

## APPENDIX A

### Abstract

In present work, the electrostatic interactions governing the electron transfer (ET) processes in several proteins with redox-active cofactors were investigated theoretically. For these purposes, several methods were combined and applied to elucidate the function of a number of protein systems. Our attention was focused on calculating the energetics of the protonation and oxidation processes in redox-active proteins. The coupling between protonation and electron transfer reactions was studied by using a continuum electrostatic method. The heme-proteins that have axially coordinated histidines to the heme iron, as for instance the mitochondrial cytochrome  $bc_1$  ( $Cbc_1$ ) protein complex involved in the respiratory electron transport chain and the artificial cytochrome  $b$  (Cb) were studied. The protonation and redox behavior of several other cofactors and redox-active residues in DNA photolyase were also investigated. The modeling and the molecular dynamics (MD) of the artificial as well as for the native Cb was performed. The results of the theoretical work presented here, are divided into three mutually related parts.

Factors determining the orientations of imidazole axially coordinated to heme were investigated by analyzing 693 hemes in 432 crystal structures of heme-proteins from the Protein Data Bank (PDB). By searching in the PDB database, we monitored the orientation of coordinated histidine relative to heme and relative to the second histidine (in bis-histidine ligated hemes). We also explored the orientation of axially ligated imidazoles with respect to their histidine backbone conformation and the position and orientation of the histidine backbone relative to the heme plane. In our approach, we also analyzed the influence of the hydrogen bonding pattern of imidazoles axially coordinated to heme. The results from a search of the PDB protein structures were interpreted by evaluating the corresponding relevant interactions with molecular force field computations. Our investigation showed that the preferred orientation of the  $N\delta H$  group of imidazole ligated to heme is toward the propionic groups, indicating the existence of an attractive interaction of imidazole with the propionates. The imidazole adopts also a preferred orientation with respect to its histidine backbone, where the imidazole ring is orthogonal to the plane defined by the  $C\alpha$ - $C\beta$  and  $C\beta$ - $C\gamma$  bonds of the histidine. This interaction prohibits conformations, where the imidazole plane is oriented parallel to the  $C\alpha$ - $C\beta$  bond of its histidine backbone. Considering these two influences that are mainly of electrostatic nature, we were able to explain the orientation of axially coordinated imidazoles for all families of heme-proteins, except for the group of cytochrome  $c$  peroxidase. Since the  $N\delta H$  group of imidazole ligated to heme can assume a number of H-bonds that differ from the native one and changes in the hydrogen bonding scheme involving the ligated imidazole (in mutants) do not change the orientation of the imidazole significantly, we concluded that H-bonds have a role in fine tuning the imidazole orientation. In some cases, a strong hydrogen bond of the imidazole  $N\delta H$  group with negatively charged acidic residue can also be decisive, as for instance in the group of cytochrome  $c$  peroxidase. Since, the protein determines the conformations of the propionic acids and of the histidine backbone it indirectly applies a significant influence on the conformations of histidines coordinated to heme.

An important contribution made with this doctoral work was the procedure to generate the atomic coordinates of the model structure of an artificial protein from scratch, by using a sophisticated modeling technique with stepwise energy relaxation. This quite new approach was applied on the *de novo* synthetic protein recently synthesized by Rau & Haehnel (1998), which mimics the central part of the four-helix bundle of the native cytochrome  $b$ . The

stability of the computer generated structure was tested by monitoring the conformational changes and fluctuations during a long-term molecular dynamics simulation and by comparing the results with values obtained from the crystal structure of a native Cb. The results of the MD simulations suggest that the modeled structure is stable and strain free. Since, the RMS deviations in MD simulations of the artificial protein are as small as the one obtained from the native Cb, we concluded that the structural stability of the artificial Cb is similar to stability of the native Cb.

The protonation and oxidation probabilities of titratable groups were computed simultaneously by the continuum electrostatic method, solving the linearized Poisson-Boltzmann equation (LPBE) numerically on a grid with a subsequent Monte Carlo titration of all titratable groups in the protein. In this work, the complete charge distribution of the neutral and charged forms of each ionizable group is specifically incorporated, what is extremely important for the correct treatment of salt bridges. Quantum-chemical computations were carried out for each bis-imidazole-heme system yielding atomic partial charges that represent faithfully the electrostatic potentials of these redox-active groups in their neighborhood. The theoretical frame work applied here allows to calculate protonation and oxidation patterns of proteins as a function of pH and redox potential of the solution. There are several theoretical studies available that considered redox proteins and the electron transfer processes occurring in them. In these studies, energy differences between the different oxidation states occurring during the electron transfer were computed. However, the influence of solvent redox potential was always neglected. The electrostatic calculations implemented here, evaluate the redox potentials of redox-active cofactors and take into account the external redox potential of the solvent. The existent method was extended to perform the redox titration of a protein, by varying the solution potential and keeping the pH value constant. In this way, I obtained valuable insights about the function of redox centers in proteins.

