für den Grundzustand (S0) und den angeregten Zustand (S1) mit einer MULLIKEN-Analyse aus den quantenchemischen Rechnungen ermittelt. Vergleichsrechnungen für Carboxylat-, Imidazol- und Phenolgruppen haben gezeigt, daß diese Methode Ladungssätze erzeugt, die mit den CHARMM-Ladungen konsistent sind.

| | S0 | | | | S1 | | | |
|-----|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | HBI00 | HBI10 | HBI01 | HBI11 | HBI00* | HBI10* | HBI01* | HBI11* |
| CA | 0.088 | 0.122 | 0.174 | 0.217 | 0.082 | 0.120 | 0.155 | 0.197 |
| C1 | 0.252 | 0.296 | 0.324 | 0.377 | 0.088 | 0.217 | -0.133 | -0.074 |
| N2 | -0.439 | -0.467 | -0.285 | -0.301 | -0.487 | -0.368 | -0.391 | -0.316 |
| HN | 0.000 | 0.000 | 0.285 | 0.284 | 0.000 | 0.000 | 0.285 | 0.284 |
| CA2 | 0.081 | 0.117 | 0.046 | 0.079 | 0.164 | 0.171 | 0.159 | 0.289 |
| C2 | 0.491 | 0.516 | 0.502 | 0.531 | 0.375 | 0.186 | 0.487 | 0.461 |
| N3 | -0.241 | -0.233 | -0.194 | -0.184 | -0.241 | -0.188 | -0.266 | -0.232 |
| O2 | -0.681 | -0.632 | -0.628 | -0.566 | -0.708 | -0.322 | -0.603 | -0.519 |
| CB2 | -0.001 | -0.020 | 0.024 | 0.034 | -0.270 | -0.136 | -0.079 | -0.046 |
| HB | 0.071 | 0.078 | 0.104 | 0.117 | 0.071 | 0.079 | 0.104 | 0.117 |
| CG2 | -0.024 | 0.022 | -0.028 | 0.002 | 0.160 | 0.038 | 0.146 | 0.169 |
| CD1 | -0.071 | -0.051 | -0.082 | -0.063 | -0.113 | -0.063 | -0.100 | -0.039 |
| HD1 | 0.067 | 0.092 | 0.034 | 0.055 | 0.067 | 0.092 | 0.034 | 0.055 |
| CD2 | -0.077 | -0.055 | -0.052 | -0.031 | -0.105 | -0.059 | -0.067 | 0.012 |
| HD2 | 0.035 | 0.067 | 0.057 | 0.085 | 0.035 | 0.067 | 0.057 | 0.085 |
| CE1 | -0.092 | -0.070 | -0.065 | -0.054 | 0.010 | -0.066 | 0.040 | -0.009 |
| HE1 | 0.053 | 0.063 | 0.071 | 0.077 | 0.053 | 0.063 | 0.071 | 0.077 |
| CE2 | -0.069 | -0.040 | -0.041 | -0.016 | 0.017 | -0.038 | 0.043 | 0.005 |
| HE2 | 0.051 | 0.069 | 0.079 | 0.095 | 0.051 | 0.069 | 0.079 | 0.095 |
| CZ | 0.210 | 0.137 | 0.246 | 0.177 | 0.238 | 0.141 | 0.264 | 0.280 |
| OH | -0.860 | -0.484 | -0.784 | -0.460 | -0.641 | -0.482 | -0.496 | -0.436 |
| CA3 | 0.154 | 0.178 | 0.216 | 0.242 | 0.154 | 0.184 | 0.212 | 0.241 |
| HH | 0.000 | 0.294 | 0.000 | 0.303 | 0.000 | 0.294 | 0.000 | 0.303 |

Tabelle 5.1: Berechnete Partialladungen des HBI: Die angegebenen Namen der Atome stimmen mit denen aus Abbildung 5.1 überein. Für jeden Protonierungszustand des HBI (vgl. Abbildung 5.2) sind die Partialladungen der einzelnen Atome im elektronischen Grundzustand (S0) und im angeregten Zustand (S1) angegeben.

5.2.2 Bestimmung der Modell-pK_as im Grundzustand

Neben den Ladungen benötigen wir die Modell-pK_a-Werte des Chromophors (vgl. Abschnitt 3.2.7). Bell et al. [177] haben experimentelle pK_a-Werte für einen Modellchromophor im Lösungsmittel veröffentlicht. Die beiden Werte wurden dem Kation/Neutral- (pK_a = 1.8) und dem Neutral/Anion- (pK_a = 8.2) Gleichgewicht zugeordnet. Diese Größen reichen aber nicht aus, um alle vier, in Abbildung 5.2 eingeführten, mikroskopischen pK_as zu bestimmen. Außerdem kann es sich bei den gemessenen makroskopischen Werten um gewichtete Mittelwerte der mikroskopischen Werte handeln. Die fehlende Fluoreszenz des HBI im Lösungsmittel [192] verhindert zudem eine experimentelle Untersuchung der Thermodynamik im angeregten Zustand. Wir werden deshalb im folgenden die mikroskopischen pK_a-Werte quantenchemisch berechnen.

Standardverfahren der Quantenchemie bestimmen die, mit der Dissoziationsreaktion verbundene, GIBBSsche freie Energie für ein Molekül in Gasphase und

setzen diese über einen thermodynamischen Zyklus in Verbindung mit der gleichen Reaktion im Lösungsmittel [193]. Ähnlich wie bei dem von uns verwendeten Zyklus (vgl. Abbildung 2.2) wird auch dort den auftretenden Solvatisierungsenergien Rechnung getragen. Dieser einfache Zugang vernachlässigt allerdings Energiebeiträge, wie sie durch die, bei der Solvatisierung auftretenden, Änderungen in der Kernkonfiguration entstehen. Bei einem so flexiblen und polarisierbaren Molekül wie dem HBI müssen daher die Lösungsmittelleffekte direkt in der quantenchemischen Rechnung berücksichtigt werden, um realistische Resultate für die Energieänderung bei einer Protonierungsreaktion zu liefern.

Rechnungen haben gezeigt, daß die Effekte der sogenannten „Bulk Polarisation“, die durch eine Kontinuumsbeschreibung des Lösungsmittels modelliert werden können, einen wichtigeren Beitrag erzeugen, als die durch eine mikroskopische Beschreibung des Lösungsmittels berücksichtigten [194]. Wir werden daher das im Programmpaket MOPAC [195] angebotene COSMO⁴ verwenden, um das Lösungsmittel in Kontinuumsnäherung zu beschreiben. Mittels der ebenfalls in MOPAC implementierten semiempirischen AM1-Parametrisierung des Hamiltonoperators berechnen wir die Protonierungsenergie

$$E_0^{\text{diss}} = E_0(1) - E_0(0) \quad (5.1)$$

als Differenz zwischen den Energien $E_0(s)$, der auf den jeweiligen Protonierungszustand ($s = 0, 1$) optimierten Molekülgeometrien. Diese Terme enthalten sowohl die elektronische Energie und die Energie der Kernkonfiguration des Moleküls als auch die Lösungsmittelbeiträge. Im Rahmen der verwendeten semiempirischen Verfahren ist E_0^{diss} bis auf eine additive Konstante proportional zur Dissoziationsenthalpie bei Zimmertemperatur [40]. Vergleicht man diese mit experimentell gefundenen Werten für die Größe ΔG_0^{exp} erhält man den empirischen Zusammenhang [40, 193]

$$\Delta G_0^{\text{exp}} = E_0^{\text{diss}} + \Delta G^{\text{korrr}}. \quad (5.2)$$

Der empirische Korrekturterm ΔG^{korrr} beinhaltet Beiträge der Entropie, Druck-Volumen-Arbeit und des chemischen Potentials des Wasserstoffatoms zur freien Energie der Dissoziationsreaktion. Er kann aus dem direkten Vergleich einer Reihe von experimentellen (ΔG_0^{exp}) und berechneten (E_0^{diss}) Werten für Testmoleküle mit Phenolsauerstoff und Stickstoff-Heterozyklus bestimmt werden [196].

Wie bereits in Abschnitt 3.2.7 erwähnt, haben *in vacuo* Rechnungen gezeigt, daß die Torsionsbarriere des Chromophors vom Protonierungszustand abhängt und bei protoniertem Y66 sehr niedrig ist [51]. Der Beitrag von Torsionsfreiheitsgraden zur Entropie eines Moleküls wird in der Quantenchemie gewöhnlich durch die „harmonische Oszillatornäherung“ beschrieben [195]. Diese ist aber nur für den Fall hoher Torsionsbarrieren gültig und liefert bei flachen Potentialen falsche Ergebnisse [197].

⁴Conductor-like-Screening Modell

Wir werden uns daher einer quantenmechanisch/klassischen Hybridmethode bedienen, die von Luo et al. vorgeschlagen [40] aber meines Wissens bisher noch nicht angewendet wurde. Um den Beitrag des fraglichen Rotationsfreiheitsgrades zur Änderung der freien Energie bei der Deprotonierungsreaktion des Moleküls zu bestimmen, werten wir bei diesem Verfahren die klassischen Konfigurationszustandssummen

$$\mathfrak{z}(s) = \int d\Phi' e^{-\beta E(\Phi', s)} \quad (5.3)$$

dieses Freiheitsgrades für das protonierte bzw. deprotonierte Molekül über den zugehörigen Konfigurationsraum $\Phi' = (\Phi, \Psi)$ aus⁵. Daraus bestimmen wir die Änderung

$$\Delta G^0 = -k_B T \ln \frac{\mathfrak{z}(0)}{\mathfrak{z}(1)} + \mu(\text{H}^+) \quad (5.4)$$

der freien Energie für die Dissoziationsreaktion. Wenn wir die Torsionsenergie auf die Energie $E_0(\Phi'_0(s), s)$ des Zustandes mit minimaler Energie $E_0(s)$ beziehen, erhalten wir

$$\mathfrak{z}(s) = e^{-\beta E_0(\Phi'_0(s), s)} \underbrace{\int d\Phi' e^{-\beta [E(\Phi', s) - E_0(\Phi'_0(s), s)]}}_{=: I(s)} = e^{-\beta E_0(\Phi'_0(s), s)} \cdot I(s) \quad (5.5)$$

anstelle von Gl. 5.3. Damit läßt sich der Beitrag dieses Freiheitsgrades zum pK_a -Wert als

$$\Delta \text{pK}_a^{\text{S}} := -\frac{1}{\ln 10} \ln \frac{I(0)}{I(1)} \quad (5.6)$$

schreiben und separat in dem zu berechnenden pK_a -Wert

$$\text{pK}_a = \frac{1}{k_B T \ln 10} \Delta E_0 + \Delta \text{pK}_a^{\text{S}} + \frac{1}{k_B T \ln 10} \Delta G^{\text{korr}} \quad (5.7)$$

darstellen.

Für die Berechnung der Protonierungsenergien sind wir von der Röntgenstruktur des HBI [128] ausgegangen, wobei die Atome CA und CA3 wiederum durch Methylgruppen ersetzt wurden. Wir haben die Grundzustandsgeometrien aller vier Protonierungszustände auf dem RHF-SCF+CID-⁵Level optimiert. Für die CI-Rechnungen wurde dabei ein aktiver Raum von sechs Elektronen und sechs Orbitalen eingesetzt.

Um die Integrale $I(s)$ (Gl. 5.5) auszuwerten haben wir die Energien $E(\Phi')$ (Gl. 5.3) für 81 diskrete Werte der Winkel $\Phi, \Psi \in [-30^\circ, 210^\circ]$ mit einer Schrittweite von $\Delta\Phi = \Delta\Psi = 30^\circ$ berechnet. In jedem Schritt wurden alle geometrischen Parameter optimiert.

⁵Die Winkel Φ und Ψ sind in Abbildung 5.2 gekennzeichnet.

Um den Symmetrieforderungen $E(-\Phi, \Psi) = E(\Phi, \Psi)$, $E(\Phi, -\Psi) = E(\Phi, \Psi)$ sowie $E(\Phi + \pi, \Psi) = E(\Phi, \Psi)$ gerecht zu werden haben wir diese Werte mittels eines Polynoms der Form

$$E(\Phi, \Psi) = \sum_K \sum_L A_{KL} \cos(K\Phi) \cos(L\Psi) \quad (5.8)$$

gefittet. Die zweidimensionale Integration wurde schließlich mittels der „erweiterten Trapezregel“ ausgeführt [198]. Auf diese Weise wurden mit Gleichung 5.7 die mikroskopischen pK_a -Werte für alle vier, in Abbildung 5.2, dargestellten Lösungsmittelreaktionen im Grundzustand berechnet und in Tabelle 5.2 zusammengestellt. Wir haben dort den Beitrag der Konfigurationsintegrale getrennt aufgeführt.

| | pK_3 | pK_1 | pK_4 | pK_2 | pK_α | pK_β | K_τ |
|------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|--------------------|-------------------|-------------------|
| Planarer HBI: | 1.5 | 6.6 | 4.5 | 3.6 | 1.5 | 6.6 | 10^{-3} |
| Flexibler HBI: | | | | | | | |
| $\text{pK}_a(\Phi'_0)$ | 2.1 | 6.9 | 5.4 | 3.6 | | | |
| ΔpK_a^S | -0.1 | +1.4 | +1.2 | +0.1 | | | |
| Summe: | 2.0 | 8.3 | 6.6 | 3.7 | 2.0 | 8.3 | $2 \cdot 10^{-5}$ |

Tabelle 5.2: Berechnete Werte für die, in Abbildung 5.2 definierten, mikroskopischen und zwei makroskopische pK_a -Werte des HBI im S0-Zustand. Für den flexiblen Chromophor wurden die Beiträge der optimierten Geometrie $\text{pK}_a(\Phi'_0)$ und der Konfigurationsintegrale ΔpK_a^S (Gl. 5.6) extra aufgeführt und summiert (Gl. 5.7).

In dieser Tabelle haben wir zusätzlich die makroskopischen pK_a -Werte für das Verhältnis HBI/HBI⁺ ($\text{pK}_\alpha = -\log(K_3 + K_4) = 2.0$) sowie HBI⁻/HBI ($\text{pK}_\beta = -\log((K_1^{-1} + K_2^{-1})^{-1}) = 8.3$) eingetragen. Diese beiden Werte für den Grundzustand sind in sehr guter Übereinstimmung mit dem oben erwähnten Experiment [177]. Wie die Tautomerisierungskonstante K_τ zeigt, wird der zwitterionische Zustand im Grundzustand nicht bevölkert.

Unsere quantenchemischen Rechnungen haben für den Chromophor im Lösungsmittel einen pK_a -Wert von 8.3 ergeben. Im Lösungsmittel ist allerdings die Rotation des Tyrosinringes möglich, während sie im Protein eingeschränkt ist. Wir werden deshalb für die Berechnung der Ionisierungsgleichgewichte im Protein die pK_a -Werte, die für den rigiden, planaren Chromophor berechnet wurden, verwenden. Fassen wir diesen als korrigierten pK_a -Wert des Chromophors im Lösungsmittel auf, so können wir den Beitrag ΔpK_a^S des Rotationsfreiheitsgrades mit der in Gleichung 3.45, aus Abschnitt 3.2.7, eingeführten Korrektur für unterschiedliche Konformationszustandssummen z^{konf} beider Protonierungszustände vergleichen. Der quantenchemisch berechnete Wert liegt nur etwa 0.2 pK-Einheiten höher als der dort abgeschätzte Wert ($\Delta A \approx 1.2$ pK-Einheiten).

5.2.3 pK_a-Werte im angeregten Zustand

Ausgehend von den eben ermittelten Grundzustands-pK_as werden wir nun mit Hilfe des Försterzyklus [199] über die vertikalen Anregungsenergien eine Beziehung zu den pK_a^{*}-Werten im angeregten Zustand herstellen. Dies setzt die Annahme voraus, daß der S1-Zustand lange genug lebt, um das thermodynamische Gleichgewicht zu erreichen, jedoch die Einstellungen der Protonierungsänderungen schneller sind als Schwingungs- oder Konformationsrelaxationen. Winkler et al. [200] haben gezeigt, daß dies auf die Verhältnisse im GFP für den Protonentransfer im angeregten Zustand zutrifft.

Beginnen wir mit der Differenz der pK_a-Werte

$$\text{pK}_a^* - \text{pK}_a = -\frac{1}{\ln 10} \left[\ln \frac{\mathfrak{z}^*(0)}{\mathfrak{z}^*(1)} - \ln \frac{\mathfrak{z}(0)}{\mathfrak{z}(1)} \right] = -\frac{1}{\ln 10} \left[\ln \frac{\mathfrak{z}^*(0)}{\mathfrak{z}(0)} - \ln \frac{\mathfrak{z}^*(1)}{\mathfrak{z}(1)} \right] \quad (5.9)$$

zwischen dem Grundzustand und dem angeregten Zustand und schreiben die Energie

$$E^*(\Phi', s) = E(\Phi', s) + \Delta E^*(\Phi', s) \quad (5.10)$$

des angeregten Zustandes in der Konformation (Φ', s) als Summe aus der zugehörigen Grundzustandsenergie $E(\Phi', s)$ und der vertikalen Anregungsenergie $\Delta E^*(\Phi', s)$, können wir die Zustandssummen in Gl. 5.9 separieren

$$\begin{aligned} \frac{\mathfrak{z}^*(s)}{\mathfrak{z}(s)} &= \frac{\sum_{\{\Phi'\}} e^{-\beta E^*(\Phi', s)}}{\sum_{\{\Phi'\}} e^{-\beta E(\Phi', s)}} \\ &= \frac{\sum_{\{\Phi'\}} e^{-\beta E(\Phi', s)} \cdot e^{-\beta \Delta E^*(\Phi', s)}}{\sum_{\{\Phi'\}} e^{-\beta E(\Phi', s)}} = \left\langle e^{-\beta \Delta E^*(\Phi', s)} \right\rangle \end{aligned} \quad (5.11)$$

und deren Verhältnis als thermischen Mittelwert über die BOLTZMANNFaktoren der vertikalen Anregungsenergien vom Grundzustand in den angeregten Zustand formulieren. Gleichung 5.9 nimmt dann die folgende Form an:

$$\text{pK}_a^* - \text{pK}_a = -\frac{1}{\ln 10} \ln \frac{\langle e^{-\beta \Delta E^*(\Phi', 0)} \rangle}{\langle e^{-\beta \Delta E^*(\Phi', 1)} \rangle} \quad (5.12)$$

Beziehen wir mittels

$$\begin{aligned} \Delta E^*(\Phi', s) &= \Delta E^*(\Phi'_0(s), s) + \underbrace{[\Delta E^*(\Phi', s) - \Delta E^*(\Phi'_0(s), s)]}_{=:\Delta \Delta E^*(\Phi', s)} \\ &= \Delta E^*(\Phi'_0(s), s) + \Delta \Delta E^*(\Phi', s) \end{aligned} \quad (5.13)$$

auch die Anregungsenergien auf den energetisch günstigsten Zustand $\Phi'_0(s)$, erhalten wir mit der Energieänderung im geometrieoptimierten Zustand

$$\Delta \text{pK}_a^* = \frac{1}{k_B T \ln 10} (\Delta E^*(\Phi'_0(0), 0) - \Delta E^*(\Phi'_0(1), 1)) \quad (5.14)$$

und dem Beitrag der Konformationsflexibilität

$$\Delta\Delta\text{pK}_a^{\text{S}^*} = -\frac{1}{\ln 10} \ln \frac{\langle e^{-\beta\Delta\Delta E^*(\Phi',0)} \rangle}{\langle e^{-\beta\Delta\Delta E^*(\Phi',1)} \rangle} \quad (5.15)$$

einen zu Gl. 5.7 analogen Ausdruck für den pK_a -Wert des Moleküls im angeregten Zustand:

$$\text{pK}_a^* = \text{pK}_a + \Delta\text{pK}_a^* + \Delta\Delta\text{pK}_a^{\text{S}^*}. \quad (5.16)$$

Die in Gl. 5.10 auftretenden vertikalen Anregungsenergien sind die Energiedifferenzen zwischen dem ersten elektronisch angeregtem Zustand und dem Grundzustand des Moleküls bei festgehaltenen Kernkoordinaten Φ' . Sie berechnen sich aus der Differenz zwischen der zweiten und der ersten Wurzel der CI-Matrix. Eine *ab-initio*-Studie [201] der Anregungen des HBI im Vacuum, unter Berücksichtigung der Elektronenkonfiguration auf dem MCSCF/PT-Level, hat gezeigt, daß die niedrigen Singulett-Anregungen nur auf $\pi \rightarrow \pi^*$ Übergängen beruhen und gut durch Übergänge zwischen den höchsten drei besetzten π und den niedrigsten drei virtuellen MOs beschrieben werden können. Dieses Ergebnis rechtfertigt unsere Wahl des aktiven Raumes für die CISD-Rechnungen, mit denen wir die in Tabelle 5.3 zusammengefaßten pK_a -Werte für den HBI im angeregten Zustand berechnet haben. An K_τ erkennen wir, daß im angeregten Zustand das Zwitterion gegenüber der neutralen Form energetisch bevorzugt ist.

| | pK_3^* | pK_1^* | pK_4^* | pK_2^* | pK_α^* | pK_β^* | K_τ^* |
|--|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------------|---------------------|-------------------|
| Planarer HBI*: | | | | | | | |
| ΔpK_a^* | +4.8 | -10.1 | -9.9 | +4.6 | | | |
| $\text{pK}_a + \Delta\text{pK}_a^*$ | 6.3 | -3.5 | -5.4 | 8.2 | -5.4 | 8.2 | $5 \cdot 10^{11}$ |
| Flexibler HBI*: | | | | | | | |
| $\Delta\text{pK}_a^*(\Phi'_0)$ | +4.8 | -11.1 | -11.8 | +5.5 | | | |
| $\Delta\Delta\text{pK}_a^{\text{S}^*}$ | +0.2 | +2.9 | +3.4 | -0.3 | | | |
| Summe: | 7.0 | 0.1 | -1.8 | 8.9 | -1.8 | 8.9 | $6 \cdot 10^8$ |

Tabelle 5.3: Berechnete Werte für die, in Abbildung 5.2 definierten, mikroskopischen und zwei makroskopische pK_a -Werte des HBI im S1-Zustand. Sowohl für den planaren als auch für den flexiblen HBI haben wir die einzelnen Beiträge extra aufgeführt und summiert. pK_a steht für den Wert im S0-Zustand (vgl. Tabelle 5.2). ΔpK_a^* beschreibt die Änderung bei vertikaler Anregung des planaren bzw. optimierten Zustandes. Für den flexiblen Chromophor wurden die Beiträge der optimierten Geometrie $\Delta\text{pK}_a^*(\Phi'_0)$ (Gl. 5.14) und der Konformationsflexibilität $\Delta\Delta\text{pK}_a^{\text{S}^*}$ (Gl. 5.15) extra aufgeführt und summiert (Gl. 5.16).

5.3 Erzeugung der hypothetischen Strukturen

Da es für das GFP eine Reihe gut aufgelöster Röntgenstrukturen von unterschiedlichen Mutanten und bei verschiedenen pH-Werten gibt, werden wir die verschiedenen Konformationssubzustände, die wir dem Proteinmodell zugänglich machen wollen, aus diesen Strukturen bestimmen. Tabelle 5.4 listet alle von uns verwendeten Strukturen zusammen mit ihrem PDB-Code auf.

| PDB-Code | Zahl | pH | Auflösung [Å] | Referenz |
|----------|------|-----|---------------|-----------------------|
| 1ema | 1 | 8.2 | 1.9 | Ormö et al. [173] |
| 1emb | 1 | 3.8 | 2.1 | Brejč et al. [128] |
| 1emc | 4 | 8.0 | 2.3 | Palm et al. [183] |
| 1eme | 1 | 8.5 | 2.5 | Palm et al. [183] |
| 1emg | 1 | 8.0 | 2.0 | Elslinger et al. [52] |
| 1emk | 1 | 8.5 | 2.1 | Palm et al. [183] |
| 1eml | 1 | 8.5 | 2.3 | Palm et al. [183] |
| 1emm | 1 | 8.5 | 2.3 | Palm et al. [183] |
| 1gfl | 2 | 7.0 | 1.9 | Yang et al. [174] |

Tabelle 5.4: Zusammenstellung der von uns verwendeten Röntgenstrukturen. Wir geben dabei die Kennung in der PDB-Datenbank, die Zahl der in der Datei vorhandenen Strukturen, den pH-Wert, die experimentelle Auflösung und schließlich die zugehörige Veröffentlichung an.

5.3.1 Konformationen von Aminosäuren

Diese 14 Strukturen werden mit einem „rigid body fit“ Verfahren [202] so aneinander angepaßt, daß die mittlere quadratische Abweichung der Abstände definierter Atome minimal wird. Durch das starre Proteinrückgrat des GFP fallen die Backbone-Atome der unterschiedlichen Strukturen hierbei aufeinander. Die verschiedenen Strukturen unterscheiden sich nur in den Orientierungen der Seitengruppen. Diese Überlagerung ist, wie auch die nächsten Schritte, in Abbildung 5.6 dargestellt.

In den verwendeten Strukturen sind ungefähr 230 Residuen aufgelöst. Diese können mindestens in 14 verschiedenen Konformationen vorkommen. Damit erhalten wir etwa 10^{263} verschiedene Konformationszustände. Allerdings interessieren wir uns für die Protonierungsgleichgewichte und die Photophysik des Fluorophors. Die mit dessen Ionisierung verbundenen Konformationsänderungen des Proteins sind in der nahen Umgebung des HBI lokalisiert. Röntgenstrukturen des Proteins bei unterschiedlichen pH-Werten [128, 173, 174, 176, 183] sowie Experimente mit FOURIER-transformierter-Infrarotspektroskopie [203] stützen diese

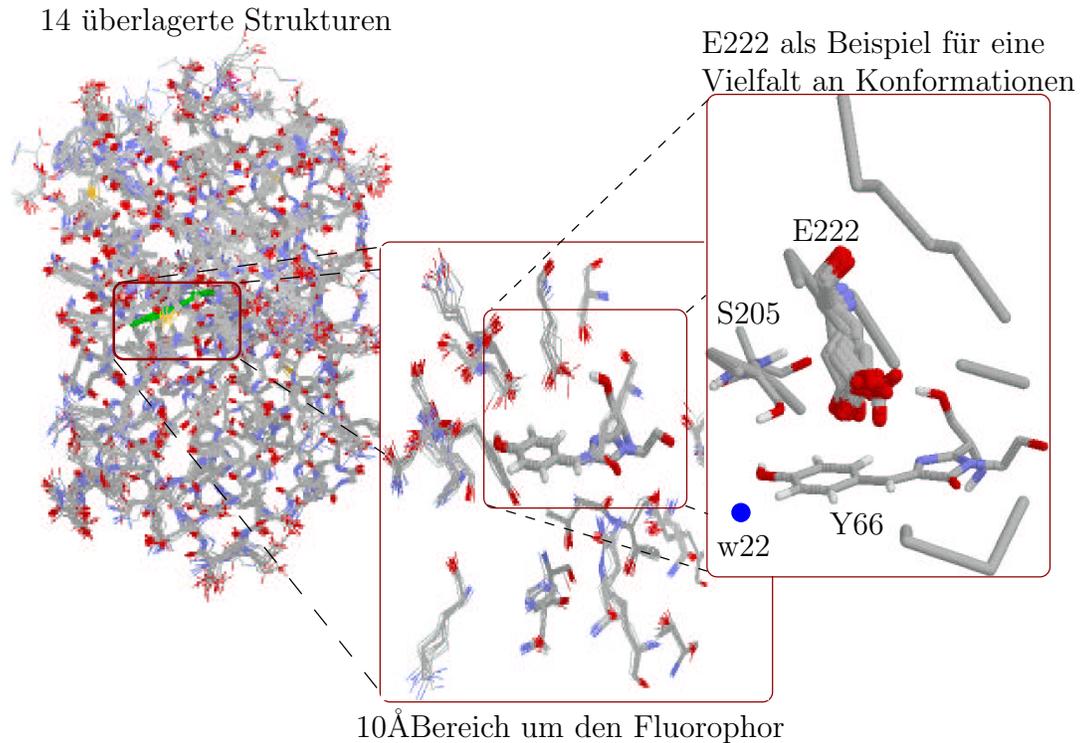


Abbildung 5.6: Skizze unseres Vorgehens beim Aufbereiten der Strukturdaten: Wir beginnen mit allen 14 Strukturen, die überlagert wurden. Dann beschränken wir uns auf einen engen Bereich um den HBI. Die dritte Vergrößerung zeigt E222 als Beispiel in allen 14 Konformationszuständen.

Aussage. Daher können wir die Anzahl der Zustände reduzieren, indem wir unsere Untersuchung auf einen engen Bereich um den Chromophor beschränken und nur dort verschiedene KP-Zustände für einzelne Residuen zulassen. Das notwendige Abstandskriterium definieren wir über die elektrostatische Wechselwirkung der Residuen mit dem HBI.

Wir werden uns auf den Bereich beschränken, in dem sich die elektrostatische Energie einzelner Atome im Feld des Chromophors um mindestens $2 k_B T$ ändert, wenn dieser aus dem Grundzustand (HBI10) protoniert (HBI11) oder deprotoniert (HBI00) wird. Hierzu führen wir drei DelPhi-Rechnungen für die unterschiedlichen P-Zustände des Chromophors an der 1emb-Struktur durch. Dabei stellen wir fest, daß alle Residuen, auf die dieses Kriterium zutrifft, innerhalb von 9 \AA um den Fluorophor liegen.

Weiterhin wollen wir uns auf Aminosäuren beschränken, deren Zustand einen Einfluß auf die Elektrostatik des Proteins hat. Neben dem HBI sind das zum einen die Aminosäuren Arginin, Glutaminsäure, Histidin und Tyrosin, die in der Biologie standardmäßig als titrierbare Gruppen betrachtet werden [2] und zum anderen die Seitenketten von Threonin, Serin, Glutamin und Asparagin. Letzte-

re besitzen polare Hydroxyl- bzw. Amidgruppen, die durch Umorientierung das elektrische Feld beeinflussen, aber auch als Partner für Wasserstoffbrücken dienen können.

Die Struktur des, den Chromophor umgebenden, Wasserstoffbrückennetzes steht im Mittelpunkt des Interesses. In das Solvent ragende Seitenketten haben keine festen Partner für solche Wechselwirkungen. Daher werden wir die Auswahl der berücksichtigten Residuen auf Seitenketten beschränken, die sich im Inneren des β -Fasses befinden. Grundlage für diese Unterscheidung bietet die dem Lösungsmittel zugängliche Oberfläche der einzelnen Gruppen und eine in Augenscheinahme der Struktur. Diejenigen Residuen, welche schließlich mit unterschiedlichen KP-Zuständen auftreten können, sind in Tabelle 5.5 zusammengefaßt.

Einige der Konformationen einzelner Seitenketten in den verwendeten Strukturen sind ähnlich, wenn nicht sogar gleich. Deshalb werden wir Konfigurationen, die nahe beieinander liegen, zu einer einzigen zusammenfassen. So reduzieren wir noch einmal die Zahl der hypothetischen Strukturen. Dieses Vorgehen ist auch deshalb sinnvoll, weil die Röntgestrukturen selbst Mittelwerte über Verteilungen von Konformationen sind und deshalb Konformationszustände des gleichen Residuums in verschiedenen Strukturen, die sich nur wenig unterscheiden, als verschiedene Realisierungen der gleichen Konformation betrachtet werden können.

Damit stehen wir vor der Aufgabe die Strukturen der einzelnen Residuen zu sogenannten „Clustern“ zusammenzufassen, die jeweils durch eine einzige Konformation des Residuums, den „Prototypen“, repräsentiert werden. Diese Aufgabe lösen wir unter Verwendung eines Verfahrens das als „nächster-Nachbar-Algorithmus“ bekannt [204] ist. Hiefür definieren wir zunächst den Abstand zwischen zwei Geometrien i und j eines Residuums

$$d_{ij} := \sqrt{\sum_{\nu=1}^m (\vartheta_{\nu,i} - \vartheta_{\nu,j})^2} \quad (5.17)$$

durch den Unterschied in ihren m Torsionswinkeln ϑ . Mit diesem Maß werden zunächst jeweils zwei Strukturen, die dicht beieinander liegen, zu Clustern gebündelt. Diese kleinen Cluster werden dann wiederum paarweise zu Gruppen zusammengefaßt. Das Verfahren wird solange fortgesetzt, bis der Abstand zwischen zwei Clustern einen vorher festgelegten „Lernparameter“ σ^{cluster} unterschreitet und somit kein weiteres Bündeln mehr möglich ist.

