

Simulation of Enzyme Reactions. The Influence of Protonation on Catalysis and on Protein-Protein Association

Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
bei dem Fachbereich Biologie – Chemie – Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Peter Vagedes

1. April 2001

Datum der Disputation: 26.3.2001

1. Gutachter: Prof. Dr. E. W. Knapp, Freie Universität Berlin
2. Gutachter: Prof. Dr. W. Saenger, Freie Universität, Berlin



Preface

This thesis was prepared from November 1997 to November 2000 in the *Macromolecular Modeling Group* of Prof. Dr. E.W. Knapp at the Freie Universität Berlin. It was a pleasure to work with colleagues there coming from different scientific fields like chemistry, biochemistry, physics and mathematics. This group provided optimal working conditions for me. Especially I have to thank Prof. Dr. E.W. Knapp, who suggested the interesting topic of this thesis to me and who was open to many helpful discussions.

I have to acknowledge Matthias Ullmann for a lot of advices on theoretical and computational approaches in biophysics. His help was essential in the beginning of my work.

Björn Rabenstein introduced the titration calculations to me and also provided the program KARLSBERG.

I thank Johan Åqvist and his groupmembers Karin Kolmodin, Isabella Feierberg and John Marelius in Uppsala for their hospitality during my stay there. They also provided the program Q and John Marelius helped me a lot in running the software.

For the interesting cooperation in the projects on Drosophila Alcohol Dehydrogenase and Arylsulfatase A I thank Timm Essigke and Daniel Winkelmann.

The computations during my work were done on our local computers that are administrated by Björn Rabenstein, Timm Essigke and Daniel Winkelmann. Their support made many things feasible in short times.

Benedikt Dietrich helped me writing some utility tools in C++. Dragan Popovic supported me with his knowledge in the CHARMM software.

I have to thank Donald Bashford for providing his software MEAD to me and Arie Warshel who allowed me to use his program ENZYMIK.

To generate the pictures in this thesis I used the programs MOLSCRIPT of Per Kraulis and ISISDRAW provided by MDL. The typesetting was done with L^AT_EX. Plots were done with XMGR.

For financial support I would like to thank the Graduiertenkolleg *Modellstudien zu Struktur, Eigenschaften und Erkennung biologischer Makromoleküle auf atomarer Ebene*

PETER VAGEDES

*Freie Universität Berlin
November 2000*

Contents

1. Introduction	13
2. The protonation pattern of proteins	15
2.1. Theory of electrostatic interactions in macromolecules	15
2.1.1. The choice of the dielectric constant	16
2.1.2. The Poisson-Boltzmann equation	17
2.2. Acid-base behavior in solution and in proteins	18
2.3. Protonation state energies from electrostatic potentials	20
2.4. Protonation energies in different protein conformations	23
2.5. Monte Carlo sampling of protonation states	25
2.5.1. Methods to improve the sampling efficiency	25
3. Simulation of enzyme catalyzed reactions	29
3.1. Theory of enzyme catalysis	29
3.1.1. Basic enzyme kinetics	30
3.1.2. The chemistry of enzyme catalyzed reactions	32
3.1.3. Electrostatic contributions in enzyme catalysis	33
3.1.4. Reference reactions	35
3.2. How to simulate an enzymatic reaction?	36
3.3. The empirical valence bond method	37
4. The deacylation step in acetylcholinesterase	41
4.1. Introduction to acetylcholinesterase	41
4.2. Details of computational setup	44
4.2.1. The structure	44
4.2.2. Simulation conditions	46
4.3. Results and Discussion	46
4.3.1. The protonation state	46
4.3.2. Reference reaction in solution	47
4.3.3. EVB/FEP calculations	49
4.4. Conclusion	55
5. Dimer-octamer equilibrium in arylsulfatase A	57
5.1. Electrostatic interactions and protein-protein association	57
5.2. Introduction to arylsulfatase A	58
5.3. The structure of ASA	59
5.4. Electrostatic energies of dimer-dimer association	63
5.4.1. MC sampling of conformations	63
5.4.2. The proton linkage model	64
5.4.3. The model system	64