Thus, the coupling between electron and proton transfer in proteins, which is of the electrostatic nature was studied. The pH dependence of the redox potentials in proteins (the so-called redox-Bohr effect) was investigated using the available methods. The redox Bohr effect seems to be associated with changes in the protonation states of charged residues in the protein occurring with reduction or oxidation. Such protein systems can transfer electrons and protons in a concerted manner. In essence, this phenomenon corresponds to a redox potential shift that occurs with a change in pH value. Additionally, the different redox states of cofactors in a protein may implicate different  $pK_a$  values of titratable residues. This feature indicates in electron carriers the occurrence of a cooperative linkage between ET by the redox-active group and proton transfer by ionizable groups.

Here, I applied the continuum electrostatic approach on the artificial and native Cb to examine the titration behavior of ionizable residues, to evaluate the redox potential of the hemes and to study phenomena related to the Bohr effect. The factors that determine the redox potential of the two hemes in the artificial Cb were analyzed in terms of the influence of different structural parts, enabling us to understand how the protein environment tunes the redox potentials of cofactors. In order to investigate the energetics of the photoactivation process, and to determine the redox potential of different redox pairs (tryptophans, tyrosines, FAD) involved in electron and proton transfer reactions in the DNA photolyase from *E. coli*, the same approach was applied there. An empirical expression (based on the Marcus theory) was used to estimate the rates of ET reactions. Good agreement between calculated and experimentally observed titration behavior and the reaction rates, suggests that the applied theoretical method captures most of the electrostatic behavior in these systems, even though it ignores conformational fluctuations and the differences in the average structures that may exist between crystal and solution. It also indicates that electrostatic interactions are the most relevant for these protein systems, while non-electrostatic interactions that are theoretically less easy accessible, play a minor role.

In my future work, I am going to improve the underlying methods and to apply them on several related systems. Some of these works are currently in progress, and we expect to gain further useful insights. By using the same approach as for the DNA photolyase from *Escherichia coli*, we are investigating the photoactivation process in photolyase from *Anacystis nidulans* (Winkelmann et al., 2001). Since, the exact radical transfer pathway is experimentally still not known, we hope that our results can help to answer the question which tryptophan and tyrosine residues are involved in the photoactivation process.

Using the above outlined modeling procedure, the atomic coordinates of similar template-assembled synthetic proteins can also be generated. A whole bank of 400 such mutants, containing one heme incorporated in the four-helix bundle, is available (Rau et al., 2000) and their redox potentials have been measured. I generated the atomic coordinates of 25 mutant structures, and evaluated the redox potentials of the hemes whose values correlate well with experiments. My final aim is to find the factors influencing the changes in the heme redox potential in different mutants. Our preliminary results indicate that this is a promising task (Popović & Knapp, 2001).

Part of this doctoral work deals with proteins containing the bis-histidine heme systems (*b*-type). Already for such systems a couple of problems had to be solved in order to evaluate the redox potentials appropriately. It is already a major problem to get proper atomic partial charges. This is connected with the technical problem how one can treat the redox-active part of heme and titratable propionates simultaneously. Additionally, the standard redox potential of the model compound has to be chosen appropriately. Because of that, evaluating the redox potentials of the histidine-methionine heme systems and of the *c*-type of hemes (containing also two covalently bound cysteines to the heme) poses additional difficulties. Such heme systems appear in the bacterial photosynthetic reaction center. Preliminary results for these systems (Voigt et al., 2001) show that by using the same principles, one can also here get good agreement with experiments.

Introducing new methods, combining and improving currently used methods as well as using the increasing knowledge from crystal structures, can give us further and deeper insights in the relationship between protein structure and function. The theoretical investigations presented here, can help to better understand experimental results. However, since these methods possess the power to predict the behavior of cofactors in proteins, they can also help experimentalists to design synthetic proteins and guide new experiments.