Die Wahl dieser Größe ist zunächst beliebig. Wir suchen hier einen Kompromiß, der alle Strukturen gut beschreibt aber möglichst wenige Prototypen benötigt. Wir haben gute Ergebnisse mit dem Wert $\sigma^{\text{cluster}} = 35^\circ$ erzielt. Die Zahl der für die einzelnen Gruppen verwendeten Prototypen ist in Tabelle 5.5 angegeben. Wenn die Konfigurationen zu Clustern zusammengefaßt sind, wählen wir aus jedem

| Residuum | voll | rsa | min | Residuum | voll | rsa | min |
|----------|------|-----|-----|----------|------|-----|-----|
| R96 | 15 | 3 | 2 | w1 | 8 | 8 | 2 |
| S72 | 25 | 25 | 6 | w2 | 8 | 8 | 2 |
| S205 | 27 | 27 | 10 | w3 | 10 | 10 | 1 |
| T59 | 6 | 6 | 2 | w6 | 3 | 3 | 1 |
| T62 | 6 | 6 | 3 | w7 | 7 | 7 | 3 |
| T63 | 5 | 5 | 2 | w8 | 9 | 9 | 1 |
| T108 | 6 | 6 | 2 | w9 | 1 | 1 | 1 |
| T203 | 19 | 19 | 3 | w12 | 7 | 7 | 4 |
| N121 | 4 | 4 | 1 | w13 | 7 | 7 | 2 |
| N149 | 4 | 4 | 4 | w14 | 6 | 6 | 2 |
| N185 | 8 | 8 | 3 | w15 | 5 | 5 | 2 |
| Q69 | 8 | 8 | 1 | w16 | 3 | 3 | 1 |
| Q94 | 6 | 6 | 1 | w17 | 3 | 3 | 2 |
| Q183 | 6 | 6 | 2 | w19 | 3 | 3 | 2 |
| E222 | 55 | 55 | 6 | w21 | 1 | 1 | 1 |
| H148 | 24 | 12 | 2 | w22 | 9 | 9 | 5 |
| H181 | 8 | 4 | 2 | w23 | 5 | 5 | 3 |
| Y92 | 4 | 3 | 2 | w27 | 4 | 4 | 3 |
| Y145 | 3 | 2 | 2 | w29 | 1 | 1 | 1 |
| S65 | 9 | 9 | 4 | w39 | 3 | 3 | 2 |
| HBI | 10 | 5 | 4 | w51 | 7 | 7 | 2 |
| V224 | 5 | 5 | 2 | w59 | 3 | 3 | 1 |
| | | | | w68 | 6 | 6 | 4 |

Tabelle 5.5: Zusammenfassung aller für den großen Satz verwendeten Residuen des GFP. Neben den Residuen sind die Zahl der KP-Zustände angegeben, die im großen Satz (voll) oder bei der Rechnung mit *reduced-site-approximation* (rsa) zur Verfügung gestellt wurden (vgl. Abschnitt 5.6). Die letzte Spalte (min) gibt an, wie viele dieser Zustände bei der Rechnung mit dem vollen Satz, im S0-Zustand des HBI, mit mehr als $0.5 \cdot 10^{-4}\%$ besetzt wurden (vgl. Abschnitt 5.6.2). Wassermoleküle werden mit 'w' bezeichnet.

Cluster die Struktur als Prototypen aus, die seinem geometrischen Zentrum am nächsten liegt.

Aufgrund des geringen Unterschiedes in der Kernladungszahl von Kohlenstoff, Stickstoff und Sauerstoff kann die Orientierung der Amidgruppen von Glutamin und Asparaginsäure, sowie die des Imidazolringes von Histidin in Röntgenstrukturanalysen nur schlecht bestimmt werden. Diese hat jedoch, wie Nielsen et al. [205] zeigten, einen starken Einfluß auf die Elektrostatik von Proteinen. Daher werden wir jedem Prototypen mit einer Amidgruppe eine weitere Konformation zuordnen, bei der das Sauerstoff- und das Stickstoffatom der Amidgruppe ver-

tauscht sind. Ebenso werden wir für die Histidine Konformationen anbieten, in der die Atome ND1 mit CD2 und NE2 mit CE1 vertauscht sind⁶.

5.3.2 Orte der Wassermoleküle

Ganz analog gehen wir bei der Positionierung von Wassermolekülen in den hypothetischen Startstrukturen vor. Die Röntgenstrukturen liefern hier nur die Positionen der Sauerstoffatome der im Protein gebundenen Wassermoleküle. Obwohl in den unterschiedlichen Strukturen die Wassermoleküle nicht an den gleichen Positionen auftreten, kann man charakteristische Wasserbindungsstellen ermitteln.

Konsequenterweise werden wir auch die Positionen der Sauerstoffatome einem Cluster-Verfahren unterwerfen. Als Abstandsmaß setzen wir in Gleichung 5.17 nun den euklidischen Abstand zwischen den Koordinaten der Atome ein. Da wir innerhalb des VAN-DER-WAALS-Radius von Wasser ($\approx 2,5 - 3\text{\AA}$) um ein Sauerstoffatom kein weiteres Wassermolekül erwarten, wählen wir den Lernparameter $\sigma^{\text{cluster}} = 2,5\text{\AA}$.

Auch bei den Wassermolekülen werden wir nur die Konformationsfreiheitsgrade der Moleküle berücksichtigen, die in der oben ermittelten 9\AA Umgebung um den Fluorophor und innerhalb des β -Fasses liegen. Als Ergebnis erhalten wir die Positionen von 23 Sauerstoffatomen, die zu Wassermolekülen in wenigstens einer der verwendeten Strukturdateien gehören.

Durch die eben getroffenen Auswahl einzelner Residuen, die in mehreren KP-Zuständen auftreten können, haben wir das Proteinmodell in zwei Einheiten aufgeteilt. Die erste, die wir als „fixes Set“ bezeichnen wollen, enthält neben dem Rückgrat alle Residuen, die ihren Zustand nicht ändern. Dieses Set bildet einen festen Hintergrund im Protein, der ebenfalls mit den Residuen der zweiten Einheit wechselwirkt. Dort sind alle Residuen enthalten, welche in verschiedenen KP-Zuständen auftreten können. Letztere werden wir „flexibles Set“ taufen.

Die in den Röntgenstrukturen nicht enthaltenen Wasserstoffatome werden mit dem in Abschnitt 4.3.2 beschriebenen Verfahren in die Strukturen eingefügt. Für die Suche nach möglichen Wasserstoffbrücken verwenden wir hierbei eine maximale Donor-Akzeptor Distanz von $d_{\text{DA}} = 4\text{\AA}$. Als Schranke für die Konfigurationsenergie der Wasserstoffbrücke setzen wir $E_{\text{cut}}^{\text{hbd}} = 5k_{\text{B}}T$.

⁶Die Namen der Atome von Histidin sind in Tabelle 5.8 erklärt.

5.4 Berechnung der Wechselwirkungsenergien

Nachdem wir auf diese Weise die Menge möglicher KP-Zustände erzeugt haben, die wir zur Berechnung der Protonierungsgleichgewichte verwenden wollen, müssen die Energien der einzelnen Konformationen bestimmt werden. Wie bei der Ableitung der Zustandssumme für das System in Abschnitt 3.2, werden wir nicht die Wechselwirkungen einzelner Atome sondern die Wechselwirkungsenergien ganzer Residuen miteinander betrachten.

Die von uns ausgewählten 45 Residuen bilden eine Menge von insgesamt 382 KP-Zuständen. Aus diesen Zuständen können wir etwa 10^{35} mögliche Proteinkonformationen erzeugen. Die Wechselwirkungsenergie der Residuen untereinander und mit der Proteinumgebung hängen nur von dem KP-Zustand der Residuen ($x_i = (\Phi_i, \varphi_i, s_i)$ mit $i = 1 \dots 45$) ab.

5.4.1 Elektrostatische Energien

Da wir beim GFP in der Lage waren, die hypothetischen Strukturen so zu wählen, daß alle Konformationsänderungen in dem vom Lösungsmittel abgeschirmten Inneren des Proteins stattfinden, haben wir bei allen Elektrostatikrechnungen die gleiche Proteinoberfläche, die durch Atome aus dem fixen Set definiert wird (vgl. Abschnitt 4.2.2).

Wechselwirkungen der Residuen

Um die elektrostatischen Wechselwirkungsenergien der Residuen im flexiblen Set untereinander für alle möglichen KP-Zustände des Proteins zu berechnen, genügt es daher, die linearisierte POISSON-BOLTZMANN-Gleichung (4.10) für alle 382 Zustände der einzelnen Residuen einmal zu lösen (vgl. Abschnitt 4.2.2).

Hierfür verteilen wir die Partiaalladungen q_k mit $k = 1 \dots M_i(x_i)$ gemäß des gewählten Parametersatzes auf die M_i Atome des i -ten Residuums im Zustand x_i . Die Ladungen aller übrigen Atome des Proteins werden null gesetzt. Zur Definition der Proteinoberfläche verwenden wir für alle Rechnungen die VAN-DER-WAALS-Parameter aus dem CHARMM-21-Parametersatz [33]. Tabelle 5.6 bietet eine Zusammenfassung aller für die DelPhi-Rechnungen verwendeten Parameter. Für das so definierte System berechnen wir mit DelPhi das Potential $\Phi_i(x_i, \mathbf{r}_l)$, welches von den vorgegebenen Ladungen an den Orten \mathbf{r}_l , $l = 1 \dots M$, der anderen Atome erzeugt wird. Die Wechselwirkung zwischen zwei Residuen i und j in den Zuständen x_i und x_j kann dann mit den Ladungen der Gruppe j berechnet

werden

$$W_{ij}^{\text{el}}(x_i, x_j) = \sum_{l=1}^{M_j(x_j)} q_l \Phi_i(x_i, \mathbf{r}_l(x_j)). \quad (5.18)$$

Die Solvatisierungsenergie sowie die Abschirmenergie des Residuums i im Protein $E_i^{\text{env}}(x_i)$ werden bei den DelPhi-Rechnungen zur Bestimmung von $W_{ij}^{\text{el}}(x_i, x_j)$ gleich mitberechnet [7, 106, 108, 109, 206]. Da diese Größe nur von dem KP-Zustand der Gruppen beeinflusst wird, genügt es, sie nur bei den Residuen im flexiblen Set zu berücksichtigen.

Die elektrostatische Wechselwirkungsenergie des Residuums i mit dem fixen Set des Proteinmodells bestimmen wir, indem allen Atomen aus diesem Set ihre Partialladungen zugewiesen werden. Mit DelPhi berechnen wir dann das zugehörige Potential $\Phi^{\text{fix}}(\mathbf{r}_l(x_i))$ an den Orten der Atome aus dem flexiblen Set. Die nur von ihrem KP-Zustand abhängige Energie

$$E_i^{\text{el}}(x_i) = \sum_{l=1}^{M_i(x_i)} q_l \Phi^{\text{fix}}(\mathbf{r}_l(x_i)) \quad (5.19)$$

der Gruppe i im Feld des fixen Sets, kann dann durch Summation über die Beiträge aller $M_i(x_i)$ Partialladungen dieser Gruppe ermittelt werden.

| | Protein | Lösungsmittel |
|------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Atomkoordinaten | kartesisch | kartesisch |
| Partialladungen | CHARMm-21 /Parse | CHARMm-21 /Parse |
| VAN-DER-WAALS-Parameter | CHARMm-21 | CHARMm-21 |
| Zahl der Gitterpunkte | $101 \times 101 \times 101$ | $101 \times 101 \times 101$ |
| Gitterfüllung im 1. Lauf | 60% | 30% |
| Gitterfüllung im 2. Lauf | 120% | 60% |
| ϵ^{prot} | 4 | 4 |
| ϵ^{solv} | 80 | 80 |
| Radius der Testkugel | 1.4 Å | 1.4 Å |
| Ionenausschlußradius | 2.0 Å | 1.4 Å |
| Ionenstärke (I_{\pm}^{∞}) | 0.145 mM | 0.145 mM |

Tabelle 5.6: Parameter der durchgeführten DelPhi-Rechnungen zur Bestimmung der Energien im Protein (W^{el} , E^{el} und E^{env}) und im Lösungsmittel (E^{solv}).

Lösungsmittel-Referenzwerte

Um den Beitrag der inneren, quantalen Freiheitsgrade der Residuen zu einer Protonierungsreaktion in der Zustandssumme des Systems (Gl. 3.24) zu berücksichtigen, werden wir, wie in Abschnitt 3.2.7 ausgeführt, den Modell-pK_a der Gruppen

in wässriger Lösung pK_i^{mod} verwenden. Dieser kann aus dem experimentellen Wert pK_i^{exp} durch die in Gleichung 3.45 angegebenen Korrekturen gewonnen werden.

Hierfür ist die Kenntnis der Solvatisierungsenergie des protonierten und des deprotonierten Moleküls im Lösungsmittel erforderlich. Um mit den von uns gewählten Parametern konsistent zu bleiben, berechnen wir die Solvatisierungsenergien der isolierten Residuen im Lösungsmittelkontinuum. Da sowohl die Oberfläche als auch die Multipolmomente des Moleküls durch dessen Konformation bestimmt werden, nimmt diese Einfluß auf die Solvatisierungsenergie der Gruppe. Grundsätzlich sollte deshalb die Relaxation der Struktur im Lösungsmittel bei solchen Rechnungen möglich sein. Dies könnte etwa durch MD-Simulationen des Moleküls in der Solventumgebung bewerkstelligt werden.

Eine andere Möglichkeit bietet die Verwendung der Molekülstruktur im Lösungsmittel bei der Rechnung, sofern diese bereits bekannt ist. Dabei bleiben allerdings weiterhin Unsicherheiten über die Richtigkeit der verwendeten Struktur und der Partiaalladungen bestehen. Diese könnten sich u. U. bei Konformationsänderungen ebenfalls verändern. Aus praktischen Gründen verwenden wir für die Residuen Konformationen aus dem flexiblen Set unseres Modellproteins. Die Backbone-Atome der einzelnen Aminosäuren werden dabei als ungeladen betrachtet, tragen aber durch ihre VAN-DER-WAALS-Radien zur Oberfläche der Gruppe bei. Die Eingabe-Parameter für die Rechnungen im Lösungsmittel sind in Tabelle 5.6 zusammengestellt.

Erhalten wir bei den DelPhi-Läufen für unterschiedliche Konformationen einer Aminosäure verschiedene Resultate, so mitteln wir diese Ergebnisse thermisch. Diese berechneten Solvatationsenergien E_i^{solv} , die mit den von Alexov und Gunner [21] verwendeten vergleichbar sind, haben wir in Tabelle 5.7 aufgeführt.

5.4.2 VAN DER WAALS- und Bindungsenergien

Analog zu den elektrostatischen Wechselwirkungen werden nach Gleichung 4.1 die VAN-DER-WAALS-Energien $W_{ij}^{\text{vdw}}(x_i, x_j)$ zwischen den Residuen im flexiblen Set untereinander und $E_i^{\text{vdw}}(x_i)$ der Gruppen aus dem flexiblen Set mit dem festen Set berechnet. Wir berücksichtigen hierbei die Wechselwirkungen zwischen den nicht-H-Atomen der einzelnen Residuen untereinander und mit den Wasserstoffatomen, die an Protonierungsreaktionen teilnehmen, und verwenden durchweg den CHARMM-21-Parametersatz [33].

Aus diesem Parametersatz werden auch die Konformationsenergien der einzelnen Residuen im flexiblen Satz berechnet. Diese hängen nur von der Struktur der einzelnen Residuen ab und werden aus den in Tabelle 4.1 definierten Beiträgen

$$E_i^{\text{konf}}(x_i) = E^{\text{bdg}}(x_i) + E^{\text{win}}(x_i) + E^{\text{dih}}(x_i) \quad (5.20)$$

zusammengesetzt.

| | | E^{solv} | pK_a^{exp} | $\ln \mathfrak{z}^{\text{h}}$ | pK_a^{mod} |
|-----------------------|----------|-------------------|----------------------------|-------------------------------|----------------------------|
| Tyrosin neutral | Yh | -1.31 | 10.1 | $\ln 2$ | 9.8 |
| Tyrosin-Anion | Y | -14.04 | 0.0 | | 0.0 |
| Arginin-Kation | Rh | -13.10 | 12.5 | $-\ln 4$ | 13.10 |
| Arginin neutral | R | -3.04 | 0.0 | | 0.0 |
| Glutaminsäure neutral | Eh | -1.63 | 4.3 | $\ln 2$ | 4.0 |
| Glutaminsäure-Anion | E | -14.20 | 0.0 | | 0.0 |
| Histidin-Kation | HIS11 | -11.35 | 20.0 | | 20.0 |
| Histidin neutral | HIS10/01 | -0.95 | 14.0 | | 13.7 |
| Histidin-Anion | HIS00 | -12.43 | 0.0 | | 0.0 |
| HBI-Kation (S0) | HBI11 | -6.46 | 8.1 | $\ln 2$ | 7.8 |
| HBI neutral (S0) | HBI10 | -3.83 | 6.6 | $\ln 2$ | 6.3 |
| HBI-Zwitterion(S0) | HBI01 | -9.70 | 3.6 | | 3.6 |
| HBI-Anion (S0) | HBI00 | -18.43 | 0.0 | | 0.0 |
| HBI*-Kation (S1) | HBI11* | -6.46 | 2.8 | $\ln 2$ | 2.5 |
| HBI* neutral (S1) | HBI10* | -3.83 | -3.5 | $\ln 2$ | -3.8 |
| HBI*-Zwitterion (S1) | HBI01* | -9.70 | 8.2 | | 8.2 |
| HBI*-Anion (S1) | HBI00* | -18.43 | 0.0 | | 0.0 |

Tabelle 5.7: Zusammenfassung der Energieterme der einzelnen Residuen, die nicht vom K-Zustand der Gruppen abhängen. Alle Werte sind in pK-Einheiten. Neben einer Beschreibung der einzelnen Gruppen geben wir die Kurzbezeichnung des Zustandes, die Solvatisierungsenergie, den experimentellen pK_a -Wert bezüglich des deprotonierten Grundzustandes, den Korrekturterm, den wir von dem experimentellen Wert abziehen und den schließlich verwendeten Modell- pK_a^{mod} an.

5.4.3 Ergänzung und Modifikation von Parametern

Der von uns verwendete Parametersatz ist für die MD-Simulationen von Proteinen ausgelegt und erfüllt nicht ganz unsere Ansprüche an Parameter für die Berechnung der Proteinelektrostatik. Zum einen existieren nicht für alle von uns verwendeten Protonierungszustände Partialladungen. Zum anderen werden wir einige Bindungsparameter so modifizieren, daß die Konformationsenergie für die modellierten Wasserstoffatome mit unserem Modell konsistent beschrieben wird.

Ladungsparameter

In unserem GFP-Modell soll Histidin auch in der zweifach deprotonierten Form vorkommen. Diese Form ist, ebenso wie das deprotonierte Tyrosin, nicht in den CHARMM-Parametern vertreten.

Die fehlenden Partialladungen sollen konsistent zu den übrigen Ladungen be-

stimmt werden. Dazu berechnen wir mit quantenchemischen Methoden die Partialladungen für das protonierte Molekül $q_i(1)$, $i = 1 \dots N$, und die der deprotonierten Form $q_i(0)$, $i = 1 \dots N - 1$, wobei N die Anzahl der Atome des Moleküls bezeichnet und das deprotonierende Wasserstoffatom mit N indiziert ist.

In unseren Fällen kennen wir jeweils die CHARMM-Ladungen $Q_i(1)$, $i = 1 \dots N$ für die protonierten Formen der Residuen. Die Ladungen der deprotonierten Form bestimmen wir, indem wir die berechneten Differenzen zwischen den beiden Zuständen nach

$$Q_i(0) = Q_i(1) + \alpha(q_i(0) - q_i(1)) \quad \text{mit} \quad i = 1 \dots N - 1 \quad (5.21)$$

auf die bekannten Ladungen verteilen. Dabei ist der Faktor

$$\alpha = \frac{Q_N(1) - (Q_{\text{tot}}(1) - q_{\text{tot}}(0))}{q_N(1) - (Q_{\text{tot}}(1) - q_{\text{tot}}(0))} \quad (5.22)$$

so gewählt, daß die Gesamtladungen für beide Parametrisierungen in den jeweiligen Zuständen die gleichen sind, d. h. $Q_{\text{tot}}(1) = q_{\text{tot}}(1)$ und $Q_{\text{tot}}(0) = q_{\text{tot}}(0)$.

Im CHARMM-Parametersatz wird allen Atomen gleichen Typs im Proteinerückgrat die gleiche Ladung zugewiesen. Deshalb wurden die Partialladungen nur für die Atome der Seitenketten berechnet. Die freien Valenzen an Amino- und Carboxylgruppe der Aminosäuren wurden mit Wasserstoffatomen gesättigt. Die in Tabelle 5.8 zusammengefaßten Ladungen wurden mit der AM1-Methode (Programmpaket MOPAC) berechnet (vgl. Abschnitt 5.2.1).

Torsionspotentiale

Das Proton der Glutaminsäure kann, wie wir bereits an Abbildung 2.1 deutlich gemacht haben, in der Ebene der Carboxylgruppe in *syn*- oder *anti*-Konformation orientiert sein. Dabei wird bei fehlenden Wasserstoffbrückenpartnern die *syn*-Position bevorzugt, da so die Elektrostatik des Moleküls energetisch günstiger ist [21]. Diese Bevorzugung ist im verwendeten CHARMM-Parametersatz nicht berücksichtigt. Das zugehörige Torsionspotential weist beiden Zuständen die gleiche Energie zu.

Eine einfache Abschätzung der COULOMB-Energie des Protons im Feld der übrigen Atome für die beiden Strukturen zeigt, daß die *syn*-Konformation um $2,2 \text{ k}_B\text{T}$ günstiger ist als die *anti*-Konformation. Um diese Differenz in der Gesamtenergie zu berücksichtigen, wird die Formel für die Torsionsenergie im Vergleich zu Tabelle 4.1 modifiziert [39]:

$$E_{\text{GLU}}^{\text{dih}}(\varphi) = k_{\vartheta}[1 + \cos(2\vartheta - \pi)] - k'_{\vartheta} \cos(\vartheta) \quad \text{mit} \quad \begin{array}{l} k_{\vartheta} = 2.03 \text{ k}_B\text{T} \\ k'_{\vartheta} = 2.28 \text{ k}_B\text{T} \end{array} \quad (5.23)$$

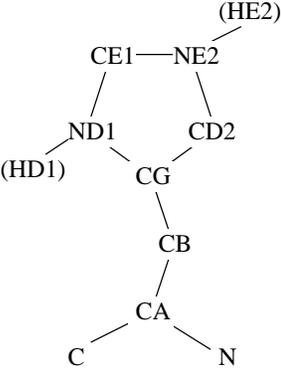
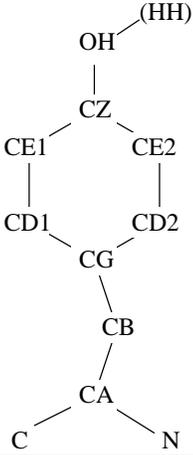
| | | | | | |
|---|--|----------|--------|--------|--------|
|  | H00 | H10 | H01 | H11 | |
| | CB | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.100 |
| | CG | -0.045 | 0.100 | 0.100 | 0.150 |
| | CD2 | 0.000 | 0.100 | 0.100 | 0.200 |
| | ND1 | -0.551 | -0.400 | -0.400 | -0.300 |
| | HD1 | – | 0.300 | – | 0.350 |
| | CE1 | 0.147 | 0.300 | 0.300 | 0.450 |
| | NE2 | -0.551 | -0.400 | -0.400 | -0.300 |
| | HE2 | – | – | 0.300 | 0.350 |
| |  | Y | Yh | | |
| CB | | -0.068 | 0.000 | | |
| CG | | -0.077 | 0.000 | | |
| CD1 | | -0.053 | 0.000 | | |
| CE1 | | -0.091 | 0.000 | | |
| CD2 | | -0.053 | 0.000 | | |
| CE2 | | -0.091 | 0.000 | | |
| CZ | | 0.369 | 0.250 | | |
| OH | | -0.936 | -0.650 | | |
| HH | | – | 0.400 | | |

Tabelle 5.8: Partialladungen die wir für die P-Zustände von Histidin und Tyrosin verwenden. Die Ladungen für Y und H00 (fettgedruckte Überschriften) wurden nachparametrisiert (siehe Text). Die übrigen Ladungen sind dem CHARMM-21-Parametersatz entnommen. Die Strukturen neben den Tabellen geben die Atomnamen in CHARMM-Nomenklatur an. Protonen, die an Dissoziationsreaktionen teilnehmen, sind in Klammern gesetzt.

Ähnliche Überlegungen begründen die Bevorzugung eines Torsionswinkels von 180° für das verbleibende Proton am NH1 des neutralen Arginin, das dort deprotoniert ist. Für die Deprotonierung an NH2 ergibt sich hierbei keine solche Differenz in der elektrostatischen Energie. Die Torsionsenergie eines an NH2 deprotonierten neutralen Arginins berechnen wir daher mit der CHARMM-Funktion. Ist das Residuum jedoch an NH1 deprotoniert, verwenden wir die Funktion [39]:

$$E_{\text{ARG-NH1}}^{\text{dih}}(\varphi) = k_\vartheta [1 + \cos(2\vartheta - \pi)] - k'_\vartheta \cos(\pi - \vartheta) \quad \text{mit} \quad \begin{matrix} k_\vartheta = 3.46 \text{ k}_B\text{T} \\ k'_\vartheta = 2.28 \text{ k}_B\text{T} \end{matrix} \quad (5.24)$$

Modell-pK_a-Werte

Zur Vervollständigung unseres Modelles fehlen nur noch die pK_a^{mod}-Werte, die wir für die freie Energie der Lösungsmittelreaktion einsetzen wollen (vgl. Abschnitt 2.2.1). Hierfür stützen wir uns auf gemessene Werte für die Dissoziationsreaktionen der einzelnen Residuen in Lösung. In Abschnitt 3.2.7 haben wir gesehen, wie diese experimentellen Daten zu korrigieren sind, um die freie Energie für die Protonierung in einer ausgewählten Konformation zu erhalten.

Die Korrekturterme für die einzelnen Residuen haben wir mit den eingesetzten experimentellen Werten in Tabelle 5.7 zusammengefaßt. Für die Standardamino-säuren wollen wir, wie es bei solchen Rechnungen üblich ist, annehmen, daß protonierungsabhängige innere Freiheitsgrade nicht zum Lösungsmittel-pK_a^{exp} beitragen. Allerdings wollen wir auf einer sehr einfachen Ebene den Entropiefaktor berücksichtigen, der durch Symmetrien der Residuen entsteht. Beim Tyrosin kann sich das Proton in zwei unterschiedlichen Positionen in der Ringebene befinden. Das führt zu einem Faktor zwei in der Zustandssumme \mathfrak{z}^H . Den gleichen Faktor erhalten wir für das Glutamat, da das Proton an jedem der beiden Sauerstoffatome die *syn*-Konformation einnehmen kann.

Diese Korrekturen, verschieben den pK_a^{mod} im Vergleich zur Lösungsmittelreaktion zu niedrigeren Werten hin. Wir haben dabei die vereinfachenden Annahmen gemacht, daß die Wechselwirkung mit den Backbone-Gruppen vernachlässigbar ist und das protonierte Glutamat im Lösungsmittel nur in der *syn*-Konfiguration vorliegt. Ähnliche Überlegungen ergeben für die Dissoziationsreaktion des Arginins einen Faktor vier. Hier führt die Korrektur allerdings zu höheren Werten, da der Entropiebeitrag durch Entfernen eines der vier Protonen entsteht.

In der von uns verwendeten Gleichung für die Energie eines KP-Zustandes (Gl. 3.22) geben wir die Energie dieses Zustandes im bezug auf den deprotonierten Referenzzustand des Systems an. Der Unterschied in der freien Energie (\propto pK_i^{mod}) gibt also die Differenz zum deprotonierten Zustand an. Für die Beschreibung einbasiger Säuren besteht dabei kein Unterschied zum pK_a-Wert der Dissoziationsreaktion. Bei zweibasigen Säuren müssen wir allerdings die Gleichgewichtskonstanten für die Protonierungsreaktionen angeben. In Abbildung 5.7 haben wir für den HBI die theoretischen und für Histidin die experimentellen Werte der mikroskopischen pK_a-Werte eingetragen. Aus diesen Schemata können wir die Werte entnehmen, die in Gleichung 3.22 als Modellparameter eingesetzt werden müssen.

In dieser Abbildung haben wir auch Korrekturterme für den HBI angegeben, die für die Protonierungsreaktion am Y66 zu berücksichtigen sind. Zwar wurde bei der Berechnung der pK_a-Werte in Abschnitt 5.2 das Proton am Tyrosinsauerstoff nur in einer Position modelliert, aber der so vernachlässigte Entropiebeitrag steckt in dem empirischen Korrekturterm ΔG^{korrr} (vgl. Gl. 5.2).

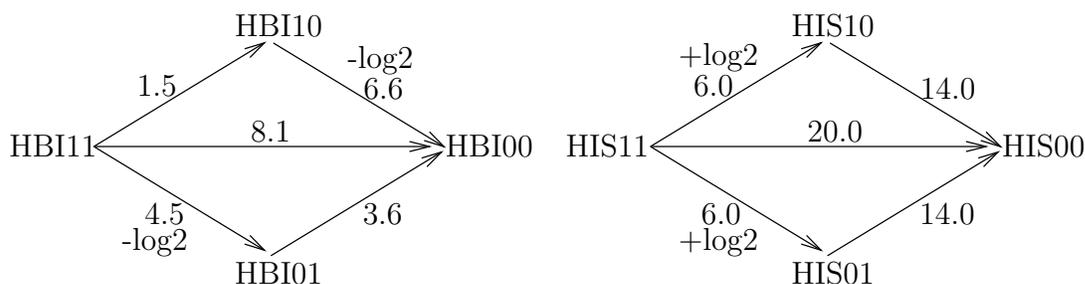


Abbildung 5.7: Reaktionsschemata für den HBI (links) und Histidin (rechts). Die P-Zustände sind wiederum durch zwei Ziffern kodiert (vgl. Tabelle 5.7). Die Pfeile geben die Richtung und die Werte die mikroskopischen pK_a -Werte der Dissoziationsreaktionen an. Die Logarithmen zeigen die Entropiekorrektur an.

Für den Modell- pK_a -Wert des Histidins finden wir in der neueren Literatur Werte zwischen 6.3 bei Beroza et al. [38] und 7.0 bei Bashford et al. [18]. Letztgenannte verwenden zwei verschiedene Werte für die Dissoziationsreaktion des NE2h- (6.6) und des ND1h-Tautomers (7.0). Sie stützen sich dabei auf NMR-Untersuchungen von Tanokura [207]. Dort werden u. a. Histidine untersucht, bei denen jeweils ein Stickstoff mit einer Methylgruppe geblockt ist. Bei diesen Experimenten im Lösungsmittel wird eine Bevorzugung des NE2h-Tautomers gefunden. Diese, schon früher von Blomberg et al. [208] und Roberts et al. [209] festgestellte Asymmetrie wird durch eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem ND1-Stickstoff und der Aminogruppe erklärt [199].

Da im Protein die Amino- und Carboxylgruppe eines Residuums Teil des Rückgrates sind, wird dort das Gleichgewicht zwischen den Tautomeren des Histidins nicht durch die gleichen Wechselwirkungen bestimmt wie im Lösungsmittel. Roberts et al. [209] stellen zwar fest, daß in nahezu allen, bis 1982 untersuchten Proteinen ebenfalls das NE2h-Tautomer dominiert. Sie diskutieren aber auch das Beispiel der katalytischen Triade in der Serinprotease [210]. Dort wird durch eine Wasserstoffbrücke zwischen H57 und der Carboxylgruppe von D102 das ND1h-Tautomer stabilisiert [211, 212]. Auch im GFP wird bei H148 das ND1h-Tautomer bevorzugt, da dort der NE2-Stickstoff eine Wasserstoffbrücke mit der Amidgruppe des Backbones von R168 eingeht [128]. In beiden Fällen wird das Gleichgewicht zwischen den beiden Tautomeren durch Wasserstoffbrücken im Protein verschoben. Da wir, durch die in Abschnitt 4.3.2 dargestellten Modellierung von Protonen in die Modellstruktur, diese besonders berücksichtigen, erwarten wir auch, deren Einfluß auf die pK_a -Werte der Residuen im Protein explizit zu erhalten. Deshalb werden wir beiden Formen des Histidins den gleichen pK_a^{mod} -Wert zuweisen. Wir werden dabei, ebenfalls nach Tanokura [207], 6.0 als experimentellen Wert zugrunde legen. Somit betrachten wir das Histidin als symmetrisches Molekül und müssen diesen Wert deshalb im Modell zu höherem pK_a^{mod} hin verschieben. Für die totale Protonierung H11→H00 haben wir nach Stewart [199] einen Wert von

20 zugrunde gelegt.