5.4.4. Methods	66
5.5. Results and Discussion	69
5.5.1. The protonation state of Glu424	69
5.5.2. The association free energy	70
6. The mechanism of ASA	75
6.1. The proposed mechanism of arylsulfatase A	75
6.2. The simulation of the ASA mechanism	80
6.2.1. The formation of the diol	80
6.2.2. Simulation of the diol formation	82
6.2.3. Ab initio reference reactions	86
A. Abstract	89
B. Zusammenfassung (German abstract)	91
C. Molecular Mechanics Force Fields	95
D. Charges used for titration calculations	97
E. Standard pK_a values of amino acid side chains	99
F. Curriculum vitae of the author	101
Bibliography	103

List of Figures

2.1. Thermodynamic cycle for protonation reactions in different environments	20
2.2. A model compound for a titratable group.	21
2.3. Thermodynamic cycle for two conformations of a protein	24
2.4. Schematic representation of double moves	26
3.1. Scheme of an enzyme catalyzed reaction	30
3.2. Reaction in an enzyme and in a solvent cage	31
3.3. General base catalysis in aqueous solution	32
3.4. The hydrolysis of acetic anhydride	33
3.5. The mechanism of serine proteases	34
3.6. The active site of carbonic anhydrase	35
4.1. Kinetic mechanism for ACh hydrolysis	41
4.2. Reaction Mechanism of AChE catalysis	42
4.3. Resonance states of the deacylation step	42
4.4. The active site of the acylated AChE	45
4.5. Schematic representation of free energies	50
4.6. Free energy profiles	51
4.7. The tetrahedral intermediate in the deacylation step	54
5.1. ASA catalyzed reaction	59
5.2. ASA monomer and octamer	60
5.3. The ASA dimer	61
5.4. The ASA dimer-dimer contact	62
5.5. Glu424 hydrogen bonds at the dimer-dimer interface	65
5.6. Titration curves of Glu424	69
5.7. Association free energies in dependence on pH value	71
5.8. Association free energies fitted to experiments	72
5.9. Proton release upon association	73
5.10. Free energy of association by proton linkage model	74
6.1. The post-translational modification of ASA	75
6.2. The metal binding site in ASA	76
6.3. The active site in ASA	77
6.4. The mechanism of alkaline phosphatase	78
6.5. The proposed mechanism of ASA	79
6.6. Equation of diol formation	81
6.7. Acid catalyzed mechanism of diol formation	81
6.8. Base catalyzed mechanism of diol formation	81
6.9. The formation of the diol	83

List of Figures

6.10. The Resonance states of the diol formation	84
6.11. Energy Scheme of the reference reaction for the diol formation	85

List of Tables

4.1. Atomic charges used in EVB calculations	47
4.2. EVB interaction parameters	48
4.3. Results of free energy perturbation	52
5.1. Reference energies between the conformations	70
5.2. All contributions to reference energies	70
5.3. Corrected reference energies	73

Appendix

A. Abstract

In this work the role of electrostatic interactions in proteins for different processes were investigated. The main subject was to study the influence of electrostatic interactions on catalysis and protein-protein association.

The protonation pattern of the enzyme acetylcholinesterase was determined by a Monte-Carlo titration method on the basis of the electrostatic potentials at the titratable groups. The calculated protonation pattern showed that not all titratable groups are in their standard protonation state. This finding suggested that the function of acetylcholinesterase has to be judged not only on its structure and the standard charge distribution, where generally titratable groups are assumed to be charged, but also on the carefully established protonation pattern. In acetylcholinesterase, especially the residue Glu199, which is near to the active site and highly conserved among different species, gave rise to several discussions, because the Gln199Ala mutation did not show as large effects on the reaction kinetics as one could expect when a charged group is replaced by alanine. My titration calculations showed that in fact Glu199 is not charged but protonated in the free as well as in the acylated enzyme. This explains very well the small effect in the mutation experiment.

The next question was, if the uncharged protonation state of Glu199 is consistent with the catalytic mechanism of acetylcholinesterase. I investigated the rate determining deacylation step of acetylcholinesterase. This simulation study was done within the framework of the empirical valence bond method (EVB). With this method the free energy along the reaction path can be calculated. The unique parameterization facilities of the EVB method allow a meaningful comparison of the calculated free energies with experimental values, which are deducible from the measured reaction rates. In my study, I could reproduce the experimental reaction rate of the deacylation with a sufficiently small deviation: The rate obtained by the simulation studies was only by a factor of 30 smaller than the experimental rate. This result could only be obtained with acetylcholinesterase in the appropriate protonation state. As a confirmation of the previous Monte-Carlo titration study I found, that Glu199 in the charged titration state decreased the rate by the factor 10^4 . This finding underlines the importance to consider the correct protonation pattern for theoretical investigations on enzyme functions.