## APPENDIX B

### Zusammenfassung (German abstract)

In dieser Arbeit wurde redoxaktive Kofaktoren, die an Elektronentransferprozesse (ET) in Proteinen beteiligt sind durch Berechnung der elektrostatischen Energien untersucht. Zu diesem Zweck wurden mehrere Methoden in Kombination angewendet, um die Funktion einer Reihe von Proteinen zu untersuchen. Das Hauptaugenmerk war dabei auf die Berechnung der Energien der Protonierungs- und Oxidationsreaktionen in Redoxproteinen gerichtet. Die Kopplungen zwischen Protonierungs- und Elektronentransferreaktionen wurde mit Methoden der elektrostatischen Kontinuum untersucht. Häm-Proteine, in denen die Histidine axial an das Häm-Eisen koordinieren, wie zum Beispiel das mitochondriale Cytochrom bc<sub>1</sub> (Cbc<sub>1</sub>), das in der Atmungskette am Elektronentransport beteiligt ist, und das künstliche Cytochrom b (Cb) wurden untersucht. Das Protonierungs- und Redoxverhalten von Flavin, Tryptophanen und Tyrosin in DNA Photolyase wurde ebenfalls untersucht. Sowohl das künstliche als auch das native Cytochrom Cb wurden zuerst modelliert und dann einer Molekulardynamik (MD) Simulation unterzogen. Die hier präsentierte Ergebnisse der theoretischen Untersuchungen wurden in drei Abschnitten beschreiben.

Die Faktoren, die die Orientierung der Häm axial an koordinierten Imidazole beeinflussen, wurden durch die Analyse von 693 Häm aus 432 Kristallstrukturen von Häm-Proteinen aus der Protein Data Bank (PDB) bestimmt. Während der PDB Datenbank Analyse wurden die Orientierungen der koordinierten Histidine relativ zum Häm, als auch relativ zum zweiten Histidin (in Bis-histidin koordinierten Häm), beobachtet. Wir untersuchten die Orientierung von axial ligandierten Imidazolen relativ zu ihrer Histidingerüst-Konformation und der Position und Orientierung des Histidingerüsts relativ zur Häm Ebene. Bei unserem Ansatz wurde auch der Einfluss auf das Wasserstoffbrücken Netzwerk von axial koordinierten Imidazolen untersucht. Die Ergebnisse der Datenbanksuche wurden mit Hilfe von molekularen Kraftfeld Simulationen interpretiert, wobei die relevanten Interaktionen verglichen wurden. Die Nachforschungen zeigten, daß die bevorzugte Orientierung der NδH Gruppe des axial koordinierten Imidazols in Richtung der Propionate ist, was auf das Vorhandensein einer anziehenden Wechselwirkung des Imidazols mit den Propionaten hinweist. Das Imidazol nimmt auch in Bezug auf sein Histidingerüst eine bevorzugte Position ein, bei der der Imidazolring orthogonal zu der Ebene liegt, die von den Bindungen Cα-Cβ und Cβ-Cγ des Histidins aufgespannt werden. Unter Berücksichtigung dieser beiden Einflüsse, die größtenteils elektrostatischer Natur sind, war es möglich, die Orientierung von axial koordinierten Imidazolen für alle Familien von Häm-Proteinen, mit Ausnahme der Gruppe der Cytochrom c Peroxidase, zu erklären. Die NδH Gruppe des an das Häm koordinierten Imidazols ist in der Lage, alternativ zur Wasserstoffbrücke in der nativen Struktur eine Vielzahl unterschiedlicher Wasserstoffbrücken einzugehen. Da Änderungen im Wasserstoffbrückenbindungsmuster bei den meisten Mutanten keine wesentliche Änderung der Orientierung des Imidazols bewirken, zogen wir die Schlussfolgerung, daß die Wasserstoffbrücken nur eine Rolle bei der Feineinstellung der Imidazol Orientierung spielen. In einigen wenigen Fällen können die starken Wasserstoffbrücken der Imidazol NδH Gruppe mit negativ geladenen sauren Residuen ausschlaggebend sein, wie zum Beispiel in der Gruppe von Cytochrom c Peroxidase. Da das Protein die Konformation der Propionate und des Histidingerüsts festlegt, übt es damit auch indirekt einen Einfluss auf die Konformationen von an Häm koordiniert Histidinen aus.