5.4.4 Energieformel für das Modellsystem

Mit den eben beschriebenen Energiebeiträgen können wir zu jedem KP-Zustand des GFP eine Energie angeben und damit die Zustandssumme (Gl. 3.24) für das System berechnen. Die in Gleichung 3.22 definierte Konformationsenergie eines solchen Zustandes ergibt sich zu

$$E^{\text{konf}}(\mathbf{x}) = \sum_{i=1}^N [E_i^{\text{env}}(x_i) + E_i^{\text{el}}(x_i) + E_i^{\text{vdw}}(x_i) + E_i^{\text{konf}}(x_i)] + \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1, j \neq i}^N [W_{ij}^{\text{el}}(x_i, x_j) + W_{ij}^{\text{vdw}}(x_i, x_j)]. \quad (5.25)$$

Die Modell- pK_a^{mod} -Werte aus Tabelle 5.7, die in die freie Energie eingehen, könnten wir nun eigens um die, in der gleichen Tabelle aufgeführten, Solvatisierungsenergien korrigieren und einsetzen. Es ist aber oft handlicher, nur eine einzige Energieformel, in der alle Beiträge auftreten, zu verwenden. Wir wollen daher nur die entropiekorrigierten pK_a^{mod} -Werte verwenden und den Beitrag der Solvatisierungsenergie extra angeben. Gehen wir zum großkanonischen Ensemble über und ersetzen das chemische Potential nach Gl. 2.5 durch den pH-Wert, erhalten wir mit den Gleichungen 3.24, 3.43 und 3.23 einen geschlossenen Ausdruck für die Energie des Proteins in einem KP-Zustand \mathbf{x} :

$$E^{\text{modell}}(\mathbf{x}) = k_B T \ln 10 \sum_{i=1}^N s_i (\text{pH} - \text{pK}_i^{\text{mod}}) + E^{\text{konf}}(\mathbf{x}). \quad (5.26)$$

Dabei haben wir die Energie des deprotonierten Grundzustandes abgezogen.

5.5 Untersuchung eines Systems mit wenigen KP-Zuständen

In den vorangegangenen Abschnitten haben wir für das GFP einen Konfigurationsraum mit $1.4 \cdot 10^{35}$ KP-Zuständen erzeugt und parametrisiert. Für ein so großes System ist es nicht mehr möglich, die Zustandssumme explizit durch Summation über die Energien aller zugänglichen Mikrozustände zu berechnen. Stattdessen müssen wir uns statistischer Methoden bedienen, wie sie in Abschnitt 4.3.3 beschrieben wurden.

Um die Ergebnisse dieser numerischen Verfahren besser bewerten und interpretieren zu können, müssen wir zunächst ein Gefühl für den Zusammenhang zwischen Konformations- und Protonierungsänderungen im Allgemeinen und das von uns untersuchte System im Speziellen entwickeln. Hierfür beschränken wir uns zur Definition der KP-Zustände auf die Koordinaten aus der 1emb-Struktur (vgl. Tabelle 5.4). Das einzige Residuum, welches dort in mehreren Konformationszuständen vorkommt, ist T203. Wir werden beide Zustände dieser Gruppe berücksichtigen.

Weiterhin reduzieren wir die Zahl der protonierbaren Gruppen. Dazu betrachten wir nur diejenigen Residuen innerhalb eines DEBYE-Abstandes von 8Å um den HBI. Hier finden wir die Gruppen Y66, HET, H148 und E222. Da es für die Protonierung von HET keine experimentellen Anzeichen gibt (vgl. Abschnitt 5.1.2), nehmen wir diesen vorerst deprotoniert an. Außerdem nehmen wir an, daß H148 mit NE2 über eine Wasserstoffbrücke zur Amidgruppe des Rückgrats von R168 gebunden und an ND1 protoniert ist. Damit bleibt nur noch E222 als zweite protonierbare Gruppe übrig. Alle anderen protonierbaren Residuen halten wir im jeweiligen Standardprotonierungszustand fest.

Bei dieser Auswahl haben wir uns auf die Protonierungszustände gestützt, mit denen in den Arbeiten von Brejc [128] et al. und Palm et al. [183] die A- und B-Zustände des Chromophors diskutiert werden. Aufbauend auf diese Arbeiten lassen wir in unserem kleinen Satz nur Wasserstoffbrücken zu, die dort beschrieben werden. Dabei haben wir nur solche Wasserstoffatome zugelassen, die einen Wasserstoffbrückenwinkel nahe bei 180° mit dem Akzeptor bilden (vgl. Abschnitt 4.3.2). Die Wasserstoffatome, die wir dabei verwenden, sind in Tabelle 5.9 mit ihren Partnern für Wasserstoffbrücken angegeben. Bei der Benennung der Atome haben wir uns weitgehend an die CHARMM-Nomenklatur⁷ gehalten. In dieser Tabelle haben wir auch die Distanz $d(h,A)$ zwischen den einzelnen Wasserstoffatomen $h1 \dots hN$ und den zugehörigen Akzeptoratomaten angegeben.

Diese Struktur ist in Abbildung 5.8, mit allen möglichen Positionen für die Wasserstoffatome, dargestellt. Anhand dieser Skizze können wir uns die unterschiedlichen Wasserstoffbrückennetze veranschaulichen. Desweiteren sind dort die Namen der einzelnen Atome eingetragen. Für dieses System existieren nur 172800 KP-Zustände. Somit sind wir in der Lage dessen Zustandssumme exakt zu berechnen und können sicher sein, daß die Ergebnisse keine Artefakte enthalten, wie sie etwa durch schlechte Konvergenz von Monte-Carlo-Verfahren entstehen.

⁷Wir geben zuerst den Code für ein Residuum, dann dessen Nummer und anschließend den Atomnamen an. Um Verwechslungen mit Mutationen zu vermeiden, haben wir Atomnamen, die nur aus einem Buchstaben bestehen klein geschrieben und bezeichnen Wassermoleküle mit 'w'.

| D | A | h | $d(h,A)$ | D | A | h | $d(h,A)$ |
|---------|---------|-----|----------|--------|---------|----|----------|
| Y66OH | T203OGb | h1 | 2.01 | w12OH2 | G67N3 | h1 | 2.60 |
| | w22OH2 | h2 | 1.62 | | S65OG | h2 | 1.71 |
| T203OGa | w19OH2 | ah1 | 2.50 | | V68o | h3 | 2.47 |
| | S202o | ah2 | 2.97 | | w27OH2 | h4 | 2.07 |
| | L201o | ah3 | 2.95 | w19OH2 | w27OH2 | h1 | 1.64 |
| T203OGb | Y66OH | bh1 | 1.80 | | T203OGb | h2 | 2.93 |
| | H148o | bh2 | 1.90 | | T203OGa | h3 | 2.45 |
| | w22OH2 | bh3 | 2.47 | w22OH2 | Y66OH | h1 | 1.60 |
| S205OG | E222OE2 | h1 | 1.65 | | S205OG | h2 | 1.64 |
| | w22OH2 | h2 | 1.78 | | N146o | h3 | 2.20 |
| E222OE1 | S65OG | h1 | 2.13 | | T203o | h4 | 2.02 |
| | w27OH2 | h2 | 2.56 | | T203OGb | h5 | 2.42 |
| E222OE2 | S205OG | h3 | 1.64 | w27OH2 | w12OH2 | h1 | 2.07 |
| | E222OE1 | h4 | 2.32 | | E222OE1 | h2 | 2.40 |
| S65OG | E222OE1 | h1 | 2.11 | | w19OH2 | h3 | 1.64 |
| | w12o | h2 | 1.75 | | | | |

Tabelle 5.9: Ausgewählte Gruppen in der Umgebung des HBI und die zugehörigen polaren Sauerstoffatome (Bezeichnung 'OH2' für den Sauerstoff von Wassermolekülen). Hier sind die Donoratome (D) der Gruppen, sowie die möglichen Akzeptoratome (A) benachbarter Gruppen, die Bezeichnung der jeweiligen Wasserstoffatome (h) und der Abstand von Wasserstoff- zum Akzeptoratom ($d(h,A)$) angegeben.

5.5.1 Abhängigkeit von Ladungsparametern

Beginnen wir nun unsere Untersuchungen an dem eben erzeugten kleinen Satz von Strukturen, der als Untermenge in dem in Abschnitt 5.3 erzeugten großen Satz enthalten ist. Wie weiter oben beschrieben, haben wir alle Wechselwirkungen unter Verwendung von CHARMM-Parametern modelliert. Nun waren es im wesentlichen praktische Gründe, wie etwa die Schnittstelle zu MD-Programmen und die gute Verfügbarkeit dieser Daten, die uns zu dieser Entscheidung bewogen haben. Wie in Abschnitt 4.1.2 diskutiert, sind diese Parameter für MD-Simulationen optimiert und es ist nicht a priori klar, ob sie auch für Statikrechnungen und zur Bestimmung von Solvatisierungsenergien gut geeignet sind. Die Parse-Parameter hingegen wurden gezielt für die Berechnung letztgenannter Energien entwickelt.

Um einen Eindruck von dem Einfluß der Ladungsparameter auf die Berechnung von Protonierungszuständen zu erhalten, werden wir im folgenden die Wechselwirkungen im kleinen Satz soweit möglich auch mit Parse-Parametern bestimmen und die Zustandssummen für die beiden Parametersätze auswerten. Die Parse-Parameter enthalten keine Partiaalladung für Wassermoleküle, daher verwenden

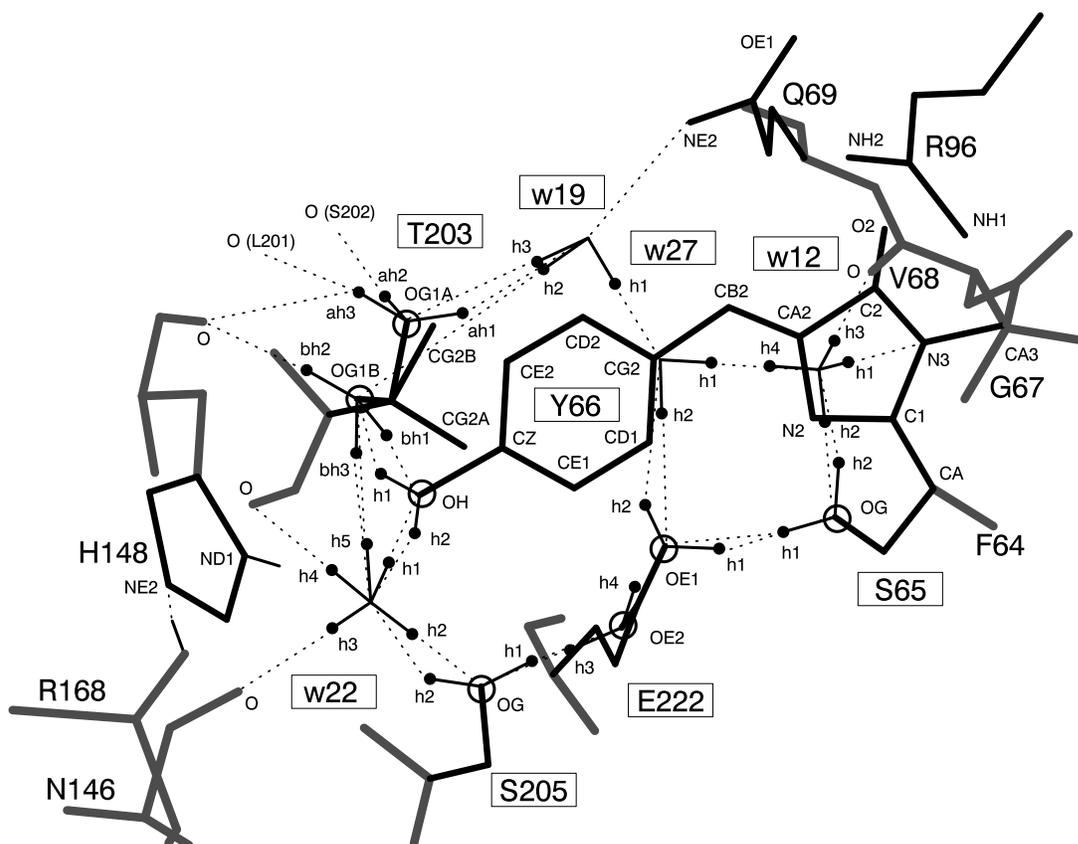


Abbildung 5.8: Skizze der Proteinstruktur in unmittelbarer Nähe des HBI. Hier haben wir alle, in Tabelle 5.9 definierten, Wasserstoffatome dargestellt und benannt. Die möglichen Wasserstoffbrücken sind durch gestrichelte Linien angedeutet.

wir auch hier die Daten des TIP3-Wassermodells. Auch für den Chromophor übernehmen wir den gleichen Satz von Partialladungen, wie wir ihn für die Rechnungen mit dem CHARMM-Kraftfeld parametrisiert haben. Bei den Berechnungen der Parse-Wechselwirkungen zwischen den Residuen und den Atomen des fixen Sets haben wir, wie schon bei den CHARMM-Energien, die Wechselwirkung der Residuen mit den eigenen Backbone-Atomen null gesetzt. Für die Definition der Moleküloberfläche verwenden wir in beiden Fällen die VAN-DER-WAALS-Parameter aus dem CHARMM-Parametersatz. Da wir uns in diesem Abschnitt primär mit elektrostatischen Effekten auseinandersetzen wollen, haben wir, für die Rechnungen mit dem kleinen Satz, die VAN-DER-WAALS-Wechselwirkungen der Residuen im flexiblen Set untereinander nicht berücksichtigt ($W_{ij}^{\text{vdw}} = 0$). Wir haben lediglich die VAN-DER-WAALS-Wechselwirkungen mit dem fixen Set berücksichtigt. Daher erhalten wir bei den berechneten pK_a -Werten Abweichungen von den später berechneten Werten am großen Satz. In Abschnitt 5.6 werden wir alle Wechselwirkungen berücksichtigen.

Neben den Wechselwirkungen der Atome untereinander müssen wir auch die Änderung der Solvatisierungsenergie ΔE^{solv} zur Korrektur des Modell- pK_a 's berechnen. Die Ergebnisse dieser Rechnung für die einzelnen Residuen sind in Tabelle 5.10 zusammengefaßt. Die daraus hervorgehenden Unterschiede zwischen den verschiedenen Parametersätzen resultieren aus den unterschiedlichen Dipolmomenten der Residuen, die durch die verschiedene Verteilung der Partialladungen entstehen.

Aufgrund der unterschiedlichen Verteilungen von Partialladungen bei Parse- und CHARMM-Parametern besitzen die Residuen im flexiblen Set unterschiedliche Wechselwirkungen mit dem fixen Set. Tabelle 5.10 faßt die Wechselwirkungen der einzelnen Residuen in ihren unterschiedlichen KP-Zuständen mit dem fixen Set des Proteins für beide Parametersätze zusammen.

Natürlich unterscheiden sich für verschiedene Ladungsparameter auch die Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Residuen des flexiblen Sets untereinander. Allerdings trägt es nicht weiter zum Verständnis bei, die Unterschiede aller 123 Wechselwirkungen⁸ aufzulisten. Später werden wir gezielt einige Werte herausgreifen, die für die Diskussion der Ergebnisse wichtig sind.

Die Ergebnisse für den kleinen Satz erhalten wir mit der ProTikKS-Methode durch die Berechnung der \mathcal{M} -Teilchen-Zustandssummen, mit $\mathcal{M} \in \{0, 1, 2\}$, nach Gl. 3.23. Wobei wir die Energien der KP-Zustände mit den jeweiligen Wechselwirkungen aus Gleichung 3.22 bestimmen und die Summe über alle möglichen Konformationszustände des Systems laufen lassen. Anschließend berechnen wir mit dem in den Abschnitten 3.2.4 und 3.2.5 beschriebenen Verfahren, die Protonierungswahrscheinlichkeiten der beiden Residuen, sowie die Wahrscheinlichkeiten für das Auftreten einzelner KP-Zustände in unserem Modellsystem.

Teilbild A) in Abbildung 5.9 zeigt, für die Rechnungen mit beiden Parametersätzen, die pH-abhängigen Besetzungen der deprotonierten Gruppen E222 und Y66. Wir finden hier in beiden Fällen ein ausgeprägtes Plateau in den Titrationskurven. Der HBI zeigt ein anormales Titrationsverhalten, wie wir es aufgrund der gemessenen Kurve (vgl. Abbildung 5.5 in Abschnitt 5.1.3) erwartet haben. Ein Unterschied zwischen den Ergebnissen der beiden Rechnungen ist die Höhe dieses Plateaus. Es scheint hier, als würden E222 und Y66 ihre Rollen vertauschen, wenn wir zwischen den Parametersätzen wechseln.

Aus den Betrachtungen in Abschnitt 3.3 wissen wir bereits, daß in einem solchen System zweier wechselwirkender protonierbarer Residuen die Titrationskurven durch die bedingten, mikroskopischen pK_a -Werte $\text{pK}_i(\text{M}_i|\text{M}_j)$ und $\text{pK}_i(\text{M}_i|\text{M}_j\text{H})$ beschrieben werden. Die Form der in Abbildung 5.9 Teilbild A) dargestellten

⁸Die Wechselwirkungen der Wassermoleküle untereinander verändern sich nicht, da in beiden Fällen die gleichen Ladungen verwendet wurden.

| KP-Zustand | $E^{\text{fix}}[\text{k}_B\text{T}]$ | | $\Delta E^{\text{solv}}[\text{k}_B\text{T}]$ | | $E^{\text{vdw}}[\text{k}_B\text{T}]$ | $E^{\text{tors}}[\text{k}_B\text{T}]$ |
|------------|--------------------------------------|---------|--|---------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|
| | Parse | CHARMm | Parse | CHARMm | | |
| Y66h1 | -4.537 | -5.593 | 7.833 [†] | 7.833 [†] | -0.354 | 2.438 |
| Y66h2 | -4.922 | -5.733 | 7.771 [†] | 7.771 [†] | 2.890 | 1.941 |
| Y66 | -16.779 | -24.312 | 30.862 [†] | 30.862 [†] | 0.000 | 0.000 |
| S65h1 | -0.342 | -0.315 | 3.639 | 2.987 | -0.428 | 2.155 |
| S65h2 | 2.308 | 1.101 | 3.543 | 3.027 | 0.475 | 2.155 |
| S205h1 | 0.155 | -0.333 | 3.718 | 3.060 | 2.030 | 2.045 |
| S205h2 | 0.362 | 0.034 | 3.642 | 3.072 | 0.297 | 0.037 |
| T203ah1 | 1.320 | 0.455 | 3.608 | 2.986 | -0.300 | 1.644 |
| T203ah2 | -0.690 | -0.183 | 3.614 | 3.056 | -0.370 | 1.871 |
| T203ah3 | -0.855 | -1.185 | 3.394 | 2.879 | -0.363 | 0.548 |
| T203bh1 | 0.555 | 1.162 | 3.562 | 2.845 | 0.006 | 4.147 |
| T203bh2 | -1.929 | -2.595 | 3.151 | 2.723 | -0.236 | 4.548 |
| T203bh3 | 0.064 | 1.086 | 3.400 | 4.943 | -0.519 | 5.096 |
| E222 | -8.877 | -10.511 | 29.100 | 26.982 | 0.000 | 0.000 |
| E222h1 | 0.234 | -0.309 | 5.873 | 4.178 | -0.347 | 4.254 |
| E222h2 | 0.416 | -0.382 | 4.877 | 3.540 | -0.292 | 1.439 |
| E222h3 | -1.142 | -1.150 | 6.130 | 2.867 | 2.167 | 4.983 |
| E222h4 | -0.381 | -0.530 | 4.436 | 2.079 | -0.335 | 0.000 |
| w12h1h2 | 1.349 | 1.847 | 6.585 [†] | 6.585 [†] | -0.194 | 0.000 |
| w12h2h5 | -4.577 | -2.552 | 6.205 [†] | 6.205 [†] | 0.275 | 0.000 |
| w12h2h3 | -2.522 | -2.061 | 4.286 [†] | 4.286 [†] | 0.064 | 0.000 |
| w12h1h5 | 1.579 | 2.075 | 6.098 [†] | 6.098 [†] | -1.489 | 0.000 |
| w12h3h5 | -2.291 | -1.833 | 4.704 [†] | 4.704 [†] | -1.231 | 0.000 |
| w12h1h3 | 3.635 | 2.566 | 4.797 [†] | 4.797 [†] | -1.700 | 0.000 |
| w19h1h3 | -5.061 | -3.468 | 6.105 [†] | 6.105 [†] | 1.771 | 0.000 |
| w19h1h2 | -4.832 | -3.185 | 6.528 [†] | 6.528 [†] | 1.733 | 0.000 |
| w22h1h2 | 1.213 | 1.998 | 5.082 [†] | 5.082 [†] | 6.945 | 0.000 |
| w22h1h3 | -1.006 | -2.242 | 6.368 [†] | 6.368 [†] | 4.167 | 0.000 |
| w22h1h4 | -0.729 | -0.905 | 6.095 [†] | 6.095 [†] | 4.067 | 0.000 |
| w22h3h5 | -1.498 | -2.046 | 5.132 [†] | 5.132 [†] | -1.309 | 0.000 |
| w22h2h4 | -0.666 | 0.315 | 4.509 [†] | 4.509 [†] | 1.464 | 0.000 |
| w22h2h3 | -0.944 | -1.022 | 4.909 [†] | 4.909 [†] | 1.567 | 0.000 |
| w22h3h4 | -2.885 | -3.925 | 6.116 [†] | 6.116 [†] | -1.311 | 0.000 |
| w22h2h5 | 0.721 | 2.194 | 4.615 [†] | 4.615 [†] | 1.466 | 0.000 |
| w27h2h3 | 1.605 | 1.907 | 5.052 [†] | 5.052 [†] | 1.532 | 0.000 |
| w27h1h4 | -0.590 | -1.186 | 7.088 [†] | 7.088 [†] | -0.892 | 0.000 |
| w27h2h6 | 0.602 | 0.880 | 3.822 [†] | 3.822 [†] | 1.672 | 0.000 |
| w27h2h4 | -0.128 | 0.065 | 3.789 [†] | 3.789 [†] | 1.765 | 0.000 |
| w27h1h2 | 1.585 | 1.158 | 4.302 [†] | 4.302 [†] | 1.755 | 0.000 |

Tabelle 5.10: „Selbstenergien“ der einzelnen Residuen in den unterschiedlichen KP-Zuständen. Die Wechselwirkung E^{fix} mit dem fixen Set und der Unterschied ΔE^{solv} in den Solvatisierungsenergien sind für Parse- und CHARMm-Parameter angegeben. VAN-DER-WAALS- und Torsionsenergien (E^{vdw} bzw. E^{tors}) sind für die Rechnungen mit beiden Parametersätzen gleich, ebenso wie die mit [†] gekennzeichneten Solvatisierungsenergien.

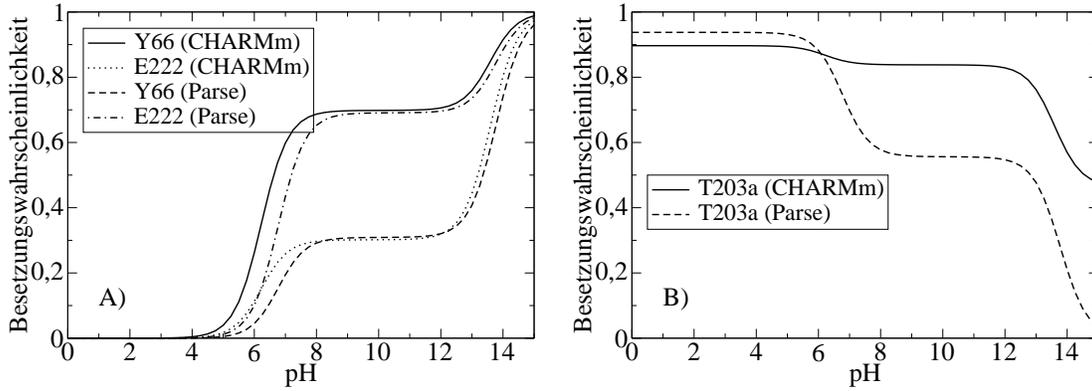


Abbildung 5.9: pH-abhängige Besetzungen von deprotoniertem E222 und Y66 (Teilbild A)), und der a-Konformation des T203 (Teilbild B)). Die Diagramme zeigen jeweils die Ergebnisse von Rechnungen mit CHARMm- und Parse-Parametern.

Kurven ist dabei, nach Gl. 3.50, durch

$$\mathfrak{P}(M_i; \text{pH}) = \frac{1 + 10^{\text{pK}_j(M_j|M_i) - \text{pH}}}{1 + 10^{\text{pK}_j(M_j|M_i) - \text{pH}} + 10^{\text{pK}_i(M_i|M_j) - \text{pH}} + 10^{\text{pK}_j(M_j|M_i) + \text{pK}_i(M_i|M_j\text{H}) - 2\text{pH}}} \quad (5.27)$$

gegeben. Die Höhe des Plateaus ist nach Gleichung 3.59 durch den Unterschied zwischen den intrinsischen pK_a -Werten der beiden Residuen bestimmt. Da wir hier nur zwei protonierbare Residuen betrachten, können wir die mikroskopischen pK_a -Werte mittels

$$\text{pK}_a(M_i|M_j) = \frac{1}{\ln 10} \frac{2\mathfrak{Z}_0(M_i \wedge M_j) - \mathfrak{Z}_0(M_j)}{\mathfrak{Z}_1(M_j)} \quad \text{und} \\ \text{pK}_a(M_i|M_j\text{H}) = \frac{1}{\ln 10} \frac{2\mathfrak{Z}_1(M_i \wedge M_j\text{H}) - \mathfrak{Z}_1(M_j\text{H})}{\mathfrak{Z}_2(M_j\text{H})} \quad (5.28)$$

direkt aus den \mathcal{M} -Teilchen-Zustandssummen $\mathfrak{Z}_{\mathcal{M}}$ berechnen. Die zu den Kurven in Abbildung 5.9, Teilbild A) gehörigen Werte sind in Tabelle 5.11 zusammengefasst. Der intrinsische pK_a für E222 liegt mit CHARMm-Parametern um 0.17 pK-Einheiten höher als der mit Parse-Parametern berechnete Wert. Bei Y66 schieben die CHARMm-Ladungen den Wert um 0.54 Einheiten unter den Parse-Wert. Die Verwendung unterschiedlicher Ladungsparameter führt in unserem Fall zu einer Unsicherheit von etwa 0.5 pK-Einheiten bei der Bestimmung des intrinsischen pK-Wertes der beiden Residuen.

Allerdings zeigt ein Blick auf Teilbild B) in Abbildung 5.9, daß die veränderten Wechselwirkungen auch die Besetzung von Konformationszuständen beeinflussen. Dort ist für beide Parametersätze die Wahrscheinlichkeit aufgetragen, das Residuum T203 in der a-Konformation anzutreffen. Bei den Rechnungen mit dem Parse-Ladungsmodell nimmt diese Wahrscheinlichkeit mit steigendem pH-Wert

| | pK_a (E222 Y66) | pK_a (E222 Y66h) | pK_a (Y66 E222) | pK_a (Y66 E222h) |
|----------------|----------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|
| T203a,b Parse | 13.26 | 6.93 | 13.61 | 7.28 |
| T203a,b CHARMM | 13.43 | 6.74 | 13.07 | 6.38 |
| T203b Parse | 13.25 | 6.41 | 12.93 | 6.09 |
| T203b CHARMM | 13.05 | 7.33 | 11.76 | 6.04 |
| T203a Parse | 14.41 | 7.00 | 16.19 | 8.78 |
| T203a CHARMM | 13.66 | 6.70 | 13.39 | 6.43 |
| S65T Parse | 15.97 | 9.52 | 13.37 | 6.92 |
| S65T CHARMM | 16.24 | 9.40 | 12.82 | 5.98 |

Tabelle 5.11: Durch exaktes Auswerten der Zustandssumme berechnete mikroskopische pK_a -Werte für Y66 und E222. Hier haben wir die Ergebnisse für unterschiedliche Parametersätze und zugängliche Konformationsräume zusammengefaßt. T203a,b: vollständiger kleiner Satz; T203b: T203 in b-Konformation fixiert; T203a: T203 in a-Konformation fixiert; S65T: nur h2 Konformation für S65.

in dem Bereich zwischen $pH=5$ bis $pH=9$ um etwa 40% ab und verschwindet bei großen Werten ($pH > 14$) nahezu gänzlich. Die Rechnungen mit CHARMM-Ladungen zeigen aber erst bei Werten für $pH > 12$ eine nennenswerte Abnahme. Im physiologisch interessanten pH -Bereich bleibt die Wahrscheinlichkeit T203 in der a-Konfiguration zu finden fast konstant bei etwa 87% .

Neben den, in Tabelle 5.10 gezeigten, Unterschieden in den Solvatisierungsenergien der einzelnen Residuen und deren Wechselwirkungen mit dem fixen Set tragen auch die Unterschiede in deren Paarwechselwirkungen zu den verschiedenen pH -Abhängigkeiten der Konzentrationen von KP-Zustände bei. Allerdings ist es i. allg. nicht möglich, die Einflüsse der einzelnen Wechselwirkungen auf das Verhalten des Systems isoliert voneinander zu betrachten und einzelne Terme gezielt dafür verantwortlich zu machen.

Die gegenseitige Abhängigkeit von K- und P-Zuständen wird an den Diagrammen in Abbildung 5.10 deutlich. Dort sind die pH -abhängigen Konzentrationen der einzelnen KP-Zustände für die Rechnungen mit beiden Parametersätzen aufgetragen. Bei Residuen, die in mehr als drei KP-Zuständen vorkommen können, haben wir uns zur besseren Übersicht auf die am stärksten populierte Varianten beschränkt. Die beiden Wassermoleküle w12 und w27 besetzen dabei in jedem Fall mit mehr als 99.8% die K-Zuständen w12h2h3 bzw. w27h1h2 über den gesamten pH -Bereich.

Diese Wassermoleküle bilden mit den Residuen S65 und E222 ein Wasserstoffbrückennetz, wobei S65h1 und w27h2 eine Brücke zu E222OE1 etablieren und letzteres daher nur an OE2 protoniert. Für die Konzentrationen der übrigen KP-Zustände sehen wir aber teilweise große Variationen mit dem pH -Wert. Die Ände-

| | T203 | W22 | Y66 | S205 | E222 | $E^{\text{kp}}[\text{k}_B\text{T}]$ | |
|---|------|------|-----|------|------|-------------------------------------|--------|
| | | | | | | Parse | CHARMm |
| ① | bh1 | h1h2 | — | h1 | — | 39.41 | 37.91 |
| ② | ah3 | h1h2 | — | h1 | — | 45.69 | 38.13 |
| ③ | ah3 | h2h4 | h2 | h1 | — | 8.66 | 8.40 |
| ④ | ah3 | h1h3 | — | h2 | h4 | 12.99 | 6.40 |
| ⑤ | bh1 | h1h3 | — | h2 | h4 | 9.22 | 7.81 |
| ⑥ | ah3 | h1h3 | — | h2 | h3 | 16.25 | 10.57 |
| ⑦ | ah3 | h1h3 | — | h1 | h3 | 47.29 | 27.22 |
| ⑧ | ah3 | h3h5 | h1 | h2 | h4 | -7.53 | -7.53 |
| ⑨ | ah3 | h3h4 | h2 | h2 | h4 | -7.32 | -8.27 |

Tabelle 5.12: KP-Zustände ausgewählter Residuen. Wir geben nur die Orientierung der polaren Gruppen an. Die angegebenen Energien E^{kp} (Gl. 3.22) dieser Zustände gehören jeweils zu den energetisch niedrigsten Zuständen, in denen die Kombinationen der angegebenen KP-Zustände auftreten. Im Text beziehen wir uns anhand der eingekreisten Nummern auf die einzelnen Zustände.

rungen für die K-Zustände der unprotonierbaren Gruppen sind dabei dort am stärksten wo auch die Steigungen der Titrationskurven für die protonierbaren Residuen am steilsten ist. Aufgrund dieses anschaulichen Zusammenhanges können wir bei einer Änderung des Protonierungszustandes ebenfalls Veränderungen in den Konformationen anderer Residuen erwarten.

Um diese Situation näher zu beschreiben, haben wir die Orientierungen der Gruppen, die sich hier wesentlich an den Konformationsänderungen beteiligen, für einige Zustände mit den zugehörigen Konformationsenergien in Tabelle 5.12 zusammengefaßt. Betrachten wir hier zunächst nur die Zustände mit der niedrigsten Konformationsenergie des jeweiligen Protonierungszustandes. Diese unterscheiden sich in beiden Fällen auch in der Konformation mindestens einer weiteren Gruppe. Daher müssen wir, wenn wir die Energieunterschiede zwischen einzelnen KP-Zuständen untersuchen wollen, die Energetik des gesamten Systems betrachten.

Zunächst bemerken wir, daß der niederenergetischste K-Zustand ① des total deprotonierten Systems für beide Parametersätze gleich ist. Die beiden Ergebnisse unterscheiden sich hier aber bereits deutlich in der Energie des ersten K-Zustandes, bei dem T203 in a-Konfiguration vorliegt (②). Zwischen diesem Zustand und dem niedrigsten liegen bei der Rechnung mit CHARMm-Ladungen nur zwei weitere Zustände. In den Parse-Ergebnissen befinden sich hingegen 34 K-Zustände, bei denen T203 in b-Konfiguration vorliegt, dazwischen. Da wir zur Diskussion solcher Unterschiede die Differenzen der Energien unterschiedlicher Konformationen betrachten müssen, sind in Tabelle 5.13 die paarweisen Wechsel-

wirkungsenergien einzelner Gruppen für zwei verschiedene Konformationen nebeneinander, sowie die Energiedifferenz zwischen diesen aufgelistet. Hier finden wir bereits in der ersten Zeile die Antwort für diesen Unterschied. Wechselt T203 von der a- in die b-Konformation, so ist damit im Parse-Ladungsmodell, durch die Wechselwirkung mit dem HBI, ein Energiegewinn von $11.7 k_B T$ verbunden. Die CHARMM-Ladungen ergeben hier nur $6.5 k_B T$. Aus Tabelle 5.10 sehen wir, daß für diese Konformationsänderung mit CHARMM-Parametern $0.9 k_B T$ mehr für die Änderung der Wechselwirkung mit dem fixen Set benötigt werden als bei den mit Parse-Ladungen berechneten Werten.