Moreover, the study on acetylcholinesterase revealed that the protonation pattern in the active site is in agreement with the general assumed mechanism of serine hydrolases, where the histidine of the catalytic triad forms a hydrogen bond with the Asp or Glu residue of the catalytic triad, that is negatively charged. In my study the proton at His440 was found on the right nitrogen atom to form this hydrogen bond and Glu327 was found to be negatively charged.

The trajectory of the simulated reaction showed, that the tetrahedral intermediate of the deacylation step is stabilized by an oxyanion hole as is also known for the acylation step.

I found in my calculations, that the presence or absence of choline, the reaction product of the initial acylation reaction, effects neither the protonation pattern of the enzyme nor the energetics of the catalyzed reaction. Hence, choline might still be in the binding pocket during deacylation. This is somehow surprising, as choline is positively charged and should therefore have an influence on the active site properties. This indifferent finding suggests, that choline may leave the binding pocket also after the deacylation step in contrast of what is generally assumed.

Another field of application of electrostatic interactions in proteins is the protein-protein association process. An interesting system is the enzyme arylsulfatase A, that builds octamers at pH values around 5 and dissociates to dimers at pH values above 6. From the crystal structure, it was suggested that this pH dependent behavior is controlled by the protonation/deprotonation equilibrium of Glu424, the only titratable group in the dimer-dimer interface. I investigated the titration behavior of arylsulfatase A, when the dimers are associated or isolated and found that indeed the protonation behavior of Glu424 differs significantly. The protonation probability is larger, when the dimers are associated. This was also suggested from the interpretation of the structure: As both Glu424 are only separated by around 5 Å in the dimer-dimer interface, it would be energetically unfavorable to have both in the charged state.

The titration behavior of Glu424 also supports a second conclusion drawn from the x-ray structure determination experiments. Glu424 was found to have possibly two conformations: One conformation suitable for an intermolecular hydrogen bond that supports the dimer-dimer association, and one conformation suitable for an intramolecular hydrogen bond, preferably formed in the isolated dimers. The intermolecular hydrogen bond is formed with Glu424 protonated. The intramolecular hydrogen bond is formed with Glu424 unprotonated. The titration calculations showed, that the protonation probability of Glu424 in the dimer-dimer interface is significantly higher, when it is in the conformation suitable for the intermolecular hydrogen bond.

To account for the pH dependent behavior of the dimer-dimer association of arylsulfatase A I calculated the free energy of association in dependence of the pH-value with two different methods: A Monte-Carlo method yielding the population of the associated and isolated state and the proton-linkage model.

The first method relies on good reference energies of the associated and dissociated forms of the ASA dimer in solution. The computation of suitable reference energies is problematic. The calculations are therefore more qualitative and show, that the associated form is more stable at pH 5 than at pH 7. The main contribution to the association comes from hydrophobic interactions, which are only qualitatively considered in the calculations via a surface factor. Moreover it could be shown, that electrostatic interactions do not favor association but rather work against it. The proton linkage model provides the same pH dependence of the association energies.

The last part of this work is on the mechanism of sulfate ester hydrolysis accomplished by arylsulfatase A. The mechanism may proceed via a *gem*-diol in the active site of arylsulfatase A. This unusual component in an enzyme is formed by hydration of an aldehyde. The hydration of the aldehyde has to be at least as fast as the overall rate of arylsulfatase A. This seems to be only possible if it is base- or acid-catalyzed. From titration calculations I suggest, that the hydration of the aldehyde is catalyzed by a lysine residue in the active site. This lysine residue was found to be unprotonated and could therefore act as a base.

The systems investigated in this work show clearly that besides the structure of an enzyme, which is prerequisite to draw conclusions on its function, the protonation pattern has to be investigated, because it may have a large influence on the catalytic mechanism as well as on protein-protein association processes. Therefore, the electrostatic energies depending on the different protonation states must always be included, when quantitative structure activity relationships are investigated.