Ein wichtiger Beitrag in dieser Doktorarbeit war die Prozedur um Atomkoordinaten von Modellverbindungen eines künstlichen Proteins von Grund auf zu generieren, wobei eine sehr aufwendige Modelling Technik mit schrittweiser Energielaxierung eingesetzt wurde. Dieser

neue Ansatz wurde auf ein de novo synthetisches Protein angewendet, das von Rau & Hähnel (1998) synthetisiert wurde, und welches den zentralen Teil des *four-helix bundle* des nativen Cytochrom b's nachbildet. Die Stabilität der computergenerierten Strukturen wurde getestet, in dem bei Langzeit-Dynamiksimulationen die Konformationsänderungen und Fluktuationen mit den Ergebnissen der gleichen Simulationen der Kristallstruktur des nativen Cb verglichen wurden. Die Ergebnisse der MD Simulationen zeigen, daß die computergenerierte Struktur stabil und relaxiert ist. Da die RMS Abweichungen in der MD Simulation des künstlichen Proteins so klein sind wie die des nativen Cb's, schließen wir daraus, daß die Stabilität der Struktur des künstlichen Cb ähnlich zu der des nativen Cb ist.

Die Protonierungs- und Oxidationswahrscheinlichkeiten titrierbarer Gruppen wurden gleichzeitig mit Hilfe der Kontinuumselktrostatik Methode berechnet, bei der die linearisierte Poisson-Boltzmann Gleichung (LPBE) numerisch auf einem Gitter gelöst wird und anschließend eine Monte Carlo Titration aller titrierbaren Gruppen im Protein durchgeführt wird. In dieser Arbeit wurden die gesamten Ladungsverteilungen der neutralen und geladenen Formen von jeder ionisierbaren Gruppe berücksichtigt, was für eine korrekte Behandlung von Salzbrücken sehr wichtig ist. Die quantenchemischen Rechnungen wurden für jedes bis-Imidazol-Häm System ausgeführt und lieferten die atomaren Partialladungen, die die elektrostatischen Potentiale der redox-aktiven Gruppen in der Nachbarschaft wiedergeben. Die angewendeten theoretische Methoden erlaubten es, die Protonierungs- und Oxidationsmuster des Proteins als eine Funktion des pHs und des Redoxpotentials der Lösung zu berechnen. Es gibt mehrere theoretische Studien, die Redoxproteine und die darin ablaufenden Elektronentransferprozesse untersucht haben. In diesen Studien wurden Energiedifferenzen zwischen unterschiedlichen Oxidationszuständen, die während des Elektronentransfers auftreten berechnet. Jedoch wurde der Einfluss des Redoxpotentials des Lösungsmittels immer vernachlässigt. Die hier angewendeten elektrostatischen Berechnungen berechnen das Redoxpotential von redoxaktiven Kofaktoren und berücksichtigen dabei das Redoxpotential des Lösungsmittels. Die bestehenden Methoden wurden erweitert, um Redox-titrations eines Proteins auszuführen, bei denen das Lösungspotential variiert wurde und der pH konstant gehalten wurde. Auf diese Art und Weise konnten wertvolle Einblicke in die Funktionsweisen von Redoxzentren in Proteinen gewonnen werden.

Auf diese Weise wurde die elektrostatische Kopplung zwischen Elektron- und Protontransfer in Proteinen untersucht. Die pH Abhängigkeit von Redoxpotentialen in Proteinen (der sogenannte Bohr Effekt) wurde untersucht. Der Redox-Bohr Effekt scheint mit Änderungen in den Protonierungszuständen der titrierbaren Residuen zusammenzuhängen, die während der Oxidation oder Reduktion auftreten. Solche Proteine können Elektronen und Protonen in einem korrelierten Mechanismus transportieren. Im Kern hängt dieses Phänomen mit einer Redoxpotentialveränderung zusammen, die mit der pH Änderungen eintritt. Zusätzlich können die unterschiedlichen Redoxzustände von Kofaktoren in Proteinen auch zu unterschiedlichen  $pK_A$  Werte der titrierbaren Residuen führen. Diese Eigenschaft zeigt sich in Elektronentransportern durch eine kooperative Verkettung zwischen Elektronentransfer (ET) von redox-aktiven und Protonentransfer von ionisierbaren Residuen.