Bei den Zuständen, in denen das Protein einfach protoniert ist (③–⑦), liegt bei den Parse-Ladungen derjenige mit protoniertem HBI (③) günstigster als der mit protoniertem E222 (⑤). Gerade umgekehrt verhält es sich mit den Ergebnissen des CHARMM-Ladungsmodells. Da sich T203a im zweiten Fall nicht umorientiert, wäre der Zustand ④ hier um $10 k_B T$ ungünstiger als der Zustand ③ im Vergleich zu den Parse-Ergebnissen. Allerdings ist der Energiegewinn durch die Deprotonierung des HBI, aufgrund dessen Wechselwirkung mit dem fixen Set, bei CHARMM um fast $7 k_B T$ höher als bei Parse. Außerdem führt die Umorientierung des T203 aufgrund der damit verbundenen Torsionsenergie zu einem Verlust von $3.6 k_B T$, der bei den CHARMM-Werten nicht kompensiert werden muß. Damit haben wir die Wechselwirkungen genannt, welche den größten Einfluß auf die Energien der eben diskutierten KP-Zustände haben. Die gesamte Differenz wird letztendlich durch die Beiträge aller anderen Wechselwirkungen und Selbstenergien bestimmt und es wäre wenig instruktiv, alle einzeln aufzulisten und im Detail zu diskutieren.

Wir wollen nun versuchen, zu verstehen, ob wir diese Unterschiede in den Ergebnissen auf Eigenheiten der Parameter zurückführen können. Aus den unterschiedlichen Wechselwirkungen des T203 in den verschiedenen Konformationen können wir vermuten, daß die Stärke von Wasserstoffbrücken bei den CHARMM-Ladungen niedriger ausfällt als bei den Parse-Ladungen. Um dieser Idee weiter nachzugehen, betrachten wir die Wasserstoffbrücke zwischen S205 und E222. Dazu untersuchen wir die Energiedifferenzen für die Zustände ⑥ und ⑦. Dabei ist der Zustand ⑥, allein aufgrund der paarweisen Wechselwirkungen, bei Parse um $27.4 k_B T$, bei CHARMM aber nur um $13.3 k_B T$ günstiger als die Konformation ⑦. Ein Beitrag rührt hier von der Wechselwirkung zwischen S205 und E222. Die zugehörige Energieänderung beträgt bei Parse ganze $-20.6 k_B T$, bei CHARMM nur $-7.8 k_B T$. Hier haben wir die Situation, daß die energetisch ungünstige Wechselwirkung S205h1 mit E222h3 bei CHARMM um $11 k_B T$ niedriger liegt als bei den Parse-Daten. Die günstigere Situation S205h2 mit E222h3 wird von CHARMM $1.7 k_B T$ ungünstiger bewertet als von Parse. Diese Abhängigkeit von den Ladungsparametern finden wir auch bei den Wechselwirkungen zwischen S205h1 mit E222h3 und S205h1 mit E222h4, sowie für die Wasserstoffbrücken zwischen T203bh1 mit Y66h1 und T203bh1 mit Y66h2.

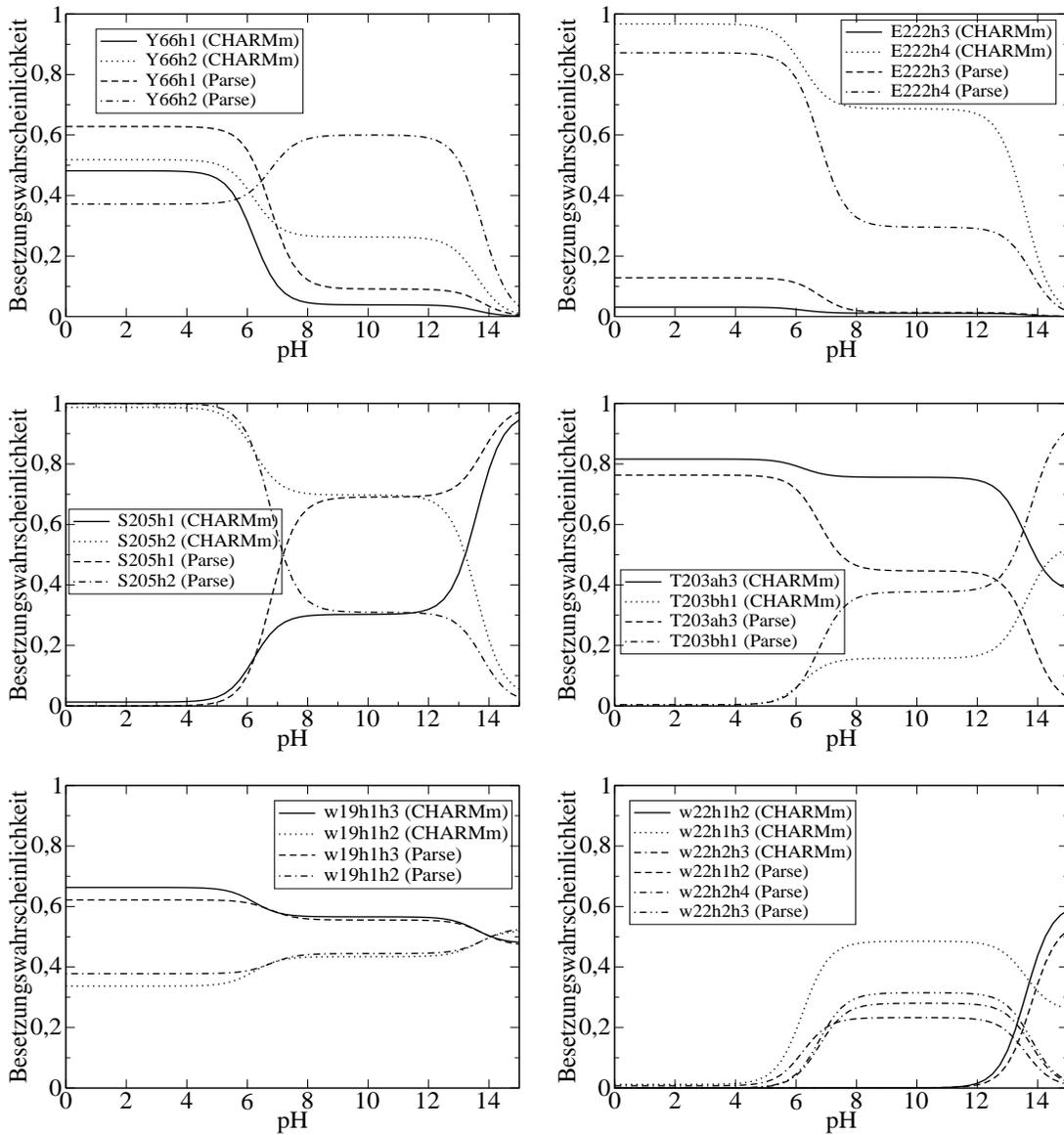


Abbildung 5.10: pH-abhängige Besetzung der einzelnen KP-Zustände. Für T203 und w22 wurden jeweils nur die am stärksten populierte Zustände aufgetragen.

| Konformation 1 | | $W^{\text{el}}[\text{k}_B\text{T}]$ | | Konformation 2 | | $W^{\text{el}}[\text{k}_B\text{T}]$ | | $\Delta W^{\text{el}}[\text{k}_B\text{T}]$ | |
|----------------|---------|-------------------------------------|--------|----------------|---------|-------------------------------------|--------|--|--------|
| | | Parse | CHARMm | | | Parse | CHARMm | Parse | CHARMm |
| T203ah3 | Y66 | 1.62 | 0.47 | T203bh1 | Y66 | -10.10 | -5.99 | -11.72 | -6.46 |
| T203ah3 | S65h1 | -0.08 | 0.00 | T203bh1 | S65h1 | 0.05 | 0.05 | 0.13 | 0.04 |
| T203ah3 | S205h2 | 0.02 | 0.05 | T203bh1 | S205h2 | 0.19 | -0.14 | 0.17 | -0.19 |
| T203ah3 | E222h4 | 0.00 | 0.04 | T203bh1 | E222h4 | 0.19 | 0.00 | 0.20 | -0.04 |
| T203ah3 | w12h2h3 | 0.06 | 0.08 | T203bh1 | w12h2h3 | -0.01 | -0.02 | -0.07 | -0.10 |
| T203ah3 | w19h1h3 | -1.21 | -1.54 | T203bh1 | w19h1h3 | -0.08 | 0.22 | 1.13 | 1.76 |
| T203ah3 | w22h1h3 | 0.06 | -0.20 | T203bh1 | w22h1h3 | 1.27 | 0.60 | 1.22 | 0.80 |
| T203ah3 | w27h1h2 | 0.43 | 0.60 | T203bh1 | w27h1h2 | 0.05 | -0.07 | -0.38 | -0.67 |
| T203ah3 | S205h1 | -0.09 | -0.10 | T203bh1 | S205h1 | 0.04 | -0.11 | 0.13 | -0.01 |
| T203ah3 | E222 | 1.39 | 0.00 | T203bh1 | E222 | -1.14 | -1.45 | -2.53 | -1.45 |
| T203ah3 | w19h1h2 | -1.20 | -1.35 | T203bh1 | w19h1h2 | 0.02 | 0.23 | 1.22 | 1.58 |
| T203ah3 | w22h1h2 | -0.12 | -0.18 | T203bh1 | w22h1h2 | 1.27 | 0.93 | 1.39 | 1.11 |
| T203ah2 | Y66 | 2.19 | 0.93 | T203ah2 | Y66h1 | -0.14 | -0.21 | -2.33 | -1.14 |
| T203ah3 | Y66 | 1.62 | 0.47 | T203ah3 | Y66h1 | 0.04 | -0.06 | -1.58 | -0.53 |
| T203bh1 | Y66 | -10.10 | -5.99 | T203bh1 | Y66h1 | 1.41 | 0.50 | 11.51 | 6.49 |
| T203bh2 | Y66 | 4.30 | 5.76 | T203bh2 | Y66h1 | -0.33 | -0.92 | -4.63 | -6.68 |
| T203bh1 | Y66 | -10.10 | -5.99 | T203bh1 | Y66h2 | -1.37 | -0.70 | 8.73 | 5.29 |
| T203bh2 | Y66 | 4.30 | 5.76 | T203bh2 | Y66h2 | 0.25 | 0.62 | -4.05 | -5.14 |
| S205h1 | E222h3 | 16.41 | 5.45 | S205h2 | E222h3 | -4.16 | -2.39 | 20.57 | 7.83 |
| S205h1 | E222h3 | 16.41 | 5.45 | S205h1 | E222h4 | -1.36 | -1.79 | -17.77 | 7.24 |
| Y66h1 | T203bh1 | 1.40 | 0.50 | Y66h2 | T203bh1 | -1.37 | -0.70 | 2.77 | 1.20 |
| w22-h1h3 | S205h2 | -3.92 | -2.13 | w22-h1h3 | S205h1 | 1.35 | 2.17 | 5.27 | 4.3 |
| S65h1 | E222 | -6.80 | -4.01 | S65h2 | E222 | 1.93 | 2.83 | 8.73 | 12.74 |
| S65h1 | E222 | -6.80 | -4.01 | S65h1 | E222h4 | -1.99 | -0.60 | 4.81 | 3.41 |
| S65h2 | E222 | 1.93 | 2.83 | S65h2 | E222h4 | 0.26 | 0.36 | -1.67 | -2.47 |
| S65h1 | E222h4 | -1.99 | -0.60 | S65h1 | E222h1 | 7.50 | 2.77 | 9.49 | 10.09 |
| S65h2 | E222h4 | 0.26 | 0.36 | S65h2 | E222h1 | -1.89 | -1.73 | -2.15 | -2.09 |

Tabelle 5.13: Wechselwirkungsenergien einiger Residuen in unterschiedlichen KP-Zuständen. Die Energien sind für die Rechnungen mit Parse- und CHARMm-Ladungen angegeben. Die Energiedifferenz ΔW^{el} gibt jeweils die Differenzen zwischen der Konformation 2 und Konformation 1 in einer Zeile an.

5.5.2 Konformationen und Protonierungen

Im letzten Abschnitt haben wir von der Wahl der Ladungsparameter abhängige Zusammenhänge zwischen den Protonierungszuständen und Konformationen des Proteins gesehen. Im folgenden wollen wir untersuchen, wie durch die Vorgabe des zugänglichen Konformationsraumes, die Titrationskurven der protonierbaren Residuen beeinflusst werden können. Auch hier werden wir Rechnungen mit beiden Ladungsmodellen vorstellen.

Verschiedene Konformationsräume für T203

Bei den Rechnungen mit dem kleinen Satz hatte das T203 die Möglichkeit zwei verschiedene Konformationen einzunehmen. Zumindest bei den Rechnungen mit Parse-Ladungen konnten wir einen Zusammenhang zwischen der Besetzung dieser Konformationen und dem Protonierungszustand des HBI feststellen. Daher wollen wir nun der Frage nachgehen, wie sich die Besetzung dieses P-Zustandes ändert, wenn wir den Konformationsraum des T203 auf eine einzige Orientierung beschränken.

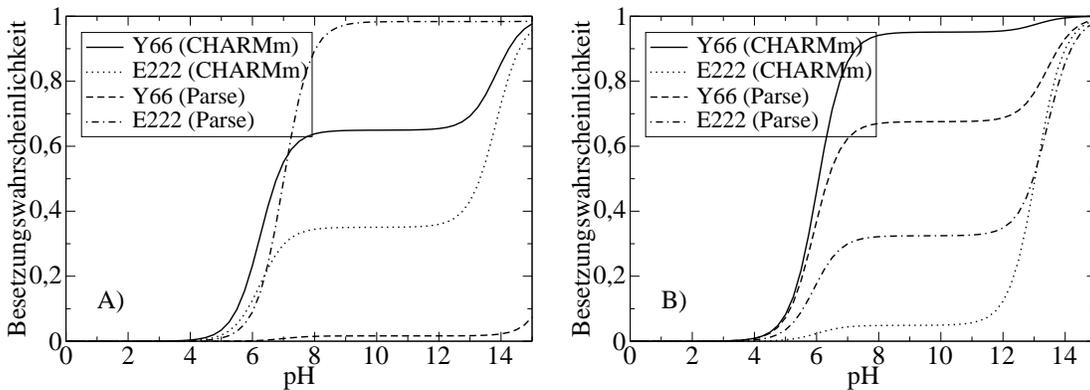


Abbildung 5.11: Besetzungswahrscheinlichkeiten für die deprotonierten Formen E222 und Y66 bei eingeschränktem Konformationsraum von T203. Teilbild A): T203 in a-Konformation fixiert; Teilbild B): T203 in b-Konformation fixiert.

In Abbildung 5.11 sind die Populationen von E222 und Y66 für Rechnungen mit unterschiedlichen Konformationsräumen von T203 und Parametersätzen dargestellt. Teilbild A) zeigt die Titrationskurven für den Fall, daß sich T203 nur in der a-Konformation befinden kann. In Teilbild B) sind die Resultate für das System dargestellt, in dem T203 nur die b-Position einnehmen kann. In beiden Fällen können jeweils alle drei möglichen Konfigurationen für die Wasserstoffatome besetzt werden. Auch hier erkennen wir wieder deutliche Unterschiede zwischen den Ergebnissen aus Rechnungen mit den verschiedenen Ladungsparametern. Am auffälligsten ist das Verhalten der Plateauhöhen. Unter Verwendung

der CHARMM-Ladungen liegt das Plateau von Y66 beide Male höher als das von E222. Die Rechnungen mit Parse-Parametern ergeben allerdings Unterschiede in der gegenseitigen Lage der beiden Titrationskurven für die beiden Fälle.

Ein Blick auf die in Tabelle 5.11 aufgelisteten bedingten pK_a -Werte für die verschiedenen Rechnungen ermöglicht eine quantitative Beschreibung der Situationen. Der intrinsische pK_a für den Chromophor wird bei den Rechnungen mit Parse-Parametern um mehr als drei pK -Einheiten verschoben, wenn wir den Konformationsraum von T203 unterschiedlich einschränken. Der entsprechende Wert für E222 ändert sich nur um 1.16 pK -Einheiten. Daher beträgt die Differenz der intrinsischen pK_a -Werte 1.78 pK -Einheiten. Damit haben wir die Erklärung dafür, daß das Plateau beinahe nicht mehr zu erkennen ist (vgl. Gl. 3.59 in Abschnitt 3.3).

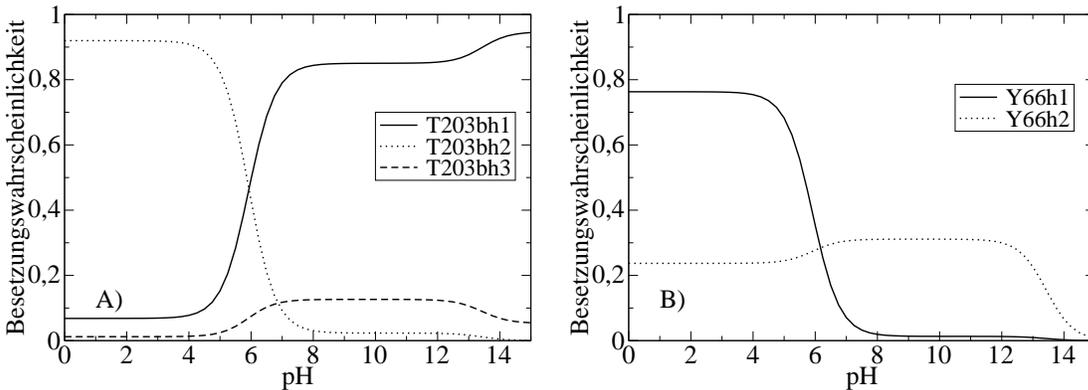


Abbildung 5.12: Teilbild A) zeigt die pH-abhängigen Besetzungen für die polaren Wasserstoffatome von T203, wenn dieses in b-Konformation fixiert ist; In Teilbild B) sind die Besetzungen der polaren Wasserstoffatome von Y66h dargestellt.

Wir wollen im folgenden nur für die beeindruckend große Abhängigkeit des intrinsischen pK_a -Wertes des Chromophors von den Orientierungsmöglichkeiten des T203 eine mikroskopische Erklärung geben. Dabei werden wir uns auf die Resultate beschränken, die mit Parse-Parametern berechnet wurden. In Abbildung 5.12 Teilbild A) sind die Besetzungswahrscheinlichkeiten der einzelnen Konformationen des polaren Wasserstoffatoms am T203 in der b-Konformation dargestellt. Die pH-abhängigen Orientierungen des Wasserstoffes am Y66 sind in Teilbild B) aufgetragen. Bei hohen pH-Werten ist zu einem großen Teil T203bh1 populiert, welches die günstige Wechselwirkung von $-10.10 k_B T$ mit dem deprotonierten Chromophor hat. Die günstigste Wechselwirkung zwischen T203 und dem protonierten HBI bildet, wie wir Tabelle 5.13 entnehmen, die Konfiguration T203bh2 mit Y66h1. Daher wird bei abnehmendem pH-Wert zunächst Y66h2 besetzt. Allerdings muß auch dafür eine Energie von $8.73 k_B T$ aufgewendet werden.

Wenn wir T203 in der a-Konfiguration fixieren, muß bei der Protonierung des HBI im ungünstigsten Fall nur eine Energie von $0.58 k_B T$ geleistet werden, um

die Änderung dessen Wechselwirkung mit T203ah1 zu kompensieren. Tatsächlich ist in diesem Fall im gesamten pH-Bereich die Konformation T203ah3 mit etwa 80% besetzt. In dieser führt die Änderung der Wechselwirkung mit dem HBI bei dessen Protonierung sogar zu einem Energiegewinn von mehr als zwei $k_B T$. Damit ist die Protonierung des Chromophors in dieser Situation energetisch um mehr als zehn $k_B T$ günstiger im Vergleich zur Fixierung von T203 in der b-Konformation.

Somit kann diese Verschiebung des pK_a -Wertes auf die Wechselwirkung zwischen dem Chromophor und T203 zurückgeführt werden. Zur Interpretation der gesamten pH-abhängigen Konzentrationen sind auch hier wieder die Wechselwirkungen und Orientierungsänderungen aller anderen Gruppen zu berücksichtigen. Der geringe Einfluß des T203 Konformationsraumes auf die Rechnungen mit CHARMM-Parametern läßt sich durch die, weiter oben diskutierten, geringeren Differenzen in den Wechselwirkungsenergien erklären.

Simulation einer hypothetischen Mutante

In dem kleinen Satz von Konformationen, den wir anfangs eingeführt haben, waren für das Wasserstoffatom am S65 zwei mögliche Konformationen vorgesehen. Die Rechnungen in diesem Raum möglicher KP-Zustände für das GFP haben aber gezeigt, daß im gesamten pH-Bereich mit mehr als 99.99% die Konformation S65h1 populiert. In dieser Position bildet es eine Wasserstoffbrücke mit E222. Diese ist im wtGFP möglich, in der S65T Mutante bildet sich eine Wasserstoffbrücke zwischen dem Hydroxyl dieses Residuums und dem Carbonyl-Sauerstoff von V61 oberhalb der Chromophor-Ebene [173]. Aus dieser Konformationsänderung resultiert eine Bevorzugung des anionischen Chromophors.

Wir wollen die S65T Mutante simulieren, indem wir das Wasserstoffatom von S65 in der Position h2 fixieren. Obwohl wir damit S65 die Möglichkeit einer Wasserstoffbrücke zum E222 nehmen, handelt es sich nicht wirklich um das Modell dieser speziellen Mutante. Wir wollen dieses System daher im weiteren als „hypothetische Mutante“ bezeichnen.

Die, aus diesen Rechnungen ermittelten, intrinsischen pK_a -Werte sind ebenfalls in Tabelle 5.11 notiert. Bei beiden Parametersätzen verschiebt sich, im Vergleich zu den Rechnungen mit S65h1, der Wert für E222 um fast drei pK -Einheiten zu höherem pK_a . Der Wert für den Chromophor wird hingegen nur wenig niedriger. Daher erwarten wir hier in beiden Fällen ein Verschwinden des Plateaus. Beide Parametersätze liefern für die Konzentrationen fast aller KP-Zustände ein ähnliches Verhalten. Lediglich die Änderungen in der Population der Konformationen von T203 mit dem pH-Wert wirken sich bei den CHARMM-Ladungen nicht so stark aus wie bei den Rechnungen mit Parse-Parametern. Dieser Effekt läßt sich aber wie bei den Rechnungen mit dem gesamten kleinen Satz erklären. Wir wollen uns daher auf die Diskussion der mit dem Parse-Ladungsmodell erzielten

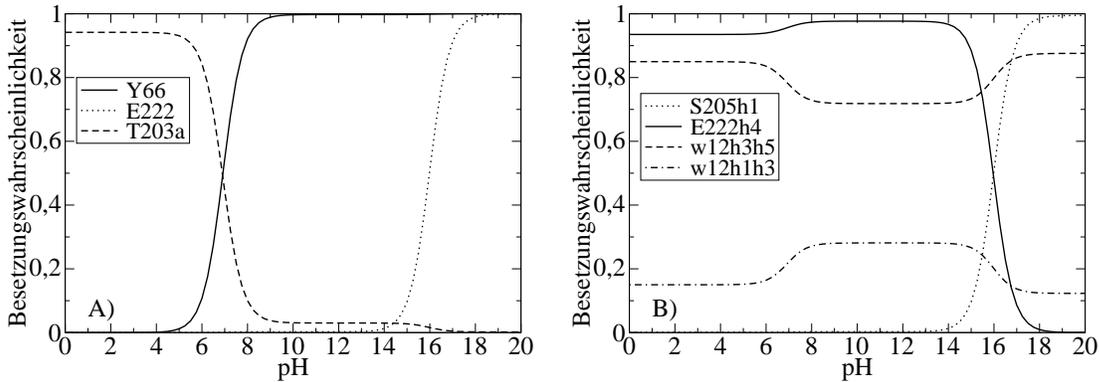


Abbildung 5.13: Beide Diagramme zeigen pH-abhängige Besetzungswahrscheinlichkeiten einzelner KP-Zustände bei der Simulation der hypothetischen S65T Mutante.

Ergebnisse beschränken.

Die Titrationskurven sind, wie auch die Besetzung von T203a in Abbildung 5.13 Teilbild A) dargestellt. Durch das Unterbinden einer Wasserstoffbrücke zwischen E222 und S65 wird die Protonierung des Glutamats deutlich begünstigt und damit die anionische Form des HBI stabilisiert. Diese Verschiebung des Säure-Base-Gleichgewichtes zwischen den beiden Gruppen, sowie die damit einhergehende Veränderung in der Population der T203a-Konformation ist konsistent mit der Röntgenstruktur von S65T [52, 173].

In Teilbild B) der Abbildung 5.13 sind die pH-abhängigen Konzentrationen der Konformationen des polaren Wasserstoffatoms am E222 und am S205, sowie die der Orientierung des Wassers w12 aufgetragen. Interessant ist hier zu bemerken, daß das E222, obwohl es keine Wasserstoffbrücke mehr mit S65 macht, nicht am Sauerstoff OE1, sondern weiterhin hauptsächlich mit E222h4 an OE2 protoniert. Die Wechselwirkung zwischen S65h2 und E222h1 wäre zwar um mehr als zwei $k_B T$ günstiger, als die mit E222h4. Aufgrund der ungünstigeren Wechselwirkungen mit dem fixen Set und der höheren Solvatisierungsenergie, vor allem aber wegen der hohen Torsionsenergie von E222h1, wird diese Konformation nicht besetzt (vgl. Tabelle 5.10).

In diesem Diagramm erkennen wir auch, daß das Wasser w12, welches vorher als Donor einer Wasserstoffbrücke zu S65 diente und damit fest in einem Wasserstoffbrückennetz eingebunden war, sich nun ebenfalls umorientiert und Konformationen senkrecht zur Ebene des HET einnimmt. Aus dem Verhalten der Konzentration von S205h1 können wir schließen, daß sich das polare Wasserstoffatom an dieser Gruppe korreliert mit der Protonierung des E222 umorientiert.

5.6 Untersuchung des Systems mit vielen KP-Zuständen

Die Rechnungen am kleinen Satz haben gezeigt, daß die Ergebnisse von Protonierungsrechnungen einerseits von der Wahl der Modellparameter und andererseits von den möglichen Konformationen des Systems abhängen. Um die Kopplung zwischen Protonierungs- und Konformationsänderungen möglichst gut beschreiben zu können, wollen wir den Residuen in unserem Proteinmodell einen möglichst großen Konformationsraum zur Verfügung stellen. Aus diesem Grund haben wir, wie in Abschnitt 5.3 beschrieben, für das GFP die große Ausgangsmenge mit 10^{35} möglichen Konformationszuständen erzeugt. Davon ausgehend wollen wir nun die Titrationskurven der protonierbaren Residuen sowie die Besetzungswahrscheinlichkeiten von Konformationszuständen ermitteln.

5.6.1 Einfache MC-Simulationen

Bei der Berechnung von Protonierungsgleichgewichten hat sich bisher die Verwendung von Monte-Carlo-Methoden durchgesetzt, um Systeme mit vielen möglichen Zuständen zu untersuchen [21, 39, 72]. Daher werden auch wir zunächst das von uns generierte System mit einer einfachen MC-Methode analysieren (vgl. Abschnitt 4.3.3).

Wir verwenden hierzu das MC-Programm von Beroza [72], welches wir wie folgt modifiziert haben. Wir haben Gleichung 5.26 als Energiefunktion für einen KP-Zustand eingeführt und nur ein Konformer für jedes Residuum zu jedem Zeitschritt erlaubt. Außerdem sampeln wir mit dem MC-Programm sowohl Protonierungs- als auch Konformationszustände. Hierbei haben wir die gleichzeitige Änderung des KP-Zustandes zweier Residuen unterbunden.

Mit dem so angepaßten Programm sind wir in der Lage, den Protonierungsgrad eines Residuums für einen vorgegebenen pH-Wert als Mittelwert über alle akzeptierten Konfigurationen zu berechnen. Da wir bei einer zufälligen Startkonfiguration beginnen, die energetisch beliebig hoch liegen kann, werden wir das System äquilibrieren [155] und erst danach mit der Mittelung beginnen.

Bevor wir Ergebnisse für den großen Satz erzeugen, wollen wir die Methode erst einmal an dem kleinen Satz mit Parse-Ladungen ausprobieren. Diese Resultate können wir unmittelbar mit den exakt berechneten Werten aus Abschnitt 5.5.1 vergleichen. Dafür ermitteln wir die pH-abhängigen Konzentrationen der Protonierungszustände von Chromophor und E222. Da bei einer solchen MC-Simulation ein großkanonisches Ensemble bei vorgegebenem pH-Wert ausgewertet wird, führen wir diese Rechnungen für 31 äquidistante pH-Werte im Intervall $\text{pH} = [0, 15]$ durch. Um die Qualität der erhaltenen Mittelwerte zu verbessern

und einen Eindruck von der Genauigkeit der Methode zu gewinnen, berechnen wir diese pH-abhängigen Besetzungen nicht nur ein- sondern zehnmal. Der Übersichtlichkeit halber haben wir nur die Ergebnisse von fünf dieser Rechnungen in Abbildung 5.14 dargestellt.

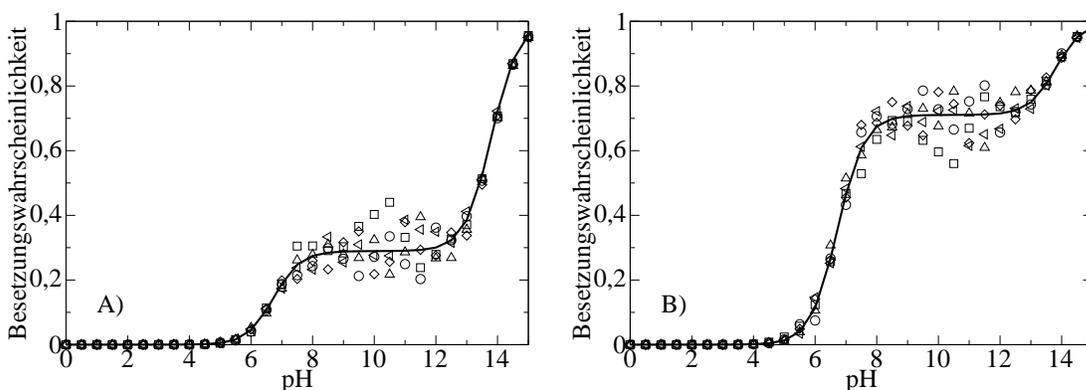


Abbildung 5.14: Ergebnisse von fünf MC-Simulationen am kleinen Satz. Die Besetzungen aus den verschiedenen Rechnungen sind mit unterschiedlichen Symbolen gekennzeichnet. Teilbild A) zeigt die Populationen des Y66, Teilbild B) die des E222. Die durchgezogenen Linien zeigen die, mit den Parametern für den kleinen Satz, aus Tabelle 5.14, an das Modell Gl. 5.27 gefitteten Titrationskurven.

Für jede der vorgenommenen MC-Simulationen haben wir bei einem neuen, zufällig generierten Startzustand beginnend 1000 Äquilibrierungsschritte unternommen und anschließend $5 \cdot 10^6$ Auswerteschritte laufen lassen. Bei all diesen Rechnungen hatten wir nur eine Akzeptanzrate von etwa 14%. Dieser ungünstige Wert läßt sich durch starke Korrelationen zwischen den KP-Zuständen einzelner Gruppen erklären. Wie wir im vorangegangenen Abschnitt gesehen haben, zieht beispielsweise die Protonierung des E222 die Umorientierung von S205 und w22 nach sich. Dies führt zu einer starken Zerklüftung der Energielandschaft und somit zu der niedrigen Akzeptanzrate für MC-Schritte.

Dennoch erkennen wir in Abbildung 5.14 die Titrationskurven aus Abbildung 5.9 Teilbild A) wieder, auch wenn die Übereinstimmung der einzelnen Ergebnisse in der Nähe der Plateaus schlechter wird. Um auch quantitative Aussagen machen zu können, haben wir jede der zehn berechneten pH abhängigen Besetzungen mit Hilfe eines numerischen Fit-Verfahrens [198] an das Modell aus Gleichung 5.27 angepaßt und daraus die mikroskopischen pK_a -Werte, welche die Form dieser Kurve bestimmen, ermittelt. In Tabelle 5.14 haben wir die Mittelwerte dieser Gleichgewichtskonstanten, sowie die zugehörigen Standardabweichungen angegeben. Ein Vergleich mit den in Tabelle 5.11 angegebenen exakten Werten zeigt, daß die MC-Simulationen innerhalb der Standardabweichungen die gleichen Ergebnisse

| | kleiner Satz | großer Satz |
|--|------------------|------------------|
| $\text{pK}_a(\text{E222} \text{Y66})$ | 13.27 ± 0.09 | 11.42 ± 0.14 |
| $\text{pK}_a(\text{E222} \text{Y66h})$ | 6.87 ± 0.06 | 4.64 ± 0.04 |
| $\text{pK}_a(\text{Y66} \text{E222})$ | 13.66 ± 0.09 | 10.90 ± 0.13 |
| $\text{pK}_a(\text{Y66} \text{E222h})$ | 7.28 ± 0.06 | 4.64 ± 0.04 |

Tabelle 5.14: Mit der einfachen MC-Simulation berechnete mikroskopische pK_a -Werte von Y66 und E222. Wir geben die, aus zehn Simulationen, gemittelten Werte und Standardabweichungen für Rechnungen am kleinen und am großen Satz an. Die deutlichen Unterschiede in den Ergebnissen liegen an den unterschiedlichen VAN-DER-WAALS-Wechselwirkungen (vgl. Abschnitt 5.5.1).

liefern.