B. Zusammenfassung (*German abstract*)

In dieser Arbeit wurde die Rolle elektrostatischer Wechselwirkungen in Proteinen bei verschiedenen Prozessen untersucht. Der Schwerpunkt lag auf der Untersuchung des Einflusses elektrostatischer Wechselwirkungen auf katalysierte Reaktionen und auf die Assoziation von Proteinen.

Das Protonierungsmuster des Enzyms Acetylcholinesterase wurde mit einer Monte-Carlo Titrationsmethode auf der Basis elektrostatischer Potentiale an den titrierbaren Gruppen bestimmt. Das berechnete Protonierungsmuster wies nicht alle titrierbaren Gruppen in ihrem Standardprotonierungszustand auf. Dieser Befund ließ vermuten, dass die Funktion von Acetylcholinesterase nicht allein anhand ihrer Struktur und des Standardprotonierungszustandes zu bewerten ist, der alle titrierbaren Gruppen in geladenem Zustand vorsieht, sondern dass darüber hinaus das Protonierungsmuster detailliert ermittelt werden muss.

Besonders die Rolle des Residuums Glu199, das nahe am aktiven Zentrum liegt und zwischen verschiedenen Spezies hochkonserviert ist, wurde stets diskutiert, denn die Glu199Ala Mutation zeigte nicht den deutlichen Effekt, den man erwarten kann, wenn eine geladene Gruppe durch Alanin ersetzt wird. Meine Titrationsrechnung zeigte, dass Glu199 in der Tat sowohl im freien als auch im acylierten Enzym protoniert ist. Dies erklärt den beobachteten kleinen Effekt des Mutationsexperiments sehr klar.

Die daran anschließende Frage war, ob der ungeladene Protonierungszustand von Glu199 mit dem katalytischen Mechanismus von Acetylcholinesterase in Übereinstimmung zu bringen ist. Daher habe ich den geschwindigkeitsbestimmenden Deacylierungsschritt der Acetylcholinesterase untersucht. Die Simulation dieser Reaktion wurde mit dem theoretischen Konzept der empirischen Valenzbindungsmethode (EVB) durchgeführt. Mit dieser Methode kann die freie Energie entlang des Reaktionspfades berechnet werden. Die Möglichkeiten zur Parameterisierung der EVB-Methode ermöglichen einen aussagekräftigen Vergleich der berechneten freien Energien mit experimentellen Werten, die von gemessenen Reaktionsraten abgeleitet werden können. In meinen Untersuchungen konnte ich die experimentell bestimmte Reaktionsrate mit einer zufriedenstellend kleinen Abweichung reproduzieren: Die Rate, die in der Simulation berechnet wurde, liegt lediglich um den Faktor 30 unter dem experimentell bestimmten Wert. Dieses Ergebnis konnte nur dann erreicht werden, wenn das Protonierungsmuster der Acetylcholinesterase entsprechend richtig eingestellt war. Als Bestätigung der vorher angestellten Monte-Carlo Titration konnte gezeigt werden, dass Glu199 im geladenen Protonierungszustand die Rate um den Faktor 10^4 erniedrigt. Dieses Resultat unterstreicht, dass es wichtig ist, den korrekten Protonierungszustand einzubeziehen, wenn die Funktion von Enzymen untersucht werden soll.

Die Untersuchungen an Acetylcholinesterase zeigten außerdem, dass das Protonierungsmuster im aktiven Zentrum mit den üblichen Vorstellungen über den Mechanismus von Serin-Hydrolasen übereinstimmt: Das Histidin der katalytischen Triade bildet eine Wasserstoffbrücke mit dem Glutamat der katalytischen Triade, wobei die saure Gruppe negativ geladen ist. Aus meinen Rechnungen resultierte ein Histidin, das am entsprechenden Stickstoff protoniert war, um mit Glu327 eine Wasserstoffbrücke auszubilden. Der Protonierungszustand von Glu327 wurde als negativ geladen gefunden.

Die Trajektorie der simulierten Reaktion zeigte, dass der tetraedrische Übergangszustand des Deacylierungsschrittes durch ein Oxyanion-Loch stabilisiert wird, wie es auch im Acylierungsschritt der Fall ist.