Hier wurde der Ansatz der Kontinuumselktrostatik auf das künstliche und native Cb angewendet, um das Titrationsverhalten der ionisierbaren Residuen zu untersuchen, das Redoxpotential der Häm zu berechnen und die mit dem Bohr Effekt zusammenhängenden Phänomene zu untersuchen. Der Einfluss von unterschiedlichen strukturellen Faktoren auf das Redoxpotential der zwei Häm Gruppen im künstlichen Cb wurde untersucht. Dies ermöglichte es zu verstehen, wie die Proteinumgebung das Redoxpotential von Kofaktoren anpasst. Um die Energetik der Photoreaktivierung und die Redoxpotentiale der unterschiedlichen Redoxpaare (Tryptophane, Tyrosine, FAD) zu untersuchen, die an dem Elektronen- und Protonentransfer in DNA Photolyase aus *E. coli* beteiligt sind, wurde der gleiche Ansatz wie beim Cytochrom b angewendet. Eine empirische Gleichung (basierend auf

der Marcus Theorie) wurde verwendet, um die Raten der ET Reaktion abzuschätzen. Gute Übereinstimmung zwischen den berechneten und dem experimentell ermittelten Titrationsverhalten und den Reaktionsraten deutet an, daß die angewendete theoretische Methode geeignet ist und das elektrostatische Verhalten in solchen Systemen widerspiegelt, obwohl Änderungen der Konformation und Unterschiede in den gemittelten Strukturen, die zwischen Kristall und Lösung bestehen mögen. Es zeigt auch an, daß die elektrostatischen Wechselwirkungen für Proteine die wohl wichtigste Rolle spielen, während nicht-elektrostatische Wechselwirkungen, die theoretisch weit schwieriger zugänglich sind, offenbar weniger wichtig sind.

In meiner zukünftigen Arbeit möchte ich die angesprochenen Methoden auf weitere Systeme anwenden und verfeinern. Einige dieser Projekte sind bereits in Arbeit. Sie werden weitere nützliche Einblicke liefern. Mit den gleichen Methoden und Ladungssets wie für die DNA Photolyase aus *E. coli*, wird der Photoreaktivierungsprozess in Photolyase aus *A. nidulans* untersucht (Winkelmann et al., 2001). Da der genaue radikalische Transferweg nicht experimentell nachgewiesen ist, hoffen wir, daß mit diesen Ergebnissen die Frage über welche Tryptophan und Tyrosin Residuen an der Reaktion beteiligt sind beantworten zu können.

Mit der oben angedeuteten Modellierungszurück können Atomkoordinaten von ähnlichen Modellverbindungen (template-assembled synthetic proteins, TASP) generiert werden. Eine ganze Bank von Mutanten, die ein Häm in einem *four-helix bundle* enthalten, ist bereits erhältlich (Rau et al., 2000) und die Redoxpotentiale wurden gemessen. Einige der Mutanten wurden bereits berechnet und ihre Redoxpotentiale der Häm Gruppen korrelieren gut mit den experimentellen Daten. Das Ziel meiner Arbeit ist es, die Faktoren zu finden, die die Redoxpotentiale von Häm Gruppen in unterschiedlichen Mutanten beeinflussen. Die vorläufigen Ergebnisse sind recht vielversprechend (Popović & Knapp, 2001).

Ein Teil dieser Doktorarbeit handelt von Proteinen, die bis-Histidin Häm Systeme (b-Typ) beinhalten. Für diese Systeme wurde bereits eine Reihe von Problemen gelöst, um die Redoxpotentiale angemessen zu berechnen. Es ist bereits ein größeres Problem die richtigen atomaren Partiaalladungen zu erhalten. Dieses hängt mit dem technischen Problem zusammen, wie man den redox-aktiven Teil des Häm und die titrierbaren Propionate gleichzeitig behandelt. Außerdem muß das Standard-Redoxpotential der Modellverbindung sorgfältig gewählt werden. Aus diesem Grunde birgt die Berechnung der Redoxpotentiale von Histidin-Methionin Häm Systemen und vom c-Typ Häm (zwei kovalent an Häm gebundene Cysteine) zusätzliche Schwierigkeiten. Solche Häm Systeme existieren im bakteriellen Photosynthese Reaktionszentrum. Vorläufige Ergebnisse (Voigt et al., 2001) zeigen, daß auch für solche Systeme die Anwendung der oben gezeigten Methode eine gute Übereinstimmung mit Experimenten liefert.

Die Einführung neuer Methoden, sowie die Kombination und Erweiterungen bestehender Methoden, als auch das gewachsene Wissen aus Kristallstruktur Datenbanken können weitere und tiefere Erkenntnisse in der Beziehung zwischen Proteinstruktur und Funktion geben. Die hier gezeigten theoretischen Untersuchungen können zu einem besseren Verständnis von Experimenten führen. Aber, da diese Methoden auch die Möglichkeit zur Vorhersage des Verhaltens von Kofaktoren in Proteinen liefern, können sie den Experimentatoren auch helfen synthetische Proteine zu entwerfen und neue Experimente zu planen.