Nach diesen guten Resultaten für den kleinen Satz, werden wir mit dieser MC-Methode auch die Protonierungsgrade der beiden Residuen im großen Satz bestimmen. Auch hier haben wir Simulationen mit 1000 Äquilibrierungsschritten und $5 \cdot 10^6$ Mittelungsschritten durchgeführt. Die Ergebnisse von fünf der zehn durchgeführten Titrationsrechnungen haben wir in Abbildung 5.15 dargestellt. Wiederum wurden die pH-abhängigen Konzentrationen von E222 und Y66 für jede der durchgeführten Rechnungen an das Modell Gl. 5.27 gefittet und so die bedingten pK_a -Werte bestimmt. Aus diesen Werten haben wir die in Tabelle 5.14 zusammengefaßten Mittelwerte und Standardabweichungen ermittelt. Die durchgezogenen Linien in Abbildung 5.15 zeigen die mit Gleichung 5.27, unter Verwendung der gemittelten pK_a -Werte berechneten Titrationskurven der beiden Residuen.

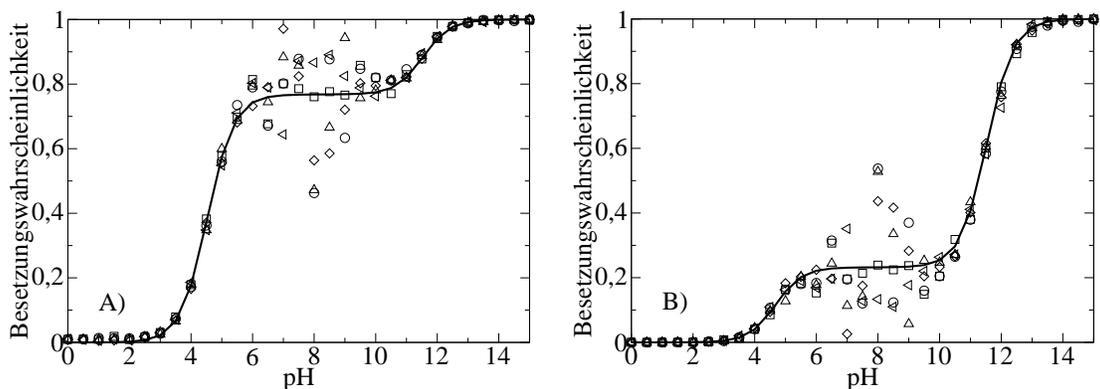


Abbildung 5.15: Ergebnisse von fünf MC-Simulationen für den großen Satz. Die Besetzungen aus den verschiedenen Rechnungen sind mit unterschiedlichen Symbolen gekennzeichnet. Teilbild A) zeigt die Populationen des Y66, Teilbild B) die des E222. Die durchgezogenen Linien zeigen die, mit den Parametern für den großen Satz, aus Tabelle 5.14, an das Modell Gl. 5.27 gefitteten Titrationskurven.

| n_{\min} | 5 | 10 | 50 | 100 | 200 | 300 | 10000 |
|--|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| $\text{pK}_a(\text{E222} \text{Y66})$ | 12.660 | 13.251 | 13.237 | 13.258 | 13.262 | 13.263 | 13.263 |
| $\text{pK}_a(\text{E222} \text{Y66h})$ | 7.010 | 7.119 | 6.946 | 6.932 | 6.929 | 6.929 | 6.929 |
| $\text{pK}_a(\text{Y66} \text{E222})$ | 13.431 | 13.337 | 13.591 | 13.608 | 13.611 | 13.612 | 13.612 |
| $\text{pK}_a(\text{Y66} \text{E222h})$ | 7.782 | 7.204 | 7.300 | 7.282 | 7.279 | 7.278 | 7.278 |

Tabelle 5.15: Die aus den n_{\min} energetisch niedrigsten KP-Zuständen bestimmten mikroskopischen pK_a -Werte für Y66 und E222.

Bei diesen MC-Simulationen haben wir Akzeptanzraten von weniger als 10% erzielt. Das ist eine Erklärung für die großen Schwankungen der berechneten Konzentrationen, die in Abbildung 5.15 besonders im Bereich der Plateaus zu erkennen sind. Um die Qualität dieser Ergebnisse zu verbessern, könnten wir die Anzahl der MC-Schritte erhöhen oder das einfache MC-Verfahren methodisch verändern und es so besser an unser spezielles Problem anpassen. Das wäre beispielsweise durch die Verwendung von „nicht-BOLTZMANN-Verfahren“ [156] oder durch die Bevorzugung energetisch günstiger KP-Zustände einzelner Residuen beim Würfeln der neuen Konformation [213] (sog. „conformational biasing“) möglich. Aber da wir in unserem System ungleich mehr Konformations- als Protonierungszustände haben, werden wir versuchen die niederenergetischen \mathcal{M} -Teilchen-Zustände des Systems mit der in Abschnitt 4.3.4 beschriebenen Methode zu ermitteln und damit die \mathcal{M} -Teilchen-Zustandssummen zu nähern.

5.6.2 Bestimmung der \mathcal{M} -Teilchen-Zustandssummen

Die Möglichkeit, aus diesen einmal ermittelten Energien und Konformationen jede beliebige statistische Größe des Systems berechnen zu können, ist ein enormer Vorteil dieser Vorgehensweise. Durch MC-Simulationen gewonnene Werte müssen immer während der Simulation ermittelt werden. Außerdem erhalten wir so die günstigen Konformationen des Systems und können daraus die zu einzelnen P-Zuständen gehörenden Gleichgewichtskonfigurationen bestimmen.

Um einen ersten Eindruck von dieser Methode zu bekommen, untersuchen wir auch hier wieder den vollständigen kleinen Satz in der Parse-Parametrisierung. Hier bestimmen wir für die null- bis zwei-Teilchen-Zustandssummen die 10^4 niedrigsten Energiezustände. Aus diesen Zustandssummen berechnen wir nach Gl. 5.28 die mikroskopischen pK_a -Werte für E222 und Y66. Dabei verwenden wir nur die n_{\min} niedrigsten Energiezustände aus den jeweiligen \mathcal{M} -Teilchenzustände. In Tabelle 5.15 sind die berechneten pK_a -Werte in Abhängigkeit von der Zahl der verwendeten Zustände angegeben.

Wir erhalten hier also bereits mit nur den 300 energetisch günstigsten Werten

Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus der exakt berechneten Zustandssumme (vgl. Tabelle 5.11). Dieses erfreuliche Ergebnis läßt sich leider nicht verallgemeinern, sondern hängt mit der speziellen Verteilung der Konformationsenergien in dem kleinen Satz zusammen. Die Energien der günstigsten Zustände liegen nämlich in allen \mathcal{M} -Teilchen-Ensembles so weit auseinander, daß bereits nach 300 Zuständen eine Differenz von mindestens $10 k_B T$ zur Energie des niedrigsten Zustandes besteht.

Bei dem großen Satz liegen die Konformationsenergien sehr viel dichter. So haben wir bei verschiedenen Rechnungen in den null- bis zehn-Teilchen-Zuständen bis zu $2 \cdot 10^5$ Zustände innerhalb der niedrigsten $3 k_B T$ der Konformationsenergien gefunden. Bei einem Lauf unseres Programmes zeichnen wir die $4 \cdot 10^4$ Zustände mit den niedrigsten Energien auf. Die Energien dieser Zustände erstrecken sich über mindestens $6 k_B T$. Daraus können wir schließen, daß unser Algorithmus trotz mehrfachen Aufheizens (auf fünffache Raumtemperatur) und anschließenden Abkühlens nicht alle niederenergetischen Zustände findet. Tatsächlich liefern verschiedene Programmläufe, ausgehend von unterschiedlichen Startstrukturen, auch verschiedene niederenergetische Zustände. Wir könnten nun die Zustände aus den unterschiedlichen Programmläufen zusammenfassen und unsere Zustandssummen beispielsweise mit den niedrigsten $2 \cdot 10^5$ Zuständen nähern. Aber das wäre unwirtschaftlich und wir wüßten trotzdem nie, ob wir auch genug Zustände gefunden haben.

In Abbildung 5.16 haben wir für fünf der zehn durchgeführten Läufe unseres Programmes die aus den niedrigsten gefundenen Zuständen berechneten Titrationskurven für den HBI und E222 dargestellt. Um diese Kurven zu berechnen, haben wir für jeden der \mathcal{M} -Teilchen-Zustände ($\mathcal{M} = 0 \dots 10$) nur die niedrigsten $2 \cdot 10^4$ gefundenen Zustände zur Berechnung der \mathcal{M} -Teilchen-Zustandssummen verwendet. Die pH-abhängigen Kurven wurden dann wie in Abschnitt 3.2.4 beschrieben bestimmt.

Wir erkennen in diesen Diagrammen, daß sich die einzelnen Kurven wiederum im wesentlichen in den Höhen der Plateaus unterscheiden, davon abgesehen aber, wie bei den vorher durchgeführten MC-Simulationen, gut übereinstimmen. Für alle zehn Simulationen bestimmen wir die bedingten pK_a -Werte der beiden Gruppen. Ähnlich wie in Abschnitt 5.6.1 mitteln wir diese Werte und geben sie zusammen mit den Standardabweichungen in Tabelle 5.16 an. Die durchgezogenen Linien in den Graphen aus Abbildung 5.16 ergeben sich aus Gleichung 5.27 mit den gemittelten mikroskopischen pK_a -Werten.

Hierbei wird ein weiterer Vorteil der ProTikKS-Methode deutlich. Während wir die Ergebnisse der einfachen MC-Methode an das Modell mit drei Parametern anpassen mußten, um deren Werte als Resultat einer Fit-Routine zu erhalten, können wir diese bei der ProTikKS-Methode nachträglich direkt bestimmen. Hierzu berechnen wir aus den gefundenen \mathcal{M} -Teilchen-Zuständen die pH-abhängigen

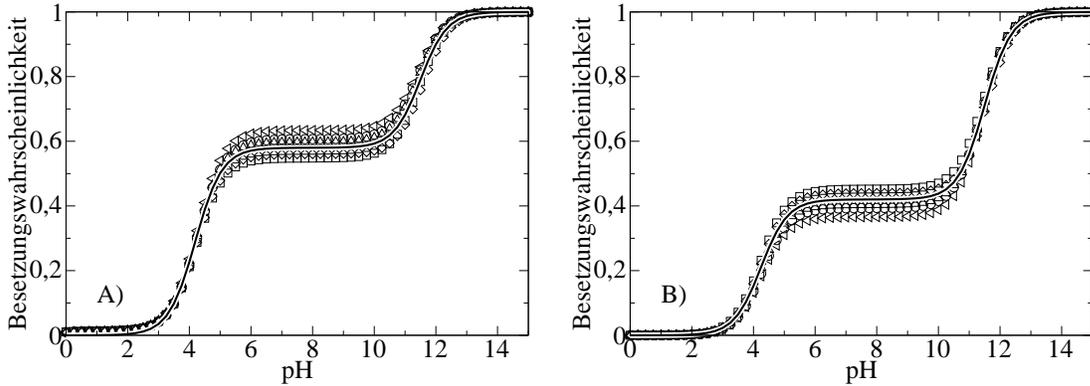


Abbildung 5.16: Mit der ProTikKS-Methode berechnete Besetzungswahrscheinlichkeiten für die deprotonierten Zustände von Y66 (Teilbild A)) und E222 (Teilbild B)). Die Ergebnisse von fünf Rechnungen sind mit verschiedenen Symbolen dargestellt. Die durchgezogenen Linien sind mit den Parametern aus Tabelle 5.16 und Gl. 5.27 berechnet.

| | voll | rsa | min |
|--|------------------|------------------|------------------|
| $\text{pK}_a(\text{E222} \text{Y66})$ | 11.26 ± 0.09 | 11.25 ± 0.07 | 11.24 ± 0.00 |
| $\text{pK}_a(\text{E222} \text{Y66h})$ | 4.62 ± 0.05 | 4.64 ± 0.06 | 5.47 ± 0.02 |
| $\text{pK}_a(\text{Y66} \text{E222})$ | 11.12 ± 0.08 | 11.15 ± 0.05 | 10.27 ± 0.02 |
| $\text{pK}_a(\text{Y66} \text{E222h})$ | 4.43 ± 0.03 | 4.53 ± 0.06 | 4.50 ± 0.00 |

Tabelle 5.16: Mit der ProTikKS-Methode berechnete mikroskopische pK_a -Werte für E222 und Y66. Wir geben hier die Ergebnisse für die Rechnungen mit dem großen Satz (voll), der *reduced-site-approximation* (rsa) und einem minimalen Satz (min) an (vgl. Tabelle 5.5). Dabei wurden jeweils die Ergebnisse von zehn Rechnungen gemittelt.

bedingten Wahrscheinlichkeiten $\mathfrak{P}(M_i|M_j; \text{pH})$ und $\mathfrak{P}(M_i|M_j\text{H}; \text{pH})$ für die Deprotonierung der Gruppe i , wenn die Gruppe j deprotoniert bzw. protoniert ist. Aus diesen Kurven lassen sich die bedingten pK_a -Werte direkt ausrechnen. Wenn sich wirklich nur die Titrationskurven zweier Residuen beeinflussen, gilt⁹ für diese Werte

$$\begin{aligned} \text{pH} + \log(\mathfrak{P}^{-1}(M_i | M_j; \text{pH}) - 1) &= \text{const} = \text{pK}(M_i|M_j) \quad \text{bzw.} \\ \text{pH} + \log(\mathfrak{P}^{-1}(M_i | M_j\text{H}; \text{pH}) - 1) &= \text{const} = \text{pK}(M_i|M_j\text{H}). \end{aligned} \quad (5.29)$$

Die mit der ProTikKS-Methode bestimmten pK_a -Werte der Residuen stimmen innerhalb der Fehlergrenzen mit den Werten aus der einfachen MC-Rechnung überein. Wir schließen daraus, daß unsere Methode für ein System mit so vielen

⁹Diese Gleichung kann am besten im Bereich der näheren Umgebung des Wendepunktes der Kurve ausgewertet werden, da es sonst leicht zu numerischen Problemen kommt.

K-Zuständen bei jedem Programmlauf, ebenso wie das einfache MC-Verfahren, einen Unterraum des Konfigurationsraumes abtastet. Da wir uns hierbei auf energetisch niedrige Zustände beschränken, gehen wir davon aus, daß dieser charakteristisch für das System ist. Diese Annahme wird dadurch bestärkt, daß die Titrationskurven der einzelnen Programmläufe so ähnlich sind und die mikroskopischen pK_a -Werte der Gruppen mit einer Standardabweichung von maximal 0.09 bestimmt werden konnten.

Genauigkeit der Rechnungen

Bisher haben wir nur die Titrationskurven zweier Residuen verglichen, um zu untersuchen, wie gut die Ergebnisse der einzelnen Rechnungen übereinstimmen. In dem großen Satz haben wir aber 382 unterschiedliche KP-Zustände der Residuen (vgl. Tabelle 5.5), deren Kombinationen pH-abhängig populiert werden können. Da wir Vergleiche zwischen den einzelnen Rechnungen nicht für all diese KP-Zustände so durchführen können und wollen, suchen wir ein Maß, mit dem wir die Vergleiche automatisch ausführen können.

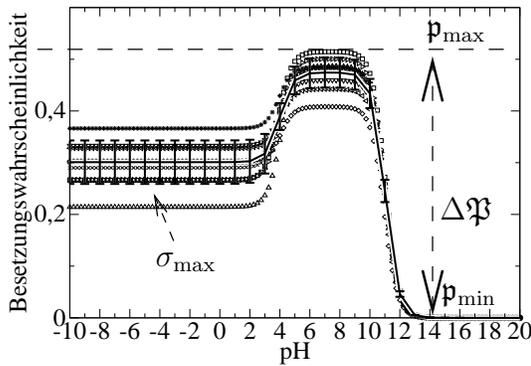


Abbildung 5.17: Graphische Definition der maximalen Varianz σ_{\max} der Ergebnisse. Die Resultate von zehn Rechnungen sind mit Symbolen dargestellt, die durchgezogene Linie gibt deren Mittelwert und die Balken geben die Standardabweichung für jeden pH-Wert an. Die maximale (p_{\max}) und minimale (p_{\min}) Wahrscheinlichkeit, diesen KP-Zustand eines Residuums zu finden sind ebenso angegeben wie die Breite dieses Bereiches $\Delta\mathfrak{P}$.

In Abbildung 5.17 haben wir die aus allen zehn Rechnungen ermittelten pH-abhängigen Konzentrationen für einen KP-Zustand von E222 dargestellt. Wir bilden für diskrete pH-Werte den Mittelwert der verschiedenen Konzentrationen über n Programmläufe

$$\langle \mathfrak{P}(\text{pH}) \rangle = \sum_{i=1}^n \mathfrak{P}_i(\text{pH})/n$$

und die Standardabweichung

$$\sigma = \sqrt{\sum_{i=1}^n (\mathfrak{P}_i(\text{pH}) - \langle \mathfrak{P}(\text{pH}) \rangle)^2 / (n(n-1))}.$$

Nun gibt es mindestens einen pH-Wert, an dem die Standardabweichung maximal ist. Hier tritt in unseren Rechnungen also die größte Unsicherheit auf. Daher geben wir diese maximale Standardabweichung als Unsicherheit für die pH-abhängige Konzentration dieses KP-Zustandes an. In Tabelle 5.17 haben wir für die KP-Zustände der Residuen, die wir bereits in Abschnitt 5.5.1 näher diskutiert haben, die in Abbildung 5.17 definierten Größen angegeben. Analysieren wir alle KP-Zustände auf diese Weise, stellen wir fest, daß die maximale Standardabweichung für einen KP-Zustand von E222 mit $\sigma_{\max} = 0.04$ am größten ist. Wir gehen somit von einer Unsicherheit von 4% bei der Bestimmung der Besetzungswahrscheinlichkeit aus.

| s | σ_{\max} | p_{\min} | p_{\max} | $\Delta\mathfrak{P}$ | s | σ_{\max} | p_{\min} | p_{\max} | $\Delta\mathfrak{P}$ |
|------|-----------------|------------|------------|----------------------|------|-----------------|------------|------------|----------------------|
| S205 | | | | | E222 | | | | |
| — | 0.025 | 0.00 | 0.13 | 0.13 | 0 | 0.034 | 0.00 | 0.84 | 0.84 |
| — | 0.040 | 0.01 | 0.39 | 0.38 | 1 | 0.042 | 0.00 | 0.51 | 0.51 |
| — | 0.041 | 0.14 | 0.67 | 0.54 | 0 | 0.029 | 0.00 | 0.24 | 0.24 |
| — | 0.008 | 0.00 | 0.06 | 0.06 | 1 | 0.042 | 0.00 | 0.78 | 0.78 |
| — | 0.015 | 0.00 | 0.11 | 0.11 | Y66 | | | | |
| — | 0.008 | 0.00 | 0.06 | 0.06 | 0 | 0.039 | 0.00 | 1.00 | 1.00 |
| — | 0.030 | 0.00 | 0.62 | 0.62 | 1 | 0.039 | 0.00 | 0.73 | 0.73 |
| — | 0.004 | 0.00 | 0.02 | 0.02 | 1 | 0.010 | 0.00 | 0.16 | 0.16 |
| — | 0.033 | 0.00 | 0.43 | 0.43 | 1 | 0.006 | 0.00 | 0.15 | 0.15 |
| — | 0.010 | 0.00 | 0.11 | 0.11 | w22 | | | | |
| T203 | | | | | — | 0.039 | 0.00 | 0.63 | 0.63 |
| — | 0.035 | 0.00 | 0.51 | 0.51 | — | 0.033 | 0.00 | 0.99 | 0.99 |
| — | 0.034 | 0.49 | 1.00 | 0.51 | — | 0.038 | 0.00 | 1.00 | 0.99 |

Tabelle 5.17: Berechnete Werte der in Abbildung 5.17 definierten Verteilungsparameter für einige Residuen. Es sind nur KP-Zustände angeführt, die mit mehr als $5 \cdot 10^{-4}\%$ in den Rechnungen am großen Satz aufgetreten sind. Die erste Spalte gibt den P-Zustand s der Gruppen an, sofern diese deprotonieren können.

Populierte KP-Zustände

Das Balkendiagramm in Abbildung 5.18 zeigt einen Vergleich zwischen der Zahl der angebotenen KP-Zustände für die einzelnen Gruppen und der Zahl an Zuständen, die bei den Rechnungen mit einer Wahrscheinlichkeit von mehr als $5 \cdot 10^{-4}\%$ besetzt wurden.

In Tabelle 5.5 haben wir die Zahl der zur Verfügung gestellten Zustände für die einzelnen Residuen zusammengefaßt. In der letzten Spalte steht dort die Zahl der Zustände, die mit mehr als $5 \cdot 10^{-4}\%$ besetzt waren. Wir haben noch

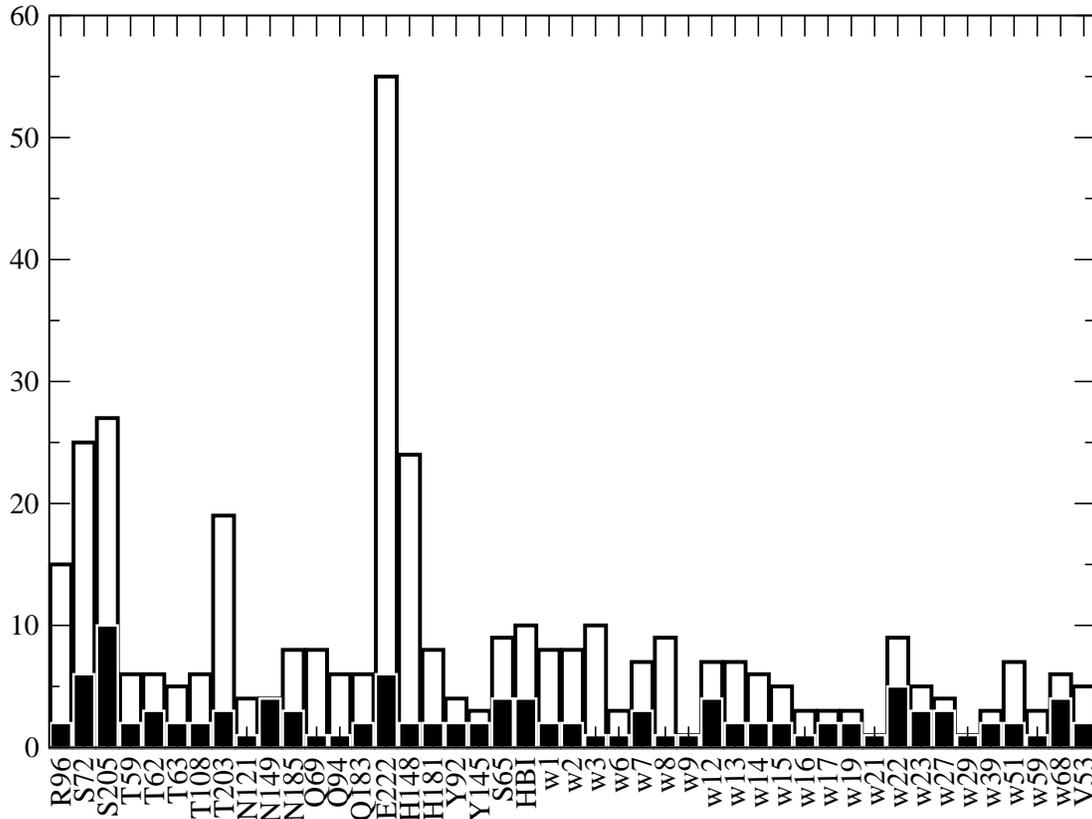


Abbildung 5.18: Vergleich zwischen angebotenen (helle Balken) und besetzten (dunkle Balken) KP-Zuständen für die einzelnen Residuen. Als 'besetzt' haben wir hierbei einen Zustand betrachtet, der bei der Rechnung am großen Satz im S0-Zustand des HBI irgendwo im Intervall $\text{pH} = [-10, 15]$ mit mehr als $5 \cdot 10^{-4}\%$ aufgetreten ist.

einmal eine Rechnung gemacht, in der wir dem Proteinmodell nur diese KP-Zustände ermöglichen haben. Die daraus ermittelten mikroskopischen pK_a -Werte haben wir in Tabelle 5.16 eingetragen. Diese Werte stimmen nicht innerhalb der Fehlerschranken der ProTikKS-Methode mit denen aus den Rechnungen mit dem großen Satz überein. Daraus können wir schließen, daß die berechneten pK_a -Werte empfindlich auf die Vorgabe der möglichen KP-Zustände reagieren.

Unter den Gruppen, die ihren zugänglichen Konfigurationsraum am meisten nutzen, befinden sich auch die Residuen, welche wir in Abschnitt 5.5 für den kleinen Satz verwendet haben. Interessant ist auch zu bemerken, daß wir im bezug auf die Positionen der Stickstoffatome an den Imidazolringen der Histidine keine Abweichungen von den Röntgenstrukturen erhalten obwohl wir alternative Konfigurationen angeboten haben. Diese werden aber bei unserer Suche nach niederenergetischen Zuständen nicht erfaßt. Gleiches gilt für die Seitenketten mit Amidgruppen.

pK_a-Werte der übrigen Residuen

Innerhalb der oben angegebenen Fehlergrenzen von 4% haben wir auch die P-Zustände der anderen protonierbaren Residuen auf ihre pH-Abhängigkeit hin überprüft. Die pK_a-Werte der einzelnen Gruppen sind in Tabelle 5.18 aufgelistet. Wir haben hierbei nur einen pH-Bereich von -10 bis 15 untersucht und festgestellt, daß weder R96 noch Y145 in diesem Bereich deprotonieren. Der Stickstoff am HET bleibt unprotoniert, damit ist am HBI nur die Protonierungsreaktion am Y66 von Bedeutung. Die beiden Histidine geben in diesem Bereich maximal ein Proton ab. Der pK_a-Wert für diese Reaktion ist beide Male kleiner als null, und der zweifach deprotonierte Zustand der Histidine tritt nicht auf. Die Deprotonierungsreaktion am H148 findet am NE2 statt. Wir finden also in unseren Rechnungen, im Einklang mit den Experimenten, das ND1-Tautomer, obwohl beide Modell-pK_a-Werte des Imidazolringes identisch gewählt wurden (vgl. Abschnitt 5.4.3).

Die P-Zustände der eben diskutierten Residuen bleiben innerhalb des biologisch wichtigen pH-Intervalls (3–10) unverändert. Das veranlaßt uns dazu, an diesem System noch einmal Rechnungen im Sinne der „*reduced-site-approximation*“ von Bashford und Karplus [11] durchzuführen. Hierbei halten wir die P-Zustände dieser Residuen fest und bestimmen die mittleren mikroskopischen pK_a-Werte von E222 und Y66 wie zuvor. Diese, ebenfalls in Tabelle 5.16 zusammengefaßten, Ergebnisse stimmen innerhalb der Standardabweichung mit den früheren überein.

| | R96 | H148 | H181 | Y92 | Y145 |
|------------------------|------|--------------|--------------|------|------|
| pK _a (S0) | > 15 | -0.52 ± 0.1 | -5.22 ± 0.11 | > 15 | > 15 |
| pK _a * (S1) | > 15 | -1.00 ± 0.08 | -5.59 ± 0.09 | > 15 | > 15 |

Tabelle 5.18: Berechnete pK_a-Werte der anderen Residuen im großen Satz. Angegeben sind die Werte für die Fälle, daß der HBI im Grundzustand (S0) bzw. im angeregten Zustand (S1) vorliegt.

Korrelationen

Vertrauen wir nun darauf, daß unsere Rechnungen die pH-abhängigen Konzentrationen der einzelnen KP-Zustände mit einer Unsicherheit von 4% bestimmen, können wir die aus den Simulationen stammenden Ergebnisse diskutieren. Die Titrationskurven für den Chromophor und E222 haben wir bereits in Abbildung 5.16 gesehen. Daran konnten wir erkennen, daß beide Kurven ähnlich verlaufen und können daraus auf eine Wechselwirkung zwischen den beiden Residuen schließen.

Bei der Untersuchung des kleinen Satzes haben wir bereits erkannt, daß diese beiden Kurven nicht die einzigen sind, die ein ähnliches Verhalten zeigen. So ist beispielsweise die Form der in Abbildung 5.10 dargestellte Konzentration des KP-Zustandes S205h1 vergleichbar mit der der Population von T203bh1. Obwohl sich diese Funktionen in ihren Werten unterscheiden, können wir augenscheinlich auf eine Korrelation zwischen den Besetzungen der einzelnen Zustände schließen. Um diese qualitative Aussage quantitativ untermauern zu können, berechnen wir die Korrelationskoeffizienten zwischen den Besetzungen jeweils zweier Zustände. Wenn wir die Populationen $\mathfrak{P}_i(\text{pH})$ und $\mathfrak{P}_j(\text{pH})$ zweier KP-Zustände i und j für \mathcal{K} diskrete pH-Werte berechnet haben¹⁰ ist der Korrelationskoeffizient [214] durch

$$\sigma_{ij} = \frac{1}{\mathcal{K}} \sum_{k=1}^{\mathcal{K}} (\mathfrak{P}_i(\text{pH}_k) - \langle \mathfrak{P}_i \rangle) (\mathfrak{P}_j(\text{pH}_k) - \langle \mathfrak{P}_j \rangle) \quad (5.30)$$

gegeben. Wobei mit $\langle \mathfrak{P}_i \rangle = \sum_{k=1}^{\mathcal{K}} \mathfrak{P}_i(\text{pH}_k) / \mathcal{K}$ der Mittelwert der Funktionswerte über alle diskreten pH_k , $k = 1 \dots \mathcal{K}$ gebildet wurde.

Da der Korrelationskoeffizient hier mit Wahrscheinlichkeiten ($\mathfrak{P} \in [0, 1]$) gebildet wird, ist es nicht nötig diesen mit den Varianzen der einzelnen Funktionen zu normieren. Der Korrelationskoeffizient gibt einen Anhaltspunkt, ob zwischen zwei Größen, in diesem Fall die pH-anhängigen Konzentrationen von KP-Zuständen, ein linearer Zusammenhang besteht und wie stark dieser ist. Zwischen den möglichen KP-Zuständen eines einzelnen Residuums besteht natürlich ein enger Zusammenhang, schließlich kann zu einem Zeitpunkt immer nur einer davon realisiert sein. Deshalb bestimmen wir nur die Korrelationskoeffizienten zwischen KP-Zuständen unterschiedlicher Residuen. Diese werden i. allg. unterschiedliche Werte annehmen. Als Maß für die Korrelation zwischen zwei Residuen werden wir nur den größten davon betrachten. Da eine Antikorrelation zwischen der Besetzung zweier Zustände auch als Korrelation zwischen der Besetzung des einen und der Nichtbesetzung des anderen interpretiert werden kann, beschränken wir uns auf positive Werte für die Korrelationskoeffizienten.

Je näher ein Korrelationskoeffizient bei eins liegt, desto begründeter ist die Annahme, daß ein linearer Zusammenhang zwischen zwei Größen besteht. Um einen Überblick über die bestehenden Korrelationen in unserem System zu bekommen haben wir in Abbildung 5.19 alle betrachteten Residuen in einem 45-Eck angeordnet und nur diejenigen mit einer Linie verbunden, deren Korrelationskoeffizient größer als 0.9999 ist.

Allerdings weist nicht jede der vielen Linien in der Graphik auf eine lineare Korrelation hin, die aus einer unmittelbaren Wechselwirkung zwischen zwei Residuen

¹⁰Obwohl wir mit der ProTikKS-Methode diese Konzentrationen in beliebig kleinen pH-Abständen berechnen könnten, haben wir es bei numerischen Rechnungen immer mit diskreten Werten zu tun.