Die An- oder Abwesenheit des Cholins, dem Reaktionsprodukt des Acylierungsschrittes, beeinflusste in meinen Rechnungen weder den Protonierungszustand des Enzyms noch die Energetik der katalysierten Reaktion. Das Cholin könnte demnach während der Deacylierung noch in der Bindungstasche sein. Dies ist insofern überraschend, als dass Cholin positiv geladen ist und daher einen Einfluss auf die Eigenschaften des aktiven Zentrums haben sollte. Die nicht unterscheidbaren Resultate legen nahe, dass Cholin die Bindungstasche erst nach dem Deacylierungsschritt verlassen könnte. Dies steht im Gegensatz zu den allgemeinen Annahmen.

Ein weiteres Feld, in dem elektrostatische Wechselwirkungen von großem Interesse sind, ist die Assoziation von Proteinen. Hier ist das Enzym Arylsulfatase A (ASA) ein interessantes Fallbeispiel, denn Arylsulfatase A bildet Oktamere bei pH-Werten um 5 und dissoziiert zu Dimeren bei pH Werten über 6. Anhand der Kristallstruktur des Enzyms wurde vorgeschlagen, dass dieses pH-Wert-abhängige Verhalten durch das Protonierungsgleichgewicht von Glu424 kontrolliert wird. Ich habe das Protonierungsverhalten von Arylsulfatase A mit assoziierten und isolierten Dimeren untersucht und festgestellt, dass das Protonierungsverhalten von Glu424 in der Tat signifikant unterschiedlich ist. Die Protonierungswahrscheinlichkeit ist größer, wenn die Dimere assoziiert sind. Dies wurde auch anhand der Struktur vorgeschlagen: Da die Glu424 in der Dimer-Dimer Grenzfläche lediglich einen Abstand von 5 Å aufweisen, wäre es energetisch sehr unvorteilhaft, lägen beide im geladenen Protonierungszustand vor.

Das Titrationsverhalten von Glu424 unterstützt eine weitere Annahme, die anhand der Röntgenstruktur des Enzyms getroffen wurde: Glu424 kann in zwei Konformationen vorliegen. Eine der Konformationen ist für die Bildung einer intermolekularen Wasserstoffbrücke geeignet und würde die Dimer-Dimer Assoziation unterstützen. Die andere Konformation ist für eine intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung geeignet, die vorzugsweise in den isolierten Dimeren gebildet würde. Die intermolekulare Wasserstoffbrücke wird mit protoniertem Glu424 gebildet. Die Titrationsrechnungen zeigten, dass die Protonierungswahrscheinlichkeit von Glu424 in der Dimer-Dimer Grenzfläche deutlich größer ist, wenn sich das Glutamat in der Konformation befindet, die die intermolekulare Wasserstoffbrücke ermöglicht.

Um das pH-Wert-abhängige Verhalten der Dimer-Dimer Assoziation von Arylsulfatase zu untersuchen, habe ich die freie Energie der Assoziation mit zwei Methoden berechnet: Mit einer Monte-Carlo Methode, die die Populierungswahrscheinlichkeiten des assoziierten und des isolierten Zustands liefert, sowie mit der Proton-Linkage Methode.

Die erste Methode beruht auf verlässlichen Referenzenergien für den assoziierten und den isolierten Zustand von ASA in Lösung. Die Berechnung dieser Referenzenergien ist jedoch problematisch. Die Resultate sind daher eher qualitativ und zeigen, dass die assoziierte Form bei pH 5 stabiler ist als bei pH 7. Der größte Beitrag zur Assoziation resultiert aus hydrophoben Wechselwirkungen, die über einen Oberflächenfaktor in die Rechnung eingehen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass elektrostatische Wechselwirkungen der Assoziation eher entgegenwirken. Das Proton-Linkage Modell zeigt die gleichen pH-Wert-Abhängigkeiten der Assoziationsenergien.

Der letzte Teil meiner Arbeit beschäftigt sich mit dem Mechanismus der Sulfatester-Hydrolyse durch Arylsulfatase A. Der Mechanismus könnte über ein geminales Diol im aktiven Zentrum von Arylsulfatase A verlaufen. Diese für ein Enzym ungewöhnliche Gruppe wird durch die Hydratisierung eines Aldehyds gebildet. Diese Hydratisierung muss mindestens ebenso rasch verlaufen wie die Gesamtreaktion von Arylsulfatase A. Das erscheint nur möglich, wenn die Hydratisierung entweder säure- oder basenkatalysiert ist. Aufgrund der Analyse von Titrationsrechnungen er-

scheint es möglich, dass die Hydratisierung des Aldehyds durch ein Lysin im aktiven Zentrum katalysiert wird. Dieses Lysin-Residuum wurde unprotoniert gefunden und könnte demnach als Base fungieren.