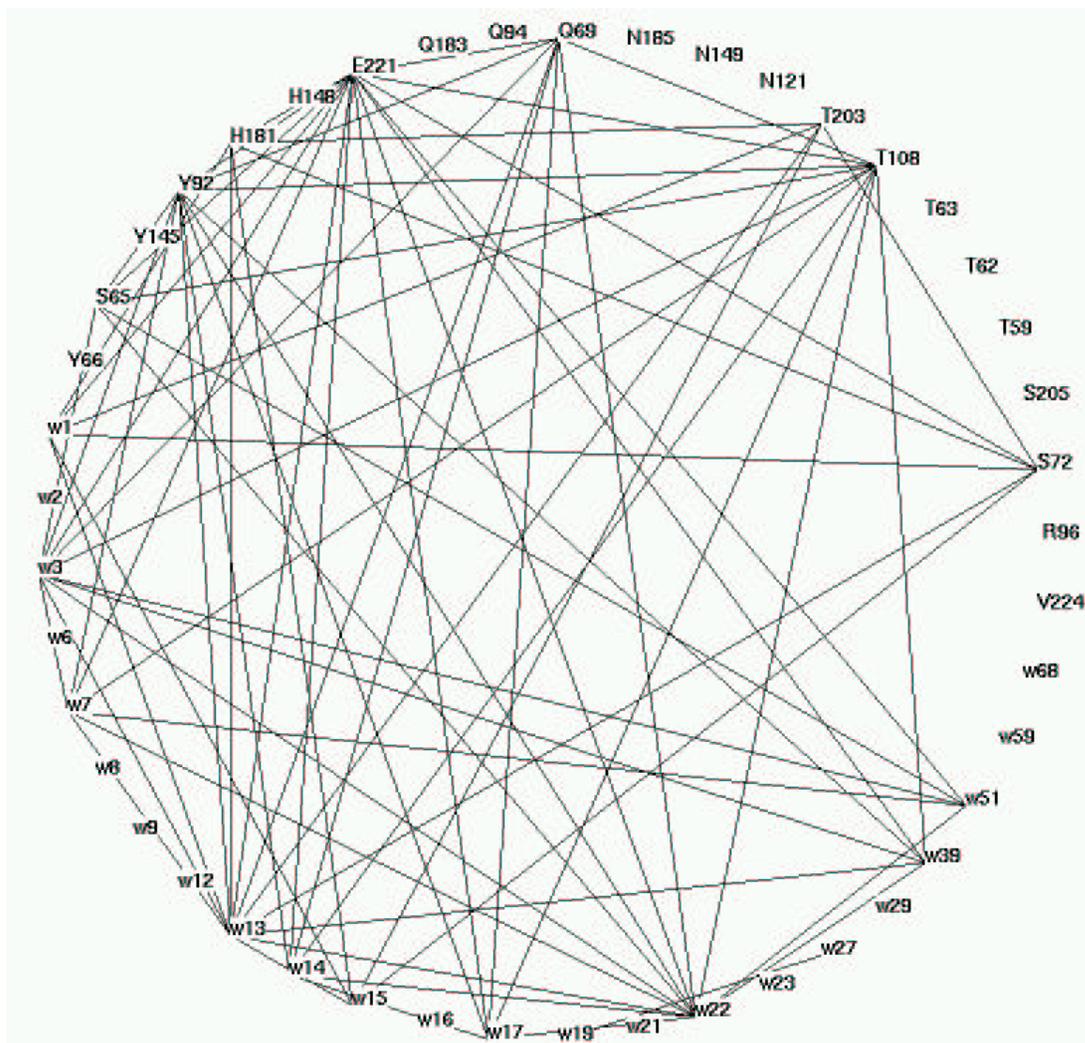


Abbildung 5.19: Graph für Korrelationen zwischen den KP-Zuständen der einzelnen Residuen. Wir haben diejenigen Gruppen mit Linien verbunden, für die wir nach Gl. 5.30 eine Korrelation von mehr als 0.9999 erhalten haben. Diese Ergebnisse beziehen sich auf die Rechnungen innerhalb der *reduced-site-approximation* für das wtGFP mit dem HBI im S0-Zustand.

resultiert. Denn zwei Ereignisse können auch dann eine lineare Korrelation besitzen, wenn beide von einem dritten Parameter gleichermaßen beeinflusst werden. In Teilbild A) der Abbildung 5.20 ist eine solche Situation skizziert. Ist die Gruppe 3 unprotoniert, bilden die Wasserstoffatome der Residuen 1 und 2 eine Wasserstoffbrücke zu dem Sauerstoff von 3. Wird dieser protoniert, müssen sich beide Wasserstoffatome umorientieren. Da der Unterschied in der dipolaren Wechselwirkung der Hydroxylgruppen von 1 und 2 zwischen den beiden Konfigurationen vernachlässigt werden kann gegenüber der Wechselwirkung mit Gruppe 3, besteht

keine direkte Wechselwirkung zwischen 1 und 2. Dennoch wird der Korrelationskoeffizient für die pH-abhängigen Besetzungen der K-Zustände von 1 und 2 auf einen linearen Zusammenhang zwischen diesen hinweisen.

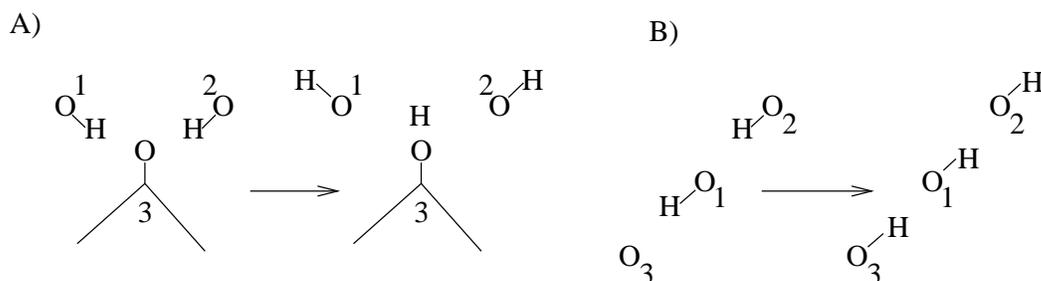


Abbildung 5.20: Beispiele für indirekte Korrelationen zwischen Konformationen und Protonierungen von Residuen. In Teilbild A) orientieren sich die Gruppen 1 und 2 nach Protonierung von 3 um, weil beide dem neuen Proton Platz schaffen. In Teilbild B) macht nur die Gruppe 1 dem neuen Proton (an 3) Platz. Aber als Folge davon orientiert sich auch 2 um.

Teilbild B) dieser Abbildung zeigt eine andere Situation, in der wiederum das Residuum 3 zunächst deprotoniert ist und die Wasserstoffatome von 1 und 2 eine Wasserstoffbrückenkette bilden, die an dem Sauerstoff von 3 beginnt. Protoniert dieser, lagert sich zunächst das H-Atom von 1 und in Folge davon das von 2 um. Auch hier werden die paarweisen Korrelationskoeffizienten für die Konzentrationen der beiden K-Zustände von 1 und 2 sowie des P-Zustandes von 3 einen linearen Zusammenhang anzeigen. Allerdings besteht dieser zwischen 1 und 2 hier tatsächlich aufgrund einer direkten Wechselwirkung zwischen diesen Gruppen. Der zwischen 2 und 3 hingegen ist nicht direkt Folge einer Wechselwirkung, sondern wird durch die Umlagerung der Hydroxylgruppe von 1 vermittelt. Wir könnten hier somit von einem indirekten Zusammenhang sprechen.

5.6.3 Angeregter Zustand

Mit den eben vorgestellten Rechnungen haben wir die Verteilung von Protonen in der Umgebung des Chromophors für dessen elektronischen Grundzustand untersucht. Da wir mögliche Akzeptoren für ein Proton im angeregten Zustand des HBI suchen, untersuchen wir nun das Protein mit einem angeregten Chromophor. Hierzu ersetzen wir die bisher verwendeten Partialladungen des HBI durch die für den S1-Zustand ermittelten (vgl. Abschnitt 5.2.1). Die Modell-pK_a-Werte für den Tyrosin-Sauerstoff und den Stickstoff am Heterozyklus entnehmen wir aus Tabelle 5.7, wobei wir von der Annahme ausgehen, daß der S1-Zustand des Chromophors lange genug lebt um ein Gleichgewicht zu erreichen (vgl. Abschnitt 5.2.3).

Ausgerüstet mit diesen neuen Parametern, suchen wir mit unserem Algorithmus wie zuvor die energetisch niedrigsten Zustände des Systems. Wir führen wiederum zehn Simulationen, jeweils mit unterschiedlichen Anfangszuständen beginnend, durch und bestimmen daraus mittlere pK_a -Werte für die einzelnen Gruppen. Einige dieser Werte haben wir in Tabelle 5.18 zusammengefaßt. Auch bei den Ergebnissen dieser Rechnungen haben wir untersucht, welche KP-Zustände mit mehr als $5 \cdot 10^{-4}\%$ besetzt werden und Korrelationen zwischen den pH-abhängigen Besetzungen betrachtet. Da wir dabei bezogen auf die Verteilung der K-Zustände im Vergleich zum S0-Zustand des HBI keine neuen Erkenntnisse gewinnen konnten, werden wir uns im folgenden auf die Darstellung der veränderten Protonierungsgleichgewichte beschränken.

| | voll | rsa |
|----------------------|------------------|------------------|
| $pK_a^*(E222 HET)$ | 9.80 ± 0.08 | 9.76 ± 0.05 |
| $pK_a^*(E222 HET_h)$ | 3.17 ± 0.05 | 3.20 ± 0.10 |
| $pK_a^*(HET E222)$ | 10.45 ± 0.06 | 10.47 ± 0.05 |
| $pK_a^*(HET E222_h)$ | 3.83 ± 0.06 | 3.92 ± 0.07 |

Tabelle 5.19: Die mit der ProTikKS-Methode berechneten mikroskopischen pK_a -Werte von E222 und HET für das wtGFP mit dem HBI im S1-Zustand. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus zehn Simulationen mit der zugehörigen Standardabweichung. Es wurden Rechnungen am gesamten großen Satz (voll) und im Rahmen der *reduced-site-approximation* (rsa) durchgeführt (vgl. Tabelle 5.5).

Die Residuen R96, Y92 und Y145 sind, ebenso wie im Grundzustand, im gesamten untersuchten Bereich ($pH = [-10,15]$) protoniert. Auch die Histidine verhalten sich ähnlich und deprotonieren beide nur einfach. Dabei hat sich im Vergleich zum S0-Zustand des Fluorophors der pK_a von H148 um eine halbe Einheit zu niedrigeren Werten hin verschoben. Dies läßt sich auf die veränderten elektrostatischen Wechselwirkungen mit dem HBI zurückführen, ebenso wie die Verschiebung des pK_a -Wertes für die Dissoziation des H181.

Anhand der, in Abschnitt 5.2 beschriebenen, quantenchemischen Rechnungen können wir erkennen, daß es bei elektronischer Anregung zu einer korrelierten Verschiebung der Protonenaffinitäten an den beiden protonierbaren Gruppen des HBI kommt (vgl. Tabellen 5.2 und 5.3). Im elektronisch angeregten Zustand reagiert der Tyrosinring Y66 saurer als im Grundzustand, während der Imidazolring HET basischer wird. Durch diese Verschiebung des Tautomeriegleichgewichtes tritt im S1-Zustand das protonierte Y66 im Protein im untersuchten pH-Bereich nicht mehr auf. Stattdessen protoniert der N2 Stickstoff am HET.

Die in Abbildung 5.21 gezeigten Titrationskurven von HET und E222 lassen wieder ein Plateau erkennen. Wie im elektronischen Grundzustand des HBI teilt sich dieser auch im angeregten Zustand ein Proton mit E222 innerhalb eines Bereiches

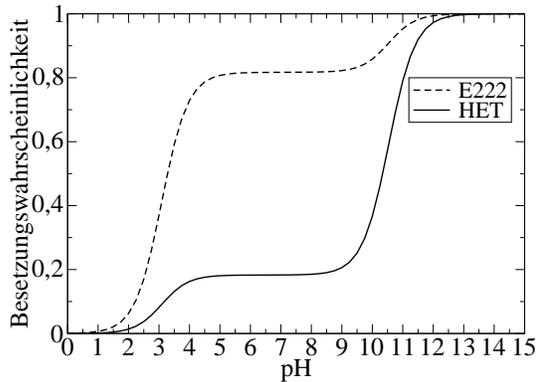


Abbildung 5.21: Besetzungswahrscheinlichkeiten der deprotonierten Zustände von E222 und HET im wtGFP mit angeregtem HBI. Wir haben nur die, mit den Werten für den großen Satz, aus Tabelle 5.19 und Gl. 5.27, berechneten Kurven eingetragen.

von $\text{pH} \approx 3.5 \dots 9.5$, wobei der protonierte Chromophor dann in der zwitterionischen Form vorliegt. Bisher existieren allerdings keine experimentellen Evidenzen für das Vorhandensein dieses Protonierungszustandes im Protein. Daraus müssen wir aber nicht folgern, daß unser Modell oder die Methode fehlerhaft sind. Schließlich beschreiben wir mit unseren Simulationen Systeme im thermodynamischen Gleichgewicht. Die Ergebnisse für den angeregten Zustand können, wie bereits früher erwähnt, überhaupt nur dann sinnvoll interpretiert werden, wenn dieser Zustand lange genug lebt, um ein Gleichgewicht zu erreichen. Aber selbst wenn das der Fall ist, haben wir den Aspekt der Kinetik gänzlich vernachlässigt. Die abgebildeten Titrationskurven machen Aussagen über Gleichgewichtsverteilungen der Protonen, ohne darauf Rücksicht zu nehmen, auf welchen Wegen und mit welchen Raten das System von einem Zustand in den anderen gelangt.

Überlegungen zum Protonentransfer

Dennoch wollen wir versuchen, mit Hilfe unserer Ergebnisse mögliche Akzeptoren für das Proton zu identifizieren, welches von Y66 im elektronisch angeregten Zustand abgegeben wird. Die oben gezeigten Titrationskurven beschreiben das makroskopische Verhalten des Systems. In ihnen sind die Effekte aller mikroskopischen pK_a 's des Systems subsummiert.

Die Wechselwirkungen, welche die bedingten mikroskopischen pK_a -Werte kontrollieren, sind aber dennoch vorhanden. Damit existiert beispielsweise auch eine Gleichgewichtskonstante $\text{pK}_a(\text{H148}|\text{HBI} \wedge \text{E222})$ für die Dissoziationsreaktion des H148, wenn HBI und E222 deprotoniert sind. Aber diese wird in den makroskopischen Werten sozusagen „verschluckt“, weil E222 und Y66 bereits beide protoniert sind, bevor der pH-Wert in die Nähe dieses pK_a 's kommt. Folglich kann H148 nur noch mit $\text{pK}_a(\text{H148}|\text{E222h} \wedge \text{Y66h})$ protonieren, der dann als makroskopischer Wert zu Tage tritt. Dabei nimmt die Zahl der Protonen im Protein mit abnehmendem pH zu. Wenn aber bei konstantem pH-Wert der Chromophor angeregt wird und Y66 deprotoniert, müssen wir davon ausgehen, daß diese Zahl

konstant bleibt¹¹ und damit die mikroskopischen pK_a -Werte wichtig werden.

Betrachten wir ein Experiment bei $pH = 8$. Aus der makroskopischen Titrationskurve (Abbildung 5.16) entnehmen wir, daß bei 60% der GFP Moleküle in der Lösung Y66 und bei 40% das E222 protoniert ist. Die pK_a -Werten aus Tabelle 5.18 rechtfertigen die Annahme, daß bei allen Proteinen R96, Y92 und Y145 protoniert und H148 sowie H181 jeweils einfach protoniert sind. Strahlen wir mit Licht der Wellenlänge 397 nm in die Lösung ein, regen wir den Fluorophor eines GFPs an, bei dem Y66 protoniert ist. Diese Gruppe möchte nun das Proton abgeben, aber wohin?

In unserem mikroskopischen Modell stehen H148, H181, E222, Y66 und HET als mögliche Akzeptoren zur Auswahl. In dieser Reihenfolge haben wir auch die P-Zustände des Systems in Abbildung 5.22 notiert. Hier ist die Situation für den Protonentransfer als Baum dargestellt. Die eingetragenen mikroskopischen pK_a -Werte sind daneben definiert. Da keine weiteren Protonen eindringen können, haben wir es hier nur mit ein-Teilchen-Zuständen zu tun.

In diesem Baum sind die Konzentrationen der einzelnen Protonierungszustände auf den deprotonierten Grundzustand bezogen. Wir geben also jeweils den mikroskopischen pK_a einer Gruppe unter der Bedingung an, daß die übrigen deprotoniert sind. Analog zu den Gleichungen 3.41 und 3.42, mit denen aus den Gleichgewichtskonstanten die Konzentrationen aller P-Zustände berechnet werden können, bestimmen wir daraus die Wahrscheinlichkeiten, das Proton an einer bestimmten Gruppe zu finden:

$$\mathfrak{P}(\mathbf{s}_i) = \frac{10^{pK_i}}{\sum_{j=1}^5 10^{pK_j}} \quad \text{für } i = 1 \dots 5. \quad (5.31)$$

Die in dieser Gleichung auftretenden pK_a -Werte haben wir, wie in Abschnitt 3.2.4 erläutert, aus den Ergebnissen unsere Rechnungen bestimmt und in Tabelle 5.20 eingetragen. Die aus diesen Werten resultierenden Wahrscheinlichkeiten, das Proton an einer der Gruppen zu finden, sind dort ebenfalls zusammengefaßt. Befände sich das System im thermischen Gleichgewicht, würden wir bei mehr als 83% der Proteine das Proton, im elektronisch angeregten Zustand des Chromophors, an HET finden und nur in etwa 17% aller Fälle an E222. Im Vergleich dazu wäre eine Protonierung der anderen Gruppen sehr unwahrscheinlich. Wie im elektronischen Grundzustand befindet sich das Proton mit größter Wahrscheinlichkeit am E222 oder am Chromophor.

Diese Diskussion liefert die freien Energien der verschiedenen Akzeptorzustände. Nach der Anregung des Chromophors sind alle anderen Residuen als Akzeptor

¹¹Nach Dempsey [215] läuft der Austausch von Protonen zwischen einem Protein und seiner Umgebung auf einer μs Zeitskala ab. Der Protonentransfer im angeregten Zustand läuft im GFP innerhalb von 3ps ab [187].

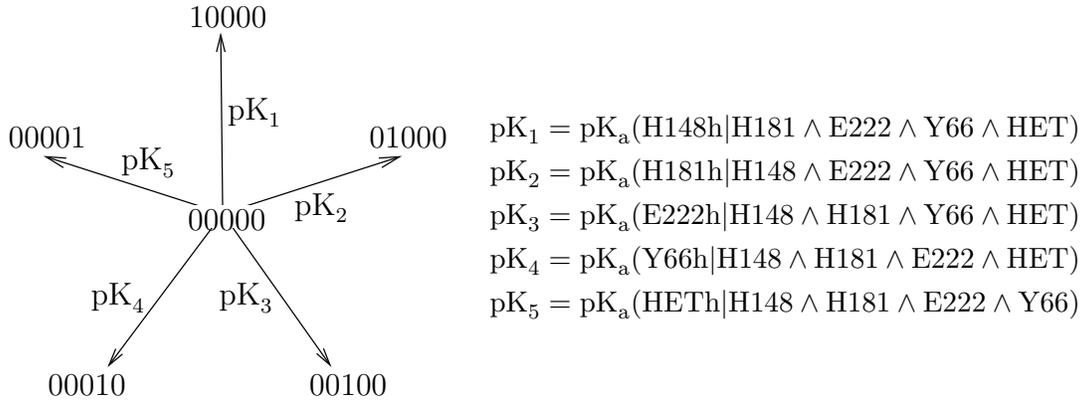


Abbildung 5.22: Baum für Protonentransferreaktionen in einem System mit einem Proton. Die Ziffern geben, von links nach rechts, den P-Zustand der Gruppen H148, H181, E222, Y66, HET an. Die eingetragenen mikroskopischen pK_a -Werte sind auf der rechten Seite definiert. Alle Reaktionen sind auf den deprotonierten Grundzustand bezogen.

| | S1 | | S0 | |
|------|------------------|----------------------------------|------------------|----------------------------------|
| | pK_a^* | $\mathfrak{P}(\text{Xh})$ | pK_a | $\mathfrak{P}(\text{Xh})$ |
| H148 | 3.48 ± 0.04 | $(7.72 \pm 1.05) \cdot 10^{-8}$ | 4.98 ± 0.07 | $(2.91 \pm 0.54) \cdot 10^{-7}$ |
| H181 | 0.76 ± 0.06 | $(1.47 \pm 0.25) \cdot 10^{-10}$ | 0.94 ± 0.05 | $(2.65 \pm 0.39) \cdot 10^{-11}$ |
| E222 | 9.83 ± 0.07 | $(1.73 \pm 0.28) \cdot 10^{-1}$ | 11.24 ± 0.05 | $(5.29 \pm 0.45) \cdot 10^{-1}$ |
| Y66 | -3.27 ± 0.05 | $(1.37 \pm 0.21) \cdot 10^{-14}$ | 11.19 ± 0.06 | $(4.71 \pm 0.45) \cdot 10^{-1}$ |
| HET | 10.51 ± 0.05 | $(8.27 \pm 0.28) \cdot 10^{-1}$ | 3.23 ± 0.05 | $(5.17 \pm 0.75) \cdot 10^{-9}$ |

Tabelle 5.20: Berechnete mikroskopische pK_a -Werte für die in Abbildung 5.22 definierten Reaktionen. Die pK_a -Werte sind Mittelwerte aus zehn Simulationen und mit der zugehörigen Standardabweichung angegeben. Aus diesen Werten wurden die Protonierungswahrscheinlichkeiten $\mathfrak{P}(\text{Xh})$ der einzelnen Gruppen, im wtGFP mit dem HBI im angeregten Zustand (S1) bzw. im Grundzustand (S0), berechnet (Gl. 5.31).

günstiger als das Y66. Auch wenn die treibenden Kräfte für die Protonierung von HET oder E222 sehr günstig sind, können die Barrieren, die das Proton auf seinem Weg dorthin überwinden muß, so hoch sein, daß die Übergangswahrscheinlichkeit sehr klein wird. Immerhin beträgt der Abstand zwischen dem Sauerstoff von Y66 und dem N2 am Heterozyklus 6.7 \AA und der zum nächsten Sauerstoff am E222 immer noch 5 \AA . Diese Distanzen sind zu groß, als daß der Protonentransfer direkt stattfinden könnte [183]. Der Abstand zum NE2-Stickstoff am H148 beträgt hingegen nur 3.3 \AA und das Proton am Y66 kann eine Wasserstoffbrücke zu diesem Stickstoff ausbilden [174]. Diese Nähe könnte die Kinetik des Protontransfers vom Y66 zum H148 derart begünstigen, daß dieses Histidin durchaus als Akzeptor für das Proton in Frage kommt, wie es z. B. von Lossau et al. [187] diskutiert wird.

Kapitel 6

Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit haben wir die ProTikKS-Methode zur Beschreibung der Ionisierungsgleichgewichte in Proteinen entwickelt, in ein numerisches Verfahren umgesetzt und evaluiert. Dabei haben wir besonders die Wechselwirkungen zwischen den Ladungs- und Konformationszuständen der einzelnen Residuen im Protein betrachtet. Ändert sich der Protonierungszustand einer Gruppe im Protein, können sich andere Seitenketten umorientieren und dadurch den neuen Ladungszustand stabilisieren. In unserem Proteinmodell haben wir die Reorientierbarkeit von geladenen und polaren Seitengruppen explizit berücksichtigt. Dadurch wurde die ortsabhängige Dipolrelaxation im atomaren Detail beschrieben und wir konnten die dielektrische Antwort des Proteins auf Änderungen des Protonierungszustandes durch eine niedrige, ortsunabhängige Dielektrizitätskonstante modellieren.

Die theoretischen Grundlagen unserer Methode haben wir, ausgehend vom Gittergasmodell, entwickelt. Wir haben zunächst die statistische Mechanik eines Titrationsexperimentes an einzelnen Molekülen in verdünnter Lösung beschrieben (vgl. Abschnitt 3.1.2). Anschließend haben wir diese Theorie auf die Protonierungsreaktion einer Gruppe innerhalb eines Proteins mit mehreren wechselwirkenden titrierbaren Residuen erweitert. Dabei haben wir für die Residuen sowohl unterschiedliche Protonierungs- als auch Konformationszustände zugelassen. Das Ionisierungsgleichgewicht im Protein haben wir auf Modell- pK_a -Werte zurückgeführt, die die Dissoziationsgleichgewichte der isolierten Gruppen im Lösungsmittel charakterisieren (vgl. Abschnitt 3.2).

Da das gesamte Modell im Rahmen der statistischen Mechanik formuliert ist, konnten wir theoretisch den Bezug zwischen dem Modell- pK_a und dem experimentellen Wert herstellen. Dabei haben wir gesehen, daß es nicht ausreichend ist, den gemessenen Wert nur um die Energieänderungen zu korrigieren, die mit der Umgebungsänderung einhergehen. Zusätzlich müssen auch noch entropische

Beiträge berücksichtigt werden, wie sie beispielsweise durch Symmetrien von dissoziierenden Molekülen zustandekommen.

Ein weiterer entropischer Beitrag entsteht durch Freiheitsgrade, deren zugänglicher Konformationsraum vom Protonierungszustand einer Gruppe abhängt. Solche Freiheitsgrade, die wir bei biologisch funktionellen Gruppen gefunden haben, müssen entweder explizit oder durch einen Korrekturterm am Modell- pK_a implizit im Modell beschrieben werden. Am Fluorophor des GFP konnten wir einen solchen Freiheitsgrad identifizieren (vgl. Abschnitt 3.2.7). Um eine einfache Abschätzung des Entropiebeitrages dieses Freiheitsgrades zur Dissoziationsreaktion im Protein zu erhalten, haben wir den Transfer des Fluorophors vom Lösungsmittel ins Protein als Übergang vom freien Rotor zum harmonischen Oszillator modelliert. Durch diese einfache Abschätzung konnten wir zeigen, daß der pK_a -Wert dieses Moleküls im Protein, allein aufgrund des zugehörigen entropischen Beitrages, um etwa 1.2 pK-Einheiten niedriger liegt als im Lösungsmittel. Später konnten wir diesen Wert durch quantenchemische Rechnungen bestätigen (vide infra!). Auf diese Weise wurde erstmals ein Beitrag zum Ionisierungsgleichgewicht im Protein analysiert und quantifiziert, der durch das selektive Einfrieren von Freiheitsgraden entsteht.

Mit der ProTikKS-Methode wollen wir speziell die Konformationsflexibilitäten von Proteinen berücksichtigen. Deshalb haben wir bei der Ableitung der großkanonischen Zustandssumme unseres Proteinmodells in Abschnitt 3.2 den Beitrag des chemischen Potentials klar von dem der Konformationsenergien getrennt. Dadurch sind wir zu einer Darstellung gelangt, die es uns ermöglicht, pH-abhängige Größen aus den Ergebnissen eines einmaligen Abtastens des Konfigurationsraumes zu bestimmen. Dabei kann jedes geeignete Verfahren angewendet werden, um die Zustandssumme über den Konformationsraum des Proteins zu ermitteln. Die Zustandssumme kann z. B. bei Systemen mit wenigen Zuständen exakt berechnet und bei solchen mit vielen Zuständen genähert werden.

Die Anwendung der ProTikKS-Methode auf ein reales System erfordert ihre Umsetzung in ein numerisches Verfahren. Um diese zu verwirklichen, muß zunächst ein Satz möglicher Seitenkettenkonformationen erzeugt werden. Wir sind davon ausgegangen, diese Konformationen aus unterschiedlichen Röntgenstrukturen des Proteins zu gewinnen. Protonen, die zu polaren oder deprotonierbaren Gruppen in dem Protein gehören, werden durch ein eigens entwickeltes Verfahren (vgl. Abschnitt 4.3.2) in die Modellstruktur eingeführt. Dabei versuchen wir den Protonen einen möglichst großen Konformationsraum zugänglich zu machen und erzeugen gezielt Konfigurationen, in denen starke Wasserstoffbrückenbindungen etabliert werden können.

Für die ermittelten Konformations- und Protonierungszustände des Proteinmodells müssen die Konformationsenergien berechnet werden. Diese werden basierend auf molekularen Kraftfeldern aus den Bindungs-, VAN-DER-

WAALS- und Ladungsparametern bestimmt (vgl. Kapitel 4). Die elektrostatischen Solvatisierungs- und Wechselwirkungsenergien werden aus numerischen Lösungen der POISSON-BOLTZMANN-Gleichung ermittelt (vgl. Abschnitt 4.2).

Für Systeme mit einer kleinen Anzahl unterschiedlicher Zustände kann aus den zugehörigen Konfigurationsenergien die Zustandssumme exakt berechnet werden. Für größere Systeme, in denen das nicht mehr möglich ist, haben wir eine Methode für die genäherte Berechnung der Zustandssumme vorgeschlagen. Unter Verwendung eines METROPOLIS-Monte-Carlo-Algorithmus und der Methode des *simulated-annealing* tasten wir dabei den Konformationsraum für feste Protonenzahlen ab, und suchen die niederenergetischsten Zustände (vgl. Abschnitt 4.3.4). Mit diesen berechnen wir einen Näherungswert der Zustandssumme für das System, die wir als Grundlage für die Rechnungen mit der ProTikKS-Methode verwenden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit (ab Kapitel 5) haben wir die zuvor entwickelte Methode auf das GFP angewendet. Hier haben wir die Protonierungszustände und Dipolorientierungen von Residuen innerhalb einer relevanten Umgebung um den Fluorophor untersucht. Die Konformationen für die Seitengruppen in unserem GFP-Modell haben wir Röntgenstrukturen entnommen, die unter unterschiedlichen experimentellen Bedingungen aufgeklärt worden waren (vgl. Abschnitt 5.3). Nachdem wir die fehlenden Protonen modelliert und uns auf einen 10\AA Bereich um den Chromophor beschränkt haben, erhielten wir einen großen Satz von Seitenkettenkonformationen die zu 10^{35} möglichen Konformations- und Protonierungszuständen kombiniert werden können.

Da für dieses Protein nicht alle notwendigen Partialladungen zur Berechnung der Konformationsenergien in den verwendeten Parametersätzen vorhanden sind, haben wir die fehlenden mit semiempirischen Standardverfahren der Quantenchemie zusätzlich parametrisiert (vgl. Abschnitt 5.4.3). Eine besondere Herausforderung stellte dabei der Fluorophor dar. Dieser besteht aus einem Phenol und einem Imidazolring und besitzt daher zwei protonierbare Gruppen, deren Dissoziationsgleichgewichte durch vier mikroskopische pK_a -Werte beschrieben werden (vgl. Abschnitt 5.1.2).

Diese mikroskopischen Werte sind experimentell nicht bekannt. Wir benötigen aber, wie weiter oben erläutert, die pK_a -Werte eines Modellmoleküls im Lösungsmittel, um die Werte im Protein berechnen zu können. Die Lösungsmittel- pK_a -Werte für den Fluorophor im elektronischen Grundzustand (Abschnitt 5.2.2) und im angeregten Zustand (Abschnitt 5.2.3) haben wir deshalb mit Hilfe quantenchemischer Rechnungen ermittelt.

Die Torsionsbarrieren um die Bindungen, welche die beiden zyklischen Gruppen des Fluorophors verbinden, sind im protonierten Zustand sehr viel geringer als im deprotonierten. Daraus resultiert ein entropischer Beitrag des zugehörigen Freiheitsgrades zu den mikroskopischen pK_a -Werten, der bei den Rechnungen

berücksichtigt werden muß. Deshalb haben wir nicht nur die pK_a -Werte für den rigiden Fluorophor berechnet, sondern zusätzlich das Konfigurationsintegral für diesen Freiheitsgrad ausgewertet und die entropische Korrektur ermittelt. Die Bestimmung makroskopischer pK_a -Werte für den Chromophor lieferte gute Übereinstimmung mit experimentellen Daten für den elektronischen Grundzustand. Diese Rechnungen haben gezeigt, daß die elektronische Anregung des Chromophors eine synchrone Verschiebung des Ionisierungsgleichgewichtes zwischen den beiden Gruppen induziert. Im angeregten Zustand wird die phenolische Hydroxylgruppe im Vergleich zum Grundzustand saurer, während der Imidazolring basischer wird.

An dem so parametrisierten Proteinmodell haben wir zunächst den Einfluß verschiedener Parameter auf die Ergebnisse von Proteinelektrostatik-Rechnungen untersucht und die ProTikKS-Methode getestet. Um Artefakte auszuschließen, die durch die Näherung der Zustandssumme entstehen, haben wir in Abschnitt 5.5 ein kleines Testsystem (mit etwa $2 \cdot 10^5$ Zuständen) präpariert. An diesem kleinen Satz, dessen Zustandssumme wir exakt rechnen konnten, haben wir den Einfluß verschiedener Ladungsmodelle auf die Ergebnisse von Elektrostatikrechnungen untersucht. Wir haben dazu, in Abschnitt 5.5.1 Rechnungen mit CHARMM- und mit Parse-Parametern verglichen und festgestellt, daß die Parametrisierung einen erheblichen Einfluß auf die Resultate hat. Auch wenn die, mit den beiden Parametersätzen berechneten, mikroskopischen pK_a -Werte für das kleine System nahe beieinander lagen, konnten wir sehen, daß strukturelle Eigenschaften des Proteins unterschiedlich gut repräsentiert wurden. Diese Unterschiede konnten vor allem durch die differierenden elektrostatischen Wechselwirkungsenergien zwischen polaren Gruppen, die in Wasserstoffbrücken-Geometrien vorlagen, erklärt werden. Wir haben daraus geschlossen, daß in solchen Strukturen wichtige Polarisierungseffekte verschieden in die Parametrisierung der beiden Ladungsmodelle eingegangen sind.

Neben dem Einfluß der Ladungsparameter haben wir auch den Einfluß der zur Verfügung gestellten Strukturen auf die Ergebnisse untersucht. Dazu haben wir im Abschnitt 5.5.2 den Konfigurationsraum einiger Residuen im kleinen Satz unterschiedlich eingeschränkt und die Ergebnisse verglichen. Für verschiedene Konfigurationsräume variierten dabei die berechneten mikroskopischen pK_a -Werte um bis zu drei pK-Einheiten. Diese Veränderungen konnten wir in einem mikroskopischen Bild erklären und haben dabei gesehen, daß gleichzeitige, korrelierte Umlagerungen mehrerer Gruppen eine wesentliche Rolle bei der Stabilisierung von Protonierungszuständen spielen.

Bei dem großen Satz war es nicht mehr möglich, die Zustandssumme exakt zu berechnen. Daher ging es uns in Abschnitt 5.6 zunächst darum, das vorher vorgestellte numerische Verfahren zum Nähern der Zustandssummen zu testen. Dazu haben wir die Ergebnisse einer bekannten Monte-Carlo-Methode (vgl. Ab-

schnitt 5.6.1) mit den Ergebnissen unserer numerischen Rechnungen verglichen. Während wir den kleinen Satz sehr gut mit unserer Methode beschreiben konnten und schnell die exakten Ergebnisse erhielten, war das beim großen Satz nicht der Fall. In diesem System liegen die energetisch niedrigen Zustände sehr dicht und die Zustandssummen können deshalb nicht gut genähert werden. Allerdings haben wir festgestellt, daß bei unserer Methode, ebenso wie bei einer normalen Monte-Carlo-Methode, ein charakteristischer Unterraum des Systems durchlaufen wird und wir deshalb thermodynamische Mittelwerte bestimmen können. Dabei bleibt im Vergleich zur Monte-Carlo-Methode immer noch der Vorteil, daß wir den Konfigurationsraum nicht für verschiedene pH-Werte abtasten müssen. Außerdem können wir, aus den gefundenen niederenergetischen Zuständen, nachträglich die Werte von Observablen ausrechnen, die wir beim Programmablauf nicht berechnet haben.

Nachdem wir so Vertrauen in unsere Methode gewonnen haben, sind wir daran gegangen, die Ergebnisse für das GFP auszuwerten. Zunächst konnten wir dabei feststellen, daß von all den zur Verfügung gestellten Zuständen der einzelnen Residuen nur ein kleiner Teil tatsächlich (mit mehr als $5 \cdot 10^{-4}\%$) besetzt wurde. Allerdings hat eine Rechnung, bei der wir nur diese Konfigurationen zugelassen haben, Abweichungen von bis zu einer pK-Einheit im Vergleich zu den Rechnungen mit dem kompletten Satz geliefert (vgl. Abschnitt 21). Die Ergebnisse reagieren also durchaus sensibel auf den angebotenen Konfigurationsraum.

Die in Abschnitt 5.6 durchgeführten Berechnungen für das GFP im elektronischen Grundzustand des Chromophors haben ein ausgeprägtes Plateau in dessen Titrationskurve gezeigt. Dieses Verhalten, das wir bereits aufgrund experimenteller Daten erwartet haben (vgl. Abschnitt 5.1.3), weist auf ein anormales Titrationsverhalten des Chromophors hin. In Abschnitt 3.3 haben wir allgemein das Zustandekommen solcher Titrationskurven ausführlich diskutiert. Wir haben dort gezeigt, daß diese Kurve durch drei mikroskopische, bedingte pK_a -Werte zweier wechselwirkender titrierbarer Gruppen charakterisiert wird. Die Lage des Plateaus wird durch die beiden mikroskopischen pK_a -Werte der Gruppen bestimmt, die die Deprotonierung unter der Bedingung eines deprotonierten Wechselwirkungspartners beschreiben. Damit das Plateau in der Kurve erkennbar wird, ist es notwendig, daß die Differenz dieser beiden Werte weniger als etwa zwei pK-Einheiten beträgt. Diese experimentell nicht einfach zugänglichen Werte haben wir in unserem Computerexperiment für verschiedene titrierbare Gruppen im GFP bestimmt und konnten zeigen, daß die Glutaminsäure 222 als Wechselwirkungspartner für das anormale Titrationsverhalten des Chromophors verantwortlich ist. Diese Rechnungen ergaben weiterhin, daß im Grundzustand nur die Phenolgruppe des Fluorophors protoniert und der protonierte Imidazolring nicht auftritt.

Dem elektronisch angeregten Zustand des Fluorophors haben wir uns in Ab-

schnitt 5.6.3 zugewandt. Auch hier haben wir mit der ProTikKS-Methode wieder die mikroskopischen pK_a -Werte verschiedener titrierbarer Gruppen berechnet. Wir müssen dabei betonen, daß wir mit dieser Methode Zustände im thermodynamischen Gleichgewicht betrachten und die Titrationskurven im angeregten Zustand nur dann zu interpretieren sind, wenn dieser Zustand lange genug lebt, um das Gleichgewicht zu erreichen. Zusätzlich wurde angenommen, daß die Protonierungsreaktion der schnellste Zerfallskanal im angeregten Zustand ist. Diese Annahme wird durch experimentelle Untersuchungen der Photodynamik im GFP gerechtfertigt.

Wir haben zunächst festgestellt, daß auch im Protein die Phenolgruppe stark sauer wird und nur in deprotonierter Form vorliegt. Die Protonenaffinität des Imidazolringes ist dagegen stark erhöht. Dennoch findet sich auch im angeregten Zustand ein Plateau in den Titrationskurven, das auf die Wechselwirkung des Chromophors mit der Glutaminsäure 222 zurückzuführen ist.

Der Protonentransfer im GFP findet im angeregten Zustand statt und wir können davon ausgehen, daß die Zahl der Protonen im Protein dabei konstant bleibt und sich die Protonierungszustände der anderen Residuen zunächst nicht ändern. Die treibenden Kräfte für den Transfer des Protons von der Phenolgruppe des Chromophors zu einer anderen Gruppe sind durch die Differenzen mikroskopischer pK_a -Werte gegeben. In Abschnitt 5.6.3 haben wir den bedingten pK_a -Wert jedes in unserem Modell möglichen Akzeptors bei festgehaltener Protonierung aller anderen Gruppen mit der ProTikKS-Methode berechnet. Aus diesen mikroskopischen pK_a -Werten, die experimentell nicht zugänglich sind, folgt, daß im elektronisch angeregten Zustand der Imidazolring des Chromophors und die Glutaminsäure 222 die wahrscheinlichsten Akzeptoren sind.

In der vorliegenden Arbeit haben wir nur die thermodynamischen Aspekte des Protonentransfers betrachtet. Über die Kinetik des Protonentransfers können wir soweit noch keine Aussagen machen. Dafür ist es notwendig, Energiebarrieren und Reorganisationsenergien entlang bestimmter Transferwege zu bestimmen. Noch sind wir mit der ProTikKS-Methode nicht in der Lage, die dafür benötigten Größen direkt zu berechnen. Das gibt aber unmittelbar Anlaß für zukünftige Erweiterungen dieser Methode. Moderne Konzepte der Protonentransfer-Theorie können mit den hier erarbeiteten Grundlagen kombiniert werden. Die Umsetzung erfordert die Berechnung von Energiedifferenzen für instantanen Protonensprung vom Donor zum Akzeptor. Aus der Verteilung dieser Energielücken lassen sich effektive Potentiale gewinnen, die die Berechnung von Aktivierungsenergien ermöglichen.

Um den Anwendungsbereich und die Aussagekraft unserer Methode zu erweitern, muß die Auswahl möglicher Protonenakzeptoren in dem Proteinmodell erweitert werden. Wir haben uns in dieser Arbeit auf diejenigen Aminosäuren beschränkt, die standardmäßig als protonierbar angesehen werden. Dabei haben wir gesehen,

daß deren pK_a -Werte im Protein stark gegenüber den Werten im Lösungsmittel verschoben sind. Ebenso kann durch die Proteinumgebung die Protonierung oder Deprotonierung von Hydroxylgruppen (Serin oder Threonin) oder Wassermolekülen ermöglicht werden.

Wassermoleküle können aber nicht nur reorientieren oder Protonen binden, sondern ein Protein unter Umständen verlassen oder darin eindringen. Auch diese Möglichkeit der unterschiedlichen Besetzung für Bindungsstellen von Wassermolekülen muß in unserer Methode noch berücksichtigt werden. Dadurch ergeben sich auch weitere Möglichkeiten für Wasserstoffbrückennetze.

In dieser Arbeit haben wir solche Strukturen lokal aufgebaut, indem wir für Donoren passende Akzeptoren gesucht haben. Auch bei dem Abtasten des Konfigurationsraumes haben wir nur einzelne Orientierungen oder Protonierungen geändert. In den Ergebnissen dieser Rechnungen konnten wir sehen, daß großräumige, korrelierte Umlagerungen stattfanden. Daher könnte es eine Bereicherung für unsere Methode sein, Wasserstoffbrückennetze global zu erzeugen und den Konfigurationsraum aus diesen globalen Strukturen aufzubauen. In einem solchen Proteinmodell könnten korrelierte Phänomene effektiver analysiert werden als bei der Verwendung lokaler Konformationsänderungen.

Anhang A

Aminosäuren

Im folgenden sind die 20 häufigsten Aminosäuren nach Karlson [216] tabelliert. Wir haben die Aminosäuren nicht alphabetisch aufgeführt, sondern nach wesentlichen elektrostatischen Eigenschaften gruppiert. Die Bezeichnungen werden durch die Kurzform mit drei Buchstaben und den zugehörigen Einbuchstaben-code ergänzt. Die Angaben wurden bei deprotonierbaren Gruppen durch den Lösungsmittel-pK_a vervollständigt.

Aminosäuren mit deprotonierbaren Seitenketten

| | | | |
|----------------|-----|---|------|
| Arginin | Arg | R | 12.5 |
| Asparaginsäure | Asp | D | 3.9 |
| Cystein | Cys | C | 8.3 |
| Glutaminsäure | Glu | E | 4.3 |
| Histidin | His | H | 6.0 |
| Lysin | Lys | K | 10.5 |

Aminosäuren mit polaren Seitenketten

| | | |
|------------|-----|---|
| Asparagin | Asn | N |
| Glutamin | Gln | Q |
| Methionin | Met | M |
| Serin | Ser | S |
| Threonin | Thr | T |
| Tryptophan | Trp | W |
| Tyrosin | Tyr | Y |

Aminosäuren mit apolaren Seitenketten

| | | |
|--------------|-----|---|
| Alanin | Ala | A |
| Glycin | Gly | G |
| Isoleucin | Ile | I |
| Leucin | Leu | L |
| Phenylalanin | Phe | F |
| Prolin | Pro | P |
| Valin | Val | V |

Anhang B

Abkürzungen

Im folgenden sind die wichtigsten in dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen und Formelzeichen aufgeführt. Neben einer kurzen Erklärung ist der Abschnitt angegeben, in dem das Zeichen erstmals auftritt.

Abkürzungen

| | | |
|------------|---|-------|
| BR | Bakteriorhodopsin | 1 |
| GFP | Grün Fluoreszierendes Protein | 1 |
| HET | Heterozyklus des GFP-Fluorophors | 5.1.2 |
| HBI | GFP-Fluorophor | 5.1.2 |
| K-Zustand | Konformationszustand eines Moleküls | 1 |
| KP-Zustand | Kombinierter Konformations- und Protonierungszustand eines Moleküls | 1 |
| MC | Monte-Carlo | 1 |
| MD | Molekulardynamik | 2.4 |
| PYP | Photoaktives Gelbes Protein | 2.2.2 |
| P-Zustand | Protonierungszustand eines Moleküls | 1 |

Akronyme der Quantenchemie

| | | |
|----------|--|-------|
| AM1 | Austin Model 1 | 5.2.2 |
| CI | Configuration interaction | 5.2.1 |
| CISD | Configuration interaction single and double excitations | 5.2.2 |
| INDO | Intermediate neglect of differential overlap | 5.2 |
| INDO/S | Intermediate neglect of differential overlap/ spectroscopic parametrization | 5.2.1 |
| MCSCF/PT | Multiconfiguration self consistent field with perturbation theory | 5.2.3 |
| MO | Molekülorbital | 5.2.3 |
| RHF | Restricted HARTREE-FOCK | 5.2.2 |
| SCF | Self consistent field | 5.2 |

Allgemeine obere Indizes

| | | |
|------|--|-------|
| * | Angeregter Zustand | 5.1.3 |
| +, - | Ladungszustand einer Gruppe | 2.1 |
| bdg | Bindungen | 4.1.1 |
| dih | Dihedralwinkel | 4.1.1 |
| diss | Dissoziationsreaktion | 2.2.1 |
| el | Elektrostatische Beiträge | 4.2 |
| env | „Solvatisierungseffekte“ durch die Proteinumgebung | 5.4.1 |
| exp | Experimentell | 2.2.1 |
| fix | Fixes Set | 5.4.1 |
| konf | Konformation eines Moleküls | 2.2.2 |
| prot | Proteinumgebung | 2.2.1 |
| S | Entropische Beiträge | 5.2.2 |
| solv | Lösungsmittelumgebung | 2.2.1 |
| vdw | VAN-DER-WAALS | 4.1.3 |
| win | Bindungswinkel | 4.1.1 |

Symbole und Bezeichnungen

| | | |
|---------------------------------------|---|-------|
| $[X]$ | Konzentration der Spezies X | 2.1 |
| $\sum_{\{\boldsymbol{x}\}}$ | Summation über alle möglichen Realisierungen des Vektors \boldsymbol{x} | 2.2.1 |
| $\langle X \rangle$ | Mittelwert einer Größe X | 3.1.1 |
| ΔX | Differenz in der Größe X | 2.1 |
| $\Delta\Delta X$ | Differenz einer Differenz in der Größe X | 2.2.1 |
| $\{X\}$ | Menge aller möglichen Realisierungen der Größe X | 3.2.2 |
| \boldsymbol{x}_i | i -te Realisierung aus der Menge $\{\boldsymbol{x}\}$ aller möglichen KP-Zustände | 3.2.1 |
| $\{\boldsymbol{s} \mid \mathcal{M}\}$ | Menge aller Protonierungszustände, die \mathcal{M} Teilchen enthalten | 3.2.2 |
| $\mathfrak{P}(X)$ | Wahrscheinlichkeit des Ereignisses X | 3.2.4 |
| $\mathfrak{P}(X; Y)$ | Wahrscheinlichkeit des Ereignisses X , die von einem weiteren Parameter Y abhängt | 3.2.3 |
| $\mathfrak{P}(X Y)$ | Wahrscheinlichkeit von X unter der Bedingung Y | 3.2.4 |
| A | HELMHOLTZsche freie Energie | 2.3 |
| G | GIBBSsche freie Energie | 2.1 |
| E, E | Energie | 2.2.1 |
| E_i^{eself} | Wechselwirkungsenergie des i -ten Residuums mit der Umgebung des Proteins | 3.2.1 |
| E_i^{hself} | Bindungsenergie des dissoziierbaren Protons | 3.2.1 |
| E_i^{ksself} | Bindungsenergie aller Atome einer Gruppe mit Ausnahme des dissoziierbaren Protons | 3.2.1 |
| E^{kp} | Energie eines KP-Zustandes | 3.2.2 |

| | | |
|------------------------------|--|-------|
| $E_i^{\text{qself}}(s, l_i)$ | Energie des Freiheitsgrades i im Besetzungszustand s und Quantenzustand $l_i(s)$ | 3.1.2 |
| E_{ij}^{WW} | Wechselwirkungsenergie des Residuums i mit Residuum j | 3.2.1 |
| H, H ⁺ | Wasserstoffatom, -ion | 2.1 |
| K | Gleichgewichtskonstante einer Dissoziationsreaktion | 2.1 |
| \mathbf{K} | Konformationsvektor des gesamten Proteins | 2.2.2 |
| \mathbf{k}_i | Konformationsvektor des Residuums i | 2.2.2 |
| $K_{i,j}$ | Gleichgewichtskonstante für die Reaktion $P(\mathbf{s}_i) \rightarrow P(\mathbf{s}_j)$ | 3.2.6 |
| k_B | BOLTZMANNkonstante | 2.1 |
| l_i | Quantenzahlen des i -ten Freiheitsgrades einer Gruppe | 3.1.2 |
| l_{ij} | j -te Quantenzahl des i -ten Residuums | 3.2.2 |
| M | Deprotoniertes Molekül | 2.1 |
| MH | Protoniertes Molekül | 2.1 |
| M | Zahl der Teilchen, die im System gebunden sind | 3.1.1 |
| \mathcal{M} | Zählt die Zahl der Teilchen im System ($\mathcal{M} = \sum_{i=1}^N s_i$) | 3.2.2 |
| N | Zahl der Plätze die Teilchen besetzen können, (z. B. protonierbare Gruppen in einem Protein oder Gitterplätze) | 2.2.1 |
| pH | pH-Wert | 2.1 |
| pK_a | pK_a -Wert | 2.1 |
| pK_i | pK_a -Wert der Gruppe i | 2.2.1 |
| pK_a^{int} | Intrinsischer pK_a -Wert einer Gruppe im Molekül | 2.2.1 |
| pK_a^{mod} | Modellwert für den pK_a , der durch Korrekturen aus dem experimentellen Wert gewonnen wird | 3.2.2 |
| q | Punktladung | 4.1.2 |
| $\mathcal{Q}(s)$ | Zahl der inneren Freiheitsgrade einer Gruppe im Zustand s | 3.1.2 |
| S0 | Elektronischer Grundzustand | 5.2.1 |
| S1 | Elektronisch angeregter Zustand | 5.2.1 |
| \mathbf{s} | Protonierungsvektor eines Proteins | 2.2.1 |
| s_i | Protonierungszustand der Gruppe i | 2.2.1 |
| T | Temperatur | 2.1 |
| W | Wechselwirkungsterm von zwei protonierbaren Gruppen | 3.3 |
| \mathbf{x} | Vektor der den KP-Zustand des Proteins beschreibt | 2.4 |
| \mathfrak{Z} | Zustandssumme des Gesamtsystems | 2.2.2 |
| \mathfrak{Z}_M | M-Teilchen-Zustandssumme eines Systems | 3.1.1 |
| \mathfrak{z} | Zustandssumme eines Untersystems | 3.1.1 |
| $\mathfrak{z}^{\text{konf}}$ | Konformationszustandssumme | 2.2.2 |
| β | $\beta = 1/k_B T$ | 3.1.1 |
| ε | Dielektrizitätskonstante | 4.2 |
| κ | Inverse DEBYE-Länge | 4.2 |
| $\mu, \mu(X)$ | Chemisches Potential allgemein, bzw. einer Spezies X | 2.1 |

| | | |
|----------------------|--|-------|
| Ξ | Großkanonische Zustandssumme | 3.1.1 |
| ρ | Ladungsdichte | 4.2 |
| Φ | Elektrostatistisches Potential | 4.2 |
| Φ^{coul} | COULOMB-Potential | 4.2 |
| Φ^{diel} | Polarisationspotential eines Dielektrikums | 4.2 |
| Φ | Konformationszustand aller Atome, die nicht den P-Zustand bestimmen | 2.4 |
| Φ_i | Konformationsvektor aller Atome der Gruppe i , die nicht den P-Zustand bestimmen | 2.4 |
| φ | Konformationsvektor aller H-Atome, die den P-Zustand des Proteins bestimmen | 2.4 |
| φ_i | Konformationsvektor für das H-Atom, das den P-Zustand der Gruppe i bestimmt | 2.4 |

Anhang C

Einheiten

In der vorliegenden Arbeit haben wir Energien in zwei verschiedenen Einheiten angegeben. Um die gegenseitige Lage von Titrationskurven beschreiben zu können, bieten sich die pK-Einheiten an. Für die numerische Berechnung von Zustandssummen sind $k_B T$ -Einheiten besonders geeignet, da der $1/k_B T$ -Term im BOLTZMANNfaktor nicht berechnet werden muß. Ein weiterer Vorzug dieser Einheiten ist die Möglichkeit, Energiedifferenzen direkt mit der thermischen Energie vergleichen zu können.

Beide Einheitensysteme sind durch die Definition

$$1\text{pK-Einheit} := 1k_B T \ln 10 \tag{C.1}$$

verknüpft. Die $k_B T$ -Einheiten beziehen sich in der vorliegenden Arbeit auf eine Temperatur von $T = 298\text{ K}$ (\approx Raumtemperatur). Daraus folgt der Zusammenhang mit der SI-Einheit:

$$1 k_B T \approx 1.4 \cdot 10^{-21} \text{ J.}$$

Anhang D

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich in den letzten Jahren unterstützt haben und somit zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben. An erster Stelle richtet sich mein Dank an Prof. Sighart Fischer, der nicht nur mein Interesse für das Gebiet der Proteinelektrostatik gefördert hat, sondern mir gleichzeitig die Möglichkeit gegeben hat, meine Untersuchungen an seinem Institut durchzuführen. Seine Diskussionsbereitschaft und Anregungen, die in diese Arbeit eingeflossen sind, haben ebenso zum Gelingen beigetragen, wie seine Unterstützung beim Fertigstellen der Arbeit.

Ganz besonders möchte ich meiner Kollegin Dr. Christina Scharnagl danken, die mich intensiv in die Thematik der Proteinelektrostatik-Rechnungen eingearbeitet hat. Wesentliche Elemente dieser Arbeit haben erst durch zahlreiche Diskussionen mit ihr die endgültige Form erhalten. Christina hat mich auch in dem letzten halben Jahr des Zusammenschreibens in vieler Hinsicht unterstützt. Durch ihren Einsatz beim Schreiben von Berichten und Anträgen sowie dem restlichen Verwaltungskram hat sie mir den Rücken soweit frei gehalten, daß ich die nötige Ruhe zum Erstellen des Manuskripts hatte. Schließlich hat sie unermüdlich meine Entwürfe gelesen und einen tapferen Kampf mit meinen literarischen Ausuferungen und stochastischer Kommaverteilung ausgefochten.

Unserem „König der usepackages“ Dr. Florian Dufey möchte ich für seine Unterstützung in L^AT_EX'nischen Fragen danken. Ich möchte mich aber auch für seine ständige Diskussionsbereitschaft, seine Hilfe bei chemischen Fragen und die gute (Büro-)Nachbarschaft über all die Jahre hinweg bedanken.

Meinen Kollegen Dr. Anatoly Zharikov, Dr. Philipp Scherer und Klaus Grantner möchte ich für die gute Zusammenarbeit und die Unterstützung danken, die ich erfahren habe. Mein Dank gilt aber auch Frau Hintz, die die Sache mit den Verträgen immer so gut im Griff hat und dem Team unserer Physikbibliothek, das mir auch die exotischsten Artikel organisieren konnte.

Wesentlich zum Erfolg einer solchen Arbeit trägt auch ein gutes privates Umfeld bei. Hier möchte ich mich vor allem bei meiner Frau bedanken, die das Manuskript korrekturgelesen und mich die letzten Monate noch ertragen hat. Für diese Geduld möchte ich ihr besonders danken, es war sicher nicht leicht, mit jemandem zusammen zu sein, der nur noch Physik im Kopf hat. Auch bei allen anderen Familienmitgliedern und Freunden möchte ich mich für Unterstützung und Verständnis bedanken.

Nun möchte ich noch einen Dank an die Deutsche Forschungsgemeinschaft aussprechen, die diese Arbeit im Rahmen des SFB's 533 finanziell gefördert hat.

Literaturverzeichnis

- [1] S. McLaughlin. „The electrostatic properties of membranes.“ *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, **18**, 113–136 (1989). 1
- [2] L. Stryer. *Biochemie*. Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg, vierte Auflage (1996). 1, 15, 16, 42, 59, 76
- [3] G. Löffler, P. Petrides, L. Weiss und H. Harper. *Physiologische Chemie: Lehrbuch d. med. Biochemie und Pathobiochemie für Studierende der Medizin und Ärzte*. Springer, Berlin, dritte Auflage (1985). 1
- [4] J. Lanyi. „Bacteriorhodopsin.“ *Biochim. Biophys. Acta-Bioenergetics*, 1–3 (2000). 1
- [5] P. Debye und E. Hückel. „Zur Theorie der Elektrolyte: I. Gefrierpunkts-erniedrigung und verwandte Erscheinungen.“ *Phys. Zeitschr.*, **24**, 185–206 (1923). 2, 8, 51
- [6] R. Zauhar und R. Morgan. „A new method for computing the macromole-
cular electric potential.“ *J. Mol. Biol.*, **186**, 815–820 (1985). 2, 52
- [7] K. Sharp und B. Honig. „Electrostatic interactions in macromolecules:
Theory and applications.“ *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, **19**, 301–
332 (1990). 2, 10, 12, 52, 81
- [8] K. Linderstrøm–Lang. „On the ionisation of proteins.“ *Compt. rend. Lab.
Carlsberg*, **15**, 1–29 (1924). 2
- [9] C. Tanford und J. Kirkwood. „Theory of protein titration curves. I. General
equations for impenetrable spheres.“ *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 5333–5339
(1957). 2, 11, 12, 14
- [10] C. Tanford und R. Roxby. „Interpretation of protein titration curves. Ap-
plication to lysozyme.“ *Biochemistry*, **11**, 2192–2198 (1972). 3
- [11] D. Bashford und M. Karplus. „Multiple–site titration curves of proteins:
An analysis of exact and approximate methods for their calculation.“ *J.
Phys. Chem.*, **95**, 9556–9561 (1991). 3, 113

- [12] M. Gunner und E. Alexov. „A pragmatic approach to structure based calculation of coupled proton and electron transfer in proteins.“ *Biochim. Biophys. Acta-Bioenergetics*, **1458**, 63–87 (2000). 3
- [13] G. Ullmann und E.-W. Knapp. „Electrostatic models for computing protonation and redox equilibria in proteins.“ *Eur. Biophys. J.*, **28**, 533–551 (1999). 3, 13
- [14] J. Wendoloski und J. Matthew. „Molecular dynamics effects on protein electrostatics.“ *Proteins*, **5**, 313–321 (1989). 3
- [15] S. Northrup, T. Wensel, C. Meares, J. Wendoloski und J. Matthew. „Electrostatic field around cytochrome c: Theory and energy transfer experiment.“ *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 9503–9507 (1990). 3
- [16] D. Bashford und M. Karplus. „pK_a's of ionizable groups in proteins: Atomic detail from a continuum electrostatic model.“ *Biochemistry*, **29**, 10219–10225 (1990). 3, 47, 56
- [17] A.-S. Yang und B. Honig. „On the pH dependence of protein stability.“ *J. Mol. Biol.*, **231**, 459–474 (1993). 3, 57
- [18] D. Bashford, D. Case, C. Dalvit, L. Tennant und P. Wright. „Electrostatic calculations of side-chain pK_a values in myoglobin and comparison with NMR data for histidines.“ *Biochemistry*, **32**, 8045–8056 (1993). 3, 60, 87
- [19] J. Antosiewicz, J. McCammon und M. Gilson. „Prediction of pH-dependent properties of proteins.“ *J. Mol. Biol.*, **238**, 415–436 (1994). 3, 47, 55
- [20] T. You und D. Bashford. „Conformation and hydrogen ion titration of proteins: A continuum electrostatic model with conformational flexibility.“ *Biophys. J.*, **69**, 1721–1733 (1995). 3
- [21] E. Alexov und M. Gunner. „Incorporating protein conformational flexibility into the calculation of pH-dependent protein properties.“ *Biophys. J.*, **72**, 2075–2093 (1997). 3, 12, 13, 33, 60, 82, 84, 104
- [22] A.-S. Yang, M. Gunner, R. Sampogna, K. Sharp und B. Honig. „On the calculation of pK_as in proteins.“ *Proteins*, **15**, 252–265 (1993). 4, 37
- [23] S. Russel und A. Warshel. „Calculations of electrostatic energies in proteins. The energetics of ionized groups in bovine pancreatic trypsin inhibitor.“ *J. Mol. Biol.*, **185**, 389–404 (1985). 4
- [24] A. Warshel, F. Sussmann und G. King. „Free energy of charges in solvated proteins: Microscopic calculations using a reversible charging process.“ *Biochemistry*, **25**, 8368–8372 (1986). 4

- [25] D. Prasher. „Using GFP to see the light.“ *Trends in Genetics*, **11**, 320–323 (1995). 5, 63
- [26] T. Misteli und D. Spector. „Applications of the green fluorescent protein in cell biology and biotechnology.“ *Nat. Biotech.*, **15**, 961–964 (1997). 5
- [27] R. Tsien. „The green fluorescent protein.“ *Ann. Rev. Biochem.*, **67**, 509–544 (1998). 5, 63
- [28] M. Zimmer. „Green fluorescent protein (GFP): Applications, structure and related photophysical behavior.“ *Chem. Rev.*, **102**, 759–781 (2002). 5, 63
- [29] P. Atkins. *Physikalische Chemie*. VCH, Weinheim, zweite Auflage (1996). 7, 8, 14, 15
- [30] V. Snoeyink und D. Jenkins. *Water Chemistry*. John Wiley & Sons, New York (1980). 8
- [31] C. Scharnagl, J. Hettenkofer und S. Fischer. „Electrostatic and conformational effects on the proton translocation steps in bacteriorhodopsin: Analysis of multiple M structures.“ *J. Phys. Chem.*, **99**, 7787–7800 (1995). 10
- [32] C. Scharnagl und S. Fischer. „Conformational flexibility of arginine-82 as source for the heterogenous and pH-dependent kinetics of the primary proton transfer step in the bacteriorhodopsin photocycle: An electrostatic model.“ *Chem. Phys.*, **212**, 231–246 (1996). 10
- [33] B. Brooks, R. Bruccoleri, B. Olafson *et al.*. „CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations.“ *J. Comp. Chem.*, **4**, 187–217 (1983). 12, 45, 58, 80, 82
- [34] M. Schaefer, M. Sommer und M. Karplus. „pH-dependence of protein stability: Absolute electrostatic free energy differences between conformations.“ *J. Phys. Chem. B*, **101**, 1663–1683 (1997). 12, 13, 37
- [35] C. Tanford. „Theory of protein titration curves. II. Calculations for simple models at low ionic strength.“ *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 5340–5347 (1957). 14
- [36] E. Alexov und M. Gunner. „Calculated protein and proton motions coupled to electron transfer: Electron transfer from Q_A^- to Q_B in bacterial photosynthetic reaction centers.“ *Biochemistry*, **38**, 8253–8270 (1999). 14, 37, 60

- [37] B. Rabenstein, G. Ullmann und E. Knapp. „Energetics of electron–transfer and protonation reactions of the quinones in the photosynthetic reaction center of *rhodospseudomonas viridis*.“ *Biochemistry*, **37**, 2488–2495 (1998). 14, 60
- [38] P. Beroza, D. Fredkin, M. Okamura und G. Feher. „Electrostatic calculations of amino acid titration and electron transfer, $Q_A^- Q_B \rightarrow Q_A Q_B^-$, in the reaction center.“ *Biophys. J.*, **68**, 2233–2250 (1995). 14, 37, 87
- [39] G. Iversen. *Molecular Electrostatics and Electron Tunnelling in Metalloproteins*. Dissertation, Technical University of Denmark (1998). 14, 60, 84, 85, 104
- [40] R. Luo, M. Head, J. Moulton und M. Gilson. „pK_a shifts in small molecules and HIV protease: Electrostatics and conformation.“ *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 6138–6146 (1998). 14, 35, 60, 70, 71
- [41] D. Bashford und K. Gerwert. „Electrostatic calculations of the pK_a values of ionizable groups in bacteriorhodopsin.“ *J. Mol. Biol.*, **224**, 473–486 (1992). 14, 37
- [42] E. Demchuk, U. Genick, T. Woo, E. Getzoff und D. Bashford. „Protonation states and pH titration in the photocycle of photoactive yellow protein.“ *Biochemistry*, **39**, 1100–1113 (2000). 14
- [43] M. Gilson, J. Given, B. Bush und J. McCammon. „The statistical–thermodynamic basis for computation of binding affinities: A critical review.“ *Biophys. J.*, **72**, 1047–1069 (1997). 15
- [44] M. Born und R. Oppenheimer. „Zur Quantentheorie der Molekeln.“ *Ann. der Physik*, **84**, 457–484 (1927). 15
- [45] M. Born. „Kopplung der Elektronen– und Kernbewegung in Molekeln und Kristallen.“ *Nachr. Akad. Wiss. Göttingen, Math.–Phys. Klasse IIa, Math.-phys.-chem. Abt.: Art. Nr. 6* (1951). 15
- [46] M. Born und K. Huang. *Dynamical theory of crystal lattices*. Clarendon, Oxford (1954). 15
- [47] T. Hill. *An Introduction to Statistical Thermodynamics*. Addison–Wesley, Reading (1962). 19, 20
- [48] I. Bronstein und K. Semendjajew. *Taschenbuch der Mathematik*. Teubner Verlagsgesellschaft, Leipzig, 25. Auflage (1991). 20
- [49] H. Sachs. *Einführung in die Theorie der endlichen Graphen*. Carl Hanser Verlag, München (1971). 31