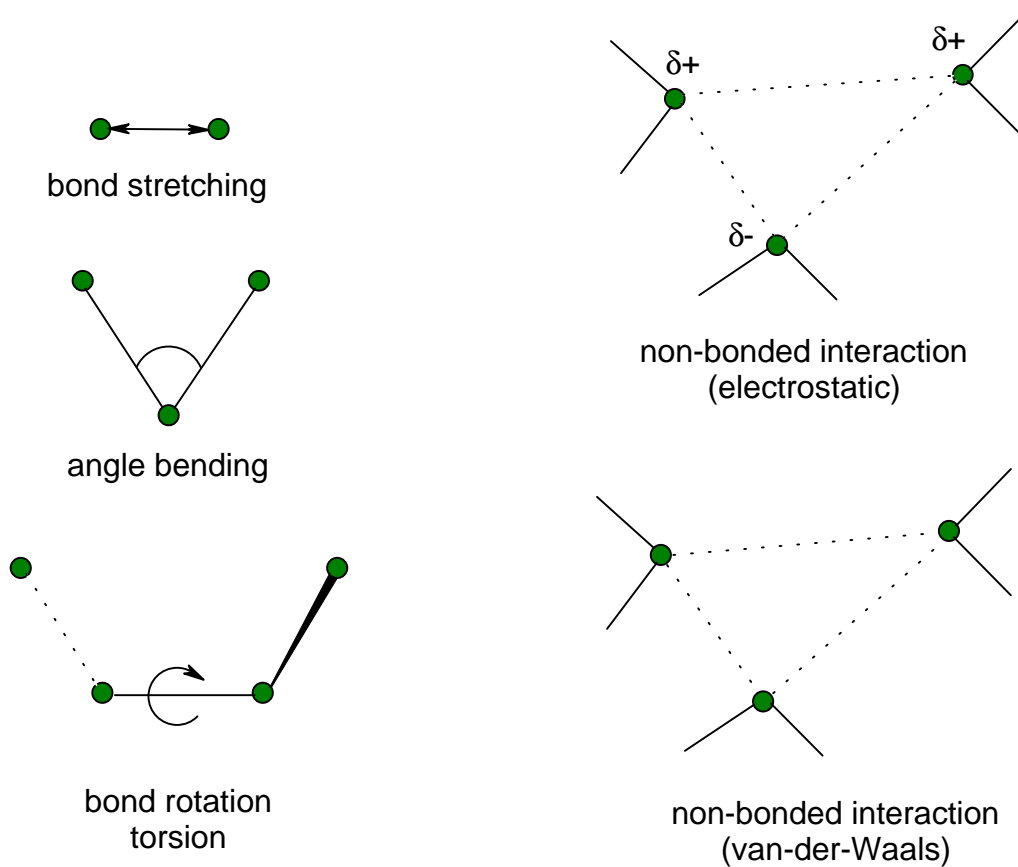
Die in dieser Arbeit untersuchten Systeme zeigen deutlich, dass neben der Struktur eines Enzyms, deren Kenntnis unabdingbar für die Beschreibung seiner Funktion ist, das Protonierungsmuster aufgeklärt werden muss, denn es kann einen starken Einfluss sowohl auf den katalytischen Mechanismus eines Enzyms als auch auf Protein-Protein Assoziationsvorgänge haben. Daher sollten die elektrostatischen Energien, die von den unterschiedlichen Protonierungszuständen abhängen, immer einbezogen werden, wenn quantitative Struktur-Funktionsbeziehungen untersucht werden.

C. Molecular Mechanics Force Fields

A modern molecular mechanics force for biomolecular simulations has to include at least four components, which consider the energetics of

1. the deviation of bond length l from their equilibrium value l_0
2. the deviation of bond angles θ from their equilibrium value θ_0
3. the rotation of bonds by angles ϕ
4. the interaction of atoms that are not bound to each other, consisting of electrostatic and van-der-Waals forces.