- [50] R. Raupp-Kossmann und C. Scharnagl. „pK_a shifts for protonation-dependent degrees of freedom.“ *Chem. Phys. Lett.*, **336**, 177–180 (2001). 35
- [51] A. Voityuk, M. Michel-Beyerle und N. Rösch. „Structure and rotation barriers for ground and excited states of isolated chromophore of the green fluorescent protein.“ *Chem. Phys. Lett.*, **296**, 269–276 (1998). 35, 70
- [52] M. Elslinger, R. Wachter, G. Hanson, K. Kallio und S. Remington. „Structural and spectral response of green fluorescent protein variants to changes in pH.“ *Biochemistry*, **38**, 5296–5301 (1999). 35, 75, 103
- [53] K. Pitzer und W. Gwinn. „Energy levels and thermodynamic functions for molecules with internal rotation: I. Rigid frame with attached tops.“ *J. Chem. Phys.*, **10**, 428–440 (1942). 35, 36
- [54] K. Pitzer. „Energy levels and thermodynamic functions for molecules with internal rotation: II. Unsymmetrical tops attached to a rigid frame.“ *J. Chem. Phys.*, **14**, 239–243 (1946). 36
- [55] J. Kilpatrick und K. Pitzer. „Energy levels and thermodynamic functions for molecules with internal rotation. III. Compound rotation.“ *J. Chem. Phys.*, **17**, 1064–1075 (1949). 36
- [56] J. Li und K. Pitzer. „Energy levels and thermodynamic functions for molecules with internal rotation. IV. Extended tables for molecules with small moments of inertia.“ *J. Phys. Chem.*, **60**, 466–474 (1956). 36
- [57] P. Tavan, K. Schulten und D. Oesterhelt. „The effect of protonation and electrical interactions on the stereochemistry of retinal Schiff bases.“ *Biophys. J.*, **47**, 415–430 (1985). 36
- [58] E. Tajkhorshid und S. Suhai. „The dielectric effect of the environment on the pK_a of the retinal Schiff base and on the stabilization of the ion pair in bacteriorhodopsin.“ *J. Mol. Struct.-Theochem.*, **501**, 297–313 (2000). 36
- [59] S. Druckmann, M. Ottolenghi, A. Pande, J. Pande und R. Callender. „Acid-base equilibrium of the Schiff base in bacteriorhodopsin.“ *Biochemistry*, **21**, 4953–4959 (1982). 36
- [60] W. Rüdiger und F. Thümmel. „Phytochrome, the visual pigment of plants.“ *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **30**, 1216–1228 (1991). 36
- [61] A. Xie, W. Hoff, A. Kroon und K. Hellingwerf. „Glu-64 donates a proton to the 4-hydroxycinnamate anion chromophore during the photocycle of photoactive yellow protein.“ *Biochemistry*, **35**, 14671–14678 (1996). 36

- [62] J.-L. Pellequer, K. A. Wagner-Smith, S. Kay und E. D. Getzoff. „Photoactive yellow protein: A structural prototype for the three-dimensional fold of the PAS domain superfamily.“ *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 5884–5890 (1998). 36
- [63] A. Koumanov, H. Rüterjans und A. Karshikoff. „Continuum electrostatic analysis of irregular ionization and proton allocation in proteins.“ *Proteins*, **46**, 85–96 (2002). 37
- [64] R. Sampogna und B. Honig. „Environmental effects on the protonation states of active site residues in bacteriorhodopsin.“ *Biophys. J.*, **66**, 1341–1352 (1994). 37
- [65] M. van der Horst, I. van Stokkum, W. Crielaard und K. Hellingwerf. „The role of N-terminal domain of photoactive yellow protein in the transient partial unfolding during signalling state formation.“ *FEBS Lett.*, **497**, 26–30 (2001). 42
- [66] N. Foloppe und A.D. Mackerell Jr. „All-atom empirical force field for nucleic acids: I. Parameter optimization based on small molecule and condensed phase macromolecular target data.“ *J. Comp. Chem.*, **21**, 86–104 (2000). 45
- [67] S. Weiner, P. Kollman, D. Case *et al.* „A new force field for molecular mechanical simulation of nucleic acids and proteins.“ *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 765–784 (1984). 45
- [68] D. Sitkoff, K. Sharp und B. Honig. „Accurate calculation of hydration free energies using macroscopic solvent models.“ *J. Phys. Chem.*, **98**, 1978–1988 (1994). 45, 48
- [69] W. F. van Gunsteren und H. J. C. Berendsen. *GROMOS Manual*. BIOMOS b.v., Biomolecular Software, Groningen, The Netherlands. 45
- [70] A. Wallquist und G. Karlström. „A new non-empirical force field for computer simulations.“ *Chem. Scr.*, **29A** (1989). 45
- [71] S. J. Weiner, P. A. Kollman, D. T. Nguyen und D. A. Case. „An all atom force field for simulations of proteins and nucleic acids.“ *J. Comp. Chem.*, **7**, 230–252 (1986). 45
- [72] P. Beroza, D. Fredkin, M. Okamura und G. Feher. „Protonation of interacting residues in a protein by a monte carlo method: Application to lysozyme and the photosynthetic reaction center of *rhodobacter sphaeroides*.“ *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 5804–5808 (1991). 47, 60, 61, 104

- [73] J. Antosiewicz, J. McCammon und M. Gilson. „The determinants of pK_{as} in proteins.“ *Biochemistry*, **35**, 7819–7833 (1996). 47, 57
- [74] J. Antosiewicz, J. Briggs, A. Elcock, M. Gilson und J. McCammon. „Computing ionization states of proteins with a detailed charge model.“ *J. Comp. Chem.*, **17**, 1633–1644 (1996). 47, 55
- [75] R. Mulliken. „Electronic population analysis on LCAO–MO molecular wave functions. I.“ *J. Chem. Phys.*, **23**, 1833–1864 (1955). 47
- [76] K. Wiberg und P. Rablen. „Comparison of atomic charges derived via different procedures.“ *J. Comp. Chem.*, **14**, 1504–1508 (1993). 47
- [77] P.-Q. Löwdin. „On the orthogonality problem.“ *Advances in Quantum Chemistry*, **5**, 185–199 (1970). 47
- [78] L. Cusachs und Politzer. „On the problem of defining the charge on an atom in a molecule.“ *Chem. Phys. Lett.*, **1**, 529–531 (1968). 47
- [79] R. Bader. „Atoms in molecules.“ *Acc. Chem. Res.*, **18**, 9–15 (1985). 47
- [80] F. London. „Zur Theorie und Systematik der Molekularkräfte.“ *Z. f. Physik*, **63**, 245–279 (1930). 48
- [81] J. Slater und J. Kirkwood. „The van der Waals forces in gases.“ *Phys. Rev.*, **37**, 682–697 (1931). 48
- [82] M. P. Allen und D. J. Tildesley. *Computer Simulation of Liquids*. Oxford University Press, New York (1987). 48, 49, 61
- [83] E. Neria, S. Fischer und M. Karplus. „Simulation of activation free energies in molecular systems.“ *J. Chem. Phys.*, **105**, 1902–1921 (1996). 48
- [84] C. Böttcher. *Theory of Electric Polarization: Dielectrics in static fields*, Band 1. Elsevier Scientific, Amsterdam, zweite Auflage (1973). 49, 55, 56
- [85] D. J. E. Callaway. „Solvent-induced organization: A physical model of folding myoglobin.“ *Proteins*, **20**, 124–138 (1994). 49
- [86] H. Nakamura und S. Nishida. „Numerical calculation of electrostatic potentials of protein-solvent systems by the self consistent boundary method.“ *J. Phys. Soc. Jpn.*, **56**, 1609–1622 (1987). 49
- [87] A. Kitao, F. Hirata und N. Go. „Effects of solvent on the conformation and the collective motions of a protein. 2. Structure of hydration in mellitin.“ *J. Chem. Phys.*, **97**, 10223–10230 (1993). 49

- [88] M. Born und T. von Karman. „Über Schwingungen in Raumgittern.“ *Z. f. Physik*, **13**, 297–309 (1912). 49
- [89] C. L. Brooks III, M. Karplus und B. M. Pettitt. *Proteins: A Theoretical Perspective of Dynamics, Structure and Thermodynamics*. John Wiley & Sons, New York (1988). 49
- [90] A. Warshel und M. Levitt. „Theoretical studies of enzymic reactions: Dielectric, electrostatic and steric stabilization of the carbonium ion in the reaction of lysozyme.“ *J. Mol. Biol.*, **103**, 227–249 (1976). 49
- [91] A. Warshel und S. T. Russell. „Calculations of electrostatic interactions in biological systems and in solutions.“ *Quart. Rev. Biophys.*, **17**, 283–422 (1984). 49, 55
- [92] A. Brünger, C. L. Brooks und M. Karplus. „Stochastic boundary conditions for molecular dynamics simulations of st2 water.“ *Chem. Phys. Lett.*, **105**, 495–500 (1984). 49
- [93] W. F. van Gunsteren und H. J. C. Berendsen. „Computer simulation of molecular dynamics: Methodology, applications, and perspectives in chemistry.“ *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **29**, 992–1023 (1990). 49
- [94] H. Sklenar, F. Eisenhaber, M. Poncin und R. Lavery. „Including solvent and counterion effects in the force field of macromolecular mechanics: The field integrated electrostatic approach (FIESTA).“ In D. L. Beveridge und R. Lavery (Hg.), „Theoretical Biochemistry & Molecular Biophysics,“ 317–335. Adenine Press, New York (1990). 49
- [95] D. Beglov und B. Roux. „Finite representation of an infinite bulk system: Solvent boundary potential for computer simulations.“ *J. Chem. Phys.*, **100**, 9050–9063 (1994). 49
- [96] B. Zimm und M. L. Bret. „Counterion condensation and system dimensionality.“ *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **1**, 461–471 (1983). 52
- [97] G. Gouy. „Sur la constitution de la charge électrique à la surface d’un électrolyte.“ *J. Phys. Radium*, **9**, 457–468 (1910). 52
- [98] D. Chapman. „A contribution to the theory of electrocapillarity.“ *Philos. Mag.*, **25**, 475–481 (1913). 52
- [99] G. Iversen, Y. Kharkats und J. Ulstrup. „Simple dielectric image charge models for electrostatic interactions in metalloproteins.“ *Mol. Phys.*, **94**, 297–306 (1998). 52

- [100] J. Warwicker und H. Watson. „Calculation of the electric potential in the active site cleft due to α -helix dipoles.“ *J. Mol. Biol.*, **157**, 671–679 (1982). 52
- [101] A. Nichols und B. Honig. „A rapid finite difference algorithm, utilizing successive over-relaxation to solve the Poisson–Boltzmann equation.“ *J. Comp. Chem.*, **12**, 435–445 (1991). 52
- [102] M. Davis. „The inducible multipole solvation model: A new model for solvation effects on solute electrostatics.“ *J. Chem. Phys.*, **100**, 5149–5159 (1994). 52
- [103] T. You und S. Harvey. „Finite element approach to the electrostatics of macromolecules with arbitrary geometries.“ *J. Comp. Chem.*, **14**, 484–501 (1993). 52
- [104] M. Davis und J. McCammon. „Solving the finite difference linearized Poisson–Boltzmann equation: A comparison of relaxation and conjugate gradient methods.“ *J. Comp. Chem.*, **10**, 386–391 (1989). 52
- [105] H. Oberoi und N. Allewell. „Multigrid solution of the nonlinear Poisson–Boltzmann equation and calculation of titration curves.“ *Biophys. J.*, **65**, 48–55 (1993). 52
- [106] M. Gilson, K. Sharp und B. Honig. „Calculating the electrostatic potential of molecules in solution: Method and error assessment.“ *J. Comp. Chem.*, **9**, 327–335 (1987). 52, 81
- [107] M. Connolly. „Solvent-accessible surface of proteins and nucleic acids.“ *Science*, **221**, 709–713 (1983). 52
- [108] K. Sharp und A. Nicholls. *DelPhi — A Macromolecular Electrostatics Modelling Package. Manual for version 3.0* (1989). 52, 53, 81
- [109] I. Klapper, R. Hagstrom, R. Fine, K. Sharp und B. Honig. „Focusing of electric fields in the active site of Cu-Zn superoxid dismutase: Effects of ionic strength and amino-acid modification.“ *Proteins*, **1**, 47–59 (1986). 53, 81
- [110] W. Moore und D. Hummel. *Physikalische Chemie*. Walter de Gruyter, Berlin, zweite Auflage (1976). 53
- [111] J. Jackson. *Klassische Elektrodynamik*. Walter de Gruyter, Berlin (1983). 55
- [112] S. Bone und R. Pethig. „Dielectric studies of the binding of water to lysozyme.“ *J. Mol. Biol.*, **157**, 571–575 (1982). 55

- [113] R. Pethig. *Dielectric and electronic properties of biological materials*. J. Wiley, New York (1979). 55
- [114] L. Krishtalik, A. Kuznetsov und E. Mertz. „Electrostatics of proteins: Description in terms of two dielectric constants simultaneously.“ *Proteins*, **28**, 174–182 (1997). 55
- [115] S. Takashima und H. Schwan. „Dielectric dispersion of crystalline powders of amino acids, peptides and proteins.“ *J. Phys. Chem.*, **69**, 4176–4182 (1965). 55
- [116] H. Nakamura, T. Sakamoto und A. Wada. „A theoretical study of the dielectric constant of protein.“ *Protein Engineering*, **2**, 177–183 (1988). 55
- [117] P. Smith, R. Brunne, A. Mark und W. van Gunsteren. „Dielectric properties of trypsin–inhibitor and lysozyme calculated from molecular–dynamics simulations.“ *J. Phys. Chem.*, **97**, 2009–2014 (1993). 55
- [118] S. Harvey. „Treatment of electrostatic effects in macromolecular modelling.“ *Proteins*, **5**, 78–92 (1989). 55
- [119] T. Simonson und D. Perahia. „Internal and interfacial dielectric properties of cytochrome *c* from molecular dynamics in aqueous solution.“ *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 1082–1086 (1995). 55
- [120] C. Schutz und A. Warshel. „What are the dielectric “constants” of proteins and how to validate electrostatic models?“ *Proteins*, **44**, 400–417 (2001). 55
- [121] A. Baptista und C. Soares. „Some theoretical and computational aspects of the inclusion of proton isomerism in the protonation equilibrium of proteins.“ *J. Phys. Chem. B*, **105**, 293–309 (2001). 55, 60
- [122] E. Demchuck und R. Wade. „Improving the continuum dielectric approach to calculating pK_as of ionizable groups in proteins.“ *J. Phys. Chem.*, **100**, 17373–17387 (1996). 55
- [123] T. Simonson, D. Perahia und G. Bricogne. „Intramolecular dielectric screening in proteins.“ *J. Mol. Biol.*, **218**, 859–886 (1992). 55
- [124] T. Simonson und D. Perhia. „Microscopic dielectric properties of cytochrome *c* from molecular dynamics simulation in aqueous solution.“ *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 7987–8000 (1995). 55
- [125] T. Simonson und C. Brooks. „Charge separation and the dielectric constant of proteins: insight from molecular dynamics.“ *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 8452–8458 (1996). 55

- [126] Cantor und Schimmel. *Techniques for the study of biological structure and function*, Band 2. Freeman, USA (1980). 56
- [127] A. Ostermann, I. Tanaka, N. Engler, N. Niimura und F. Parak. „Hydrogen and deuterium in myoglobin as seen by a neutron structure determination at 1.5Å resolution.“ *Biophys. Chem.*, **95**, 183–193 (2002). 56
- [128] K. Brejc, T. Sixma, P. Kitts *et al.* „Structural basis for dual excitation and photoisomerization of the *aequorea victoria* green fluorescent protein.“ *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 2306–2311 (1997). 56, 66, 68, 71, 75, 87, 89
- [129] G. D. Buono, F. Figueirisco und R. Levy. „Intrinsic pK_as of ionizable residues in proteins: An explicit solvent calculation for lysozyme.“ *Proteins*, **20**, 85–97 (1994). 57
- [130] Y. Sham, Z. Chu und A. Warshel. „Consistent calculations of pK_a's of ionizable residues in proteins: Semi-microscopic and microscopic approaches.“ *J. Phys. Chem. B*, **101**, 4458–4472 (1997). 57
- [131] A. Baptista, P. Martel und S. Petersen. „Simulation of protein conformational freedom as a function of pH: Constant-pH molecular dynamics using implicit titration.“ *Proteins*, **27**, 523–544 (1997). 57
- [132] H. Vlijmen, M. Schaefer und M. Karplus. „Improving the accuracy of protein pK_a calculations: Conformational averaging versus the average structure.“ *Proteins*, **33**, 145–158 (1998). 57
- [133] K. Ball und R. Berry. „Dynamics on statistical samples of potential energy surfaces.“ *J. Chem. Phys.*, **111**, 2060–2070 (1999). 57
- [134] S. Wlodek, J. Antosiewicz und J. McCammon. „Prediction of titration properties of structures of a protein derived from molecular dynamics trajectories.“ *Protein-Science*, **6**, 373–382 (1997). 57
- [135] R. Schmidt und J. Brickmann. „Molecular dynamics simulation of the proton transport in water.“ *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, **101**, 1816–1827 (1997). 57
- [136] M. Lill und V. Helms. „Molecular dynamics simulation of proton transport with quantum mechanically derived proton hopping rates (Q-HOP MD).“ *J. Chem. Phys.*, **115**, 7993–8005 (2001). 57
- [137] M. Lill und V. Helms. „Proton shuttle in green fluorescent protein studied by dynamics simulations.“ *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 2778–2781 (2002). 57

- [138] S. Billeter und W. van Gunsteren. „Computer simulation of proton transfer of small acids in water.“ *J. Phys. Chem. A*, **104**, 3276–3286 (2000). 57
- [139] S. Lovell, J. Word, J. Richardson und D. Richardson. „The penultimate rotamer library.“ *Proteins*, **40**, 389–408 (2000). 57
- [140] J. Ponder und F. Richards. „Tertiary templates for proteins — use of packing criteria in the enumeration of allowed sequences for different structural classes.“ *J. Mol. Biol.*, **193**, 775–791 (1987). 57
- [141] B. Gelin und M. Karplus. „Side-chain torsional potentials — effect of dipeptide, protein, and solvent environment.“ *Biochemistry*, **18**, 1256–1268 (1979). 57
- [142] R. Dunbrack und M. Karplus. „Conformational-analysis of the backbone-dependent rotamer preferences of protein side-chains.“ *Nat. Struct. Biol.*, **1**, 334–340 (1994). 57
- [143] F. Eisenmenger, P. Argos und R. Abagyan. „A method to configure protein side-chains from the main-chain trace in homology modelling.“ *J. Mol. Biol.*, **231**, 849–860 (1993). 58
- [144] A. Roitberg und R. Elber. „Modelling side-chains in peptides and proteins — application of the locally enhanced sampling and the simulated annealing methods to find minimum energy conformations.“ *J. Chem. Phys.*, **95**, 9277–9287 (1991). 58
- [145] R. Chandrasekaran und G. Ramachandran. „Studies on conformation of amino acids. 11. Analysis of observed sidegroup conformations in proteins.“ *Int. J. Prot. Res.*, **2**, 223–233 (1970). 58
- [146] M. Glick, A. Rayan und A. Golblum. „A stochastic algorithm for global optimization and for best populations: A test case of side chains in proteins.“ *PNAS*, **99**, 703–708 (2002). 58, 60
- [147] K. Lindauer, C. Bendic und J. Sühnel. „Hbexplore— a new tool for identifying and analyzing hydrogen bonding patterns in biological macromolecules.“ *Comp. Appl. Biosci.*, **12**, 281–289 (1996). 59
- [148] N. Metropolis und S. Ulam. „The monte carlo method.“ *Amer. Stat. Assoc.*, **44**, 335–341 (1949). 60
- [149] M. Gilson. „Multiple-site titration and molecular modeling: Two rapid methods for computing energies and forces for ionizable groups in proteins.“ *Proteins*, **15**, 266–282 (1993). 60

- [150] P. Beroza und D. Case. „Including side chain flexibility in continuum electrostatic calculations of protein titration.“ *J. Phys. Chem.*, **100**, 20156–20163 (1996). 60
- [151] A. Baptista, P. Martel und C. Soares. „Simulation of electron–proton coupling with a monte carlo method: Application to cytochrome c_3 using continuum electrostatics.“ *Biophys. J.*, **76**, 2978–2998 (1999). 60
- [152] B. Rabenstein, G. Ullmann und E. Knapp. „Electron transfer between the quinones in the photosynthetic reaction center and its coupling to conformational changes.“ *Biochemistry*, **39**, 10487–10496 (2000). 60
- [153] N. Metropolis, A. Rosenbluth, M. Rosenbluth, A. Teller und E. Teller. „Equation of state calculations by fast computing machines.“ *J. Chem. Phys.*, **21**, 1087–1092 (1953). 60
- [154] H. Römer und T. Filk. *Statistische Mechanik*. VCH, Weinheim, New York (1994). 60
- [155] K. Binder und D. Heermann. *Monte Carlo Simulation in Statistical Physics*. Springer, Heidelberg (1997). 61, 104
- [156] D. Chandler. *Introduction to Modern Statistical Mechanics*. Oxford University Press, New York (1987). 61, 107
- [157] A. Leach. *Molecular Modelling: Principles and Applications*. Prentice Hall, Harlow, zweite Auflage (2001). 61
- [158] M. Head, J. Given und M. Gilson. „“Mining Minima”: Direct computation of conformational free energy.“ *J. Phys. Chem. A*, **101**, 1609–1618 (1997). 62
- [159] J. Schnakenberg. *Algorithmen in der Quantentheorie und Statistischen Physik*. Zimmermann–Neufang, Ulmen (1995). 62
- [160] O. Shimomura, F. Johnson und Y. Saiga. „Extraction, purification, and properties of *aequorin*, a bioluminescent protein from the luminous hydro-medusa, *aequorea*.“ *J. Cell. Comp. Physiol.*, **59**, 223–239 (1962). 63
- [161] F. Johnson, O. Shimomura, Y. Saiga *et al.* „Quantum efficiency of cypridina luminescence, with a note on that of *aequorea*.“ *J. Cell. Comp. Physiol.*, **60**, 85–104 (1963). 63
- [162] J. Morin und J. Hastings. „Energy transfer in a bioluminescent system.“ *J. Cell. Physiol.*, **77**, 31–318 (1971). 63

- [163] H. Morise, O. Shimonura, F. Johnson und J. Winant. „Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of *aequorea*.“ *Biochemistry*, **13**, 2656–2662 (1974). 63
- [164] W. Ward. „Energy transfer processes in bioluminescence.“ *Photochem. Photobiol. Rev.*, **4**, 1–57 (1979). 63
- [165] R. Heim, D. C. Prasher und R. Y. Tsien. „Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein.“ *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 12501–12504 (1994). 63, 64
- [166] M. Chalfie, Y. Tu, G. Euskirchen, W. Ward und D. Prasher. „Green fluorescent protein as a marker for gene expression.“ *Science*, **263**, 802–805 (1994). 63
- [167] J. Kahana, B. Schapp und P. Silver. „Kinetics of spindle pole body separation in budding yeast.“ *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 9707–9711 (1995). 63
- [168] A. Amsterdam, S. Lin, L. Moss und N. Hopkins. „Requirements for green fluorescent protein detection in transgenic zebrafish embryos.“ *Gene.*, **173**, 99–103 (1996). 63
- [169] B. Ludin, T. Doll, R. Meili, S. Kaech und A. Matus. „Application of novel vectors for GFP-tagging of proteins to study microtubule-associated proteins.“ *Gene.*, **173**, 107–111 (1996). 63
- [170] A. Flügel, F. Schwaiger, H. Neumann *et al.* „Neuronal FasL induces cell death of encephalitogenic T lymphocytes.“ *Brain Pathol.*, **10**, 353–364 (2000). 63
- [171] J. Priller, A. Flügel, T. Wehner *et al.* „Targeting gene-modified hematopoietic cells to central nervous system: Use of green fluorescent protein uncovers microglial engraftment.“ *Nature Med.*, **7**, 1356–1361 (2001). 63
- [172] D. Prasher, V. Eckenrode, W. Ward, F. Prendergast und M. Cormier. „Primary structure of the *aequorea victoria* green fluorescent protein.“ *Gene.*, **111**, 229–233 (1992). 64
- [173] M. Ormö, A. B. Cubitt, K. Kallio *et al.* „Crystal structure of the *aequorea victoria* green fluorescent protein.“ *Science*, **273**, 1392–1395 (1996). 64, 75, 102, 103
- [174] F. Yang, L. Moss und G.R. Phillips Jr. „The molecular structure of green fluorescent protein.“ *Nature Biotechnol.*, **14**, 1246–1251 (1996). 64, 75, 120

- [175] A. Cubitt, R. Heim, S. Adams *et al.*. „Understanding, improving and using green fluorescent proteins.“ *Trends Biochem. Sci.*, **20**, 448–455 (1995). 64
- [176] R. M. Wachter, B. A. King, R. Heim *et al.*. „Crystal structure and photodynamic behaviour of the blue emission variant Y66H/Y145F of green fluorescent protein.“ *Biochemistry*, **36**, 9759–9765 (1997). 65, 75
- [177] A. Bell, X. He, R. Wachter und P. Tonge. „Probing the ground state structure of the green fluorescent protein chromophore using Raman spectroscopy.“ *Biochemistry*, **39**, 4423–4431 (2000). 65, 69, 72
- [178] A. Esposito, P. Schellenberg, W. Parson und P. Reid. „Vibrational spectroscopy and mode assignments for an analog of the green fluorescent protein chromophore.“ *J. Mol. Struct.*, **569**, 25–41 (2001). 65
- [179] P. Schellenberg, E. Johnson, A. Esposito, P. Reid und W. Parson. „Resonance Raman scattering by the green fluorescent protein and an analogue of its chromophore.“ *J. Phys. Chem. B*, **105**, 5316–5322 (2001). 65
- [180] B. Terry, E. Matthews und J. Haseloof. „Molecular characterisation of recombinant green fluorescent protein by fluorescence correlation spectroscopy.“ *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **217**, 21–27 (1995). 65, 66
- [181] W. Ward, C. Cody, R. Hart und M. Cormier. „Spectrophotometric identity of the energy-transfer chromophores in *renilla* and *aequorea* green-fluorescent proteins.“ *Photochem. Photobiol.*, **31**, 611–615 (1980). 66
- [182] W. W. Ward, H. J. Prentice, A. F. Roth, C. W. Cody und S. C. Reeves. „Spectral perturbations of the *aequoria* green-fluorescent protein.“ *Photochem. Photobiol.*, **35**, 803–808 (1982). 66
- [183] G. Palm, A. Zdanov, G. Gaitanaris *et al.*. „The structural basis for spectral variations in green fluorescent protein.“ *nat. struc. biol.*, **4**, 361–365 (1997). 66, 75, 89, 120
- [184] A. A. Voityuk, M.-E. Michel-Beyerle und N. Rösch. „Protonation effects on the chromophore of green fluorescent protein. Quantum chemical study of absorption spectrum.“ *Chem. Phys. Lett.*, **272**, 162–167 (1997). 66
- [185] G. von Büнау und T. Wolff. *Photochemie: Grundlagen, Methoden, Anwendungen*. VCH, Weinheim (1987). 66
- [186] M. Chatteraj, B. A. King, G. Bublitz und S. Boxer. „Ultra-fast excited state dynamics in green fluorescent protein: Multiple states and proton transfer.“ *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 8362–8367 (1996). 66, 67

- [187] H. Lossau, A. Kummer, R. Heinecke *et al.*. „Time-resolved spectroscopy of wild-type and mutant green fluorescent proteins reveals excited state deprotonation consistent with fluorophore-protein interactions.“ *Chem. Phys.*, **213**, 1–16 (1996). 66, 119, 120
- [188] T. Creemers, A. Lock, V. S. ans T.M. Jovin und S. Völker. „Three photoconvertible forms of green fluorescent protein identified by spectral hole-burning.“ *Nat. Struct. Biol.*, **6**, 557–560 (1999). 66
- [189] T. Creemers, A. Lock, V. Subramaniam, T. Jovin und S. Völker. „Photophysics and optical switching in green fluorescent protein mutants.“ *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 2974–2978 (2000). 66
- [190] S. Bokman und W. Ward. „Renaturation of *aequorea* green-fluorescent protein.“ *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **101**, 1372–1380 (1981). 67, 68
- [191] M. Thompson und M. Zerner. „A theoretical examination of the electronic structure and spectroscopy of the photosynthetic reaction center from *rhodospseudomonas viridis*.“ *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 8210–8215 (1991). 68
- [192] H. Niwa, S. Inouye, T. Hirano *et al.*. „Chemical nature of the light emitter of the *aequorea* green fluorescent protein.“ *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 13617–13622 (1996). 69
- [193] C. Lim, D. Bashford und M. Karplus. „Absolute pK_a calculations with continuum dielectric methods.“ *J. Phys. Chem.*, **95**, 5610–5620 (1991). 70
- [194] G. Schüürmann. „Modelling pK_a of carboxylic acids and chlorinated phenols.“ *Quant. Struct. -Act. Rel.*, **15**, 121–132 (1996). 70
- [195] J. Stewart. *MOPAC 93 Manual*. Fujitsu Limited, Tokyo, Japan. 70
- [196] C. Scharnagl und R. Raupp-Kossmann. „Solution pK_as of the green fluorescent protein chromophore from hybrid quantum-classical calculations.“ (2002). Zur Veröffentlichung eingereicht. 70
- [197] A. East und L. Radom. „Ab initio statistical thermodynamical models for the computation of third-law entropies.“ *J. Chem. Phys.*, **106**, 6655–6674 (1997). 70
- [198] W. Press, S. Teukolsky, W. Vetterling und B. Flannary. *Numerical Recipes in C: The Art of Scientific Computing*. Cambridge University Press, Cambridge, zweite Auflage (1996). 72, 105

- [199] R. Stewart. *The Proton: Applications to organic chemistry*. Academic Press, Orlando (1985). 73, 87
- [200] K. Winkler, J. Lindner, V. Subramaniam, T. Jovin und P. Vöhringer. „Ultrafast dynamics in the excited state of green fluorescent protein (wt) studied by frequency-resolved femtosecond pump-probe spectroscopy.“ *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **4**, 1072–1081 (2002). 73
- [201] V. Helms, C. Winstead und P. Langhoff. „Low-lying electronic excitations of the green fluorescent protein chromophore.“ *J. Mol. Struct.-Theochem.*, **506**, 179–189 (2000). 74
- [202] W. Kabsch. „A solution for the best rotation to relate two sets of vectors.“ *Acta Cryst. A*, **32**, 922–923 (1976). 75
- [203] J. van Thor, A. Pierik, I. Nugteren-Roodzant, A. Xie und K. Hellingwerf. „Characterization of the photoconversion of green fluorescent protein with FTIR spectroscopy.“ *Biochemistry*, **37**, 16915–16921 (1998). 75
- [204] R. Sedgewick. *Algorithmen in C*. Addison-Wesley, Bonn (1992). 77
- [205] J. Nielsen, K. Andersen, B. Honig *et al.* „Improving macromolecular electrostatics calculations.“ *Prot. Eng.*, **12**, 657–662 (1999). 78
- [206] M. Gilson und B. Honig. „Calculation of the total electrostatic energy of a macromolecular system – solvation energies, binding energies, and conformational analysis.“ *Proteins*, **4**, 7–18 (1988). 81
- [207] M. Tanokura. „H-NMR study on the tautomerism of the imidazole ring of histidine residues I. microscopic pK values and molar ratios of tautomers in histidine-containing peptides.“ *Biochim. Biophys. Acta*, **742**, 576–585 (1983). 87
- [208] F. Blomberg, W. Maurer und H. Rüterjans. „Nuclear magnetic resonance investigation of ¹⁵N-labeled histidine in aqueous solution.“ *J. Am. Chem. Soc.*, **99**, 8149–8159 (1977). 87
- [209] J. Roberts, C. Yu, C. Flanagan und T. Birdseye. „A nitrogen-15 nuclear magnetic resonance study of the acid-base and tautomeric equilibria of 4-substituted imidazoles and its relevance to the catalytic mechanism of α -lytic protease.“ *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 3945–3949 (1982). 87
- [210] D. Blow und T. Steitz. „X-ray diffraction studies of enzymes.“ *Ann. Rev. Biochem.*, **39**, 63–100 (1970). 87

- [211] G. Robillar und R. Shulman. „High-resolution nuclear magnetic-resonance studies of active-site of chymotrypsin .1. Hydrogen-bonded protons of charge relay system.“ *J. Mol. Biol.*, **86**, 519–540 (1974). 87
- [212] W. Bachovchin und J. Robert. „N-15 nuclear magnetic resonance spectroscopy — state of histidine in catalytic triad of alpha-lytic protease — implications for charge-relay mechanism of peptide-bond cleavage by serine proteases.“ *J. Am. Chem. Soc.*, **100**, 8041–8047 (1978). 87
- [213] M. Rosenbluth und A. Rosenbluth. „Monte carlo calculation of the average extension of molecular chains.“ *J. Chem. Phys.*, **23**, 356–359 (1955). 107
- [214] H. Meschkowski. *Wahrscheinlichkeitsrechnung*. B.I.-Wissenschaftsverlag, Mannheim (1968). 114
- [215] C. Dempsey. „Hydrogen exchange in peptides and proteins using NMR spectroscopy.“ *Progr. Nucl. Magn. Res. Spect.*, **39**, 135–170 (2001). 119
- [216] P. Karlson. *Kurzes Lehrbuch der Biochemie*. Thieme Verlag, Stuttgart, 12. Auflage (1984). 129