All forces are schematically shown in the following figure:



The energy function representing all interactions has in most cases the following form:

$$\begin{aligned}
 V(\mathbf{r}^N) = & \sum_{bonds} \frac{k_i^{(bond)}}{2} (l_i - l_{i,0})^2 + \sum_{angles} \frac{k_i^{(angle)}}{2} (\theta_i - \theta_{i,0}) \\
 & + \sum_{torsions} \frac{k_i^{(torsion)}}{2} (1 + \cos(n\phi - \gamma)) \\
 & + \sum_{i=1}^N \sum_{j=i+1}^N \left(4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \right)
 \end{aligned}$$

Each bond and each angle has its own force constant k and an equilibrium value, corresponding to the type of atoms that are involved. Also each torsion angle has its own force constant depending on the involved atoms. The energy of a torsion angle ϕ is determined by the multiplicity n , whose value gives the number of minimum points in the function as the bond is rotated through 360° . The phase factor γ determines where the torsion angle passes through its minimum value.

The van der Waals interactions are specified by the distance r_{ij} where the interaction energy is minimal. At the distance σ_{ij} the interaction energy is zero and ϵ_{ij} is the well depth.

The electrostatic interactions are evaluated by the coulomb-law, where q_i and q_j are point charges and r_{ij} is the distance between the corresponding atoms. The dielectric constant in vacuum is represented ϵ_0 .

D. Charges used for titration calculations

atom	protonated	unprotonated	atom	protonated	unprotonated
δ-histidine			ϵ-histidine		
N- ϵ_2	-0.51	-0.70	N- ϵ_2	-0.51	-0.36
C- γ	0.19	-0.05	C- γ	0.19	0.22
N- δ_1	-0.51	-0.36	N- δ_1	-0.51	-0.70
H- δ_1	0.44	0.32	H- δ_1	0.44	0.00
C- ϵ_1	0.32	0.25	C- ϵ_1	0.32	0.25
H- ϵ_2	0.44	0.00	H- ϵ_2	0.44	0.32
C- δ_2	0.19	0.22	C- δ_2	0.19	-0.05
C- β	-0.05	-0.09	C- β	-0.05	-0.08
H- δ_2	0.13	0.10	H- δ_2	0.13	0.09
H- ϵ_1	0.18	0.13	H- ϵ_1	0.18	0.13
N-terminus			lysine		
N	-0.30	-0.97	N- ζ	-0.30	-0.97
HT1	0.33	0.22	H- ζ_1	0.33	0.22
HT2	0.33	0.22	H- ζ_2	0.33	0.22
HT3	0.33	0.22	H- ζ_3	0.33	0.22
glutamic acid			aspartic acid		
C- γ	-0.21	-0.28	C- β	-0.21	-0.28
C- δ	0.75	0.62	C- γ	0.75	0.62
O- ϵ_1	-0.36	-0.76	O- δ_1	-0.36	-0.76
O- ϵ_2	-0.36	-0.76	O- δ_2	-0.36	-0.76
cysteine			tyrosine		
C- β	-0.11	-0.25	C- ζ	0.11	-0.18
S- γ	-0.23	-0.93	OH	-0.54	-0.82
H- γ	0.16	0.00	H	0.43	0.00
reactive water			C-terminus		
OH2	-0.834	-1.010	C	0.34	0.34
H1	0.417	0.005	OT1	-0.17	-0.67
H2	0.417	0.005	OT2	-0.17	-0.67
arginine					
N- ϵ	-0.70	-0.81			
H- ϵ	0.44	0.44			
C- ζ	0.64	0.71			
N- η_1	-0.80	-0.90			
H- η_{11}	0.46	0.27			
H- η_{12}	0.46	0.27			
N- η_2	-0.80	-0.90			
H- η_{21}	0.46	0.27			
H- η_{22}	0.46	0.27			

E. Standard pK_a values of amino acid side chains

Titrateable Group	Model Compound	pK_a	Reference
α -Carboxyl group		3.8	181
α -Amino group		7.5	181
Aspartate		4.0	181
Glutamate		4.4	181
Cysteine pK_1		9.5	181
Tyrosine pK_1		9.6	181
Arginine		12.0	181
Lysine		10.4	181
Tryptophane		16.8	182
Histidine $pK_{a,1}(N_{\delta 1})$		7.0	183
Histidine $pK_{a,1}(N_{\epsilon 2})$		6.6	183
Histidine $pK_{a,2}$		14.0	184
Water $pK_{a,1}$		-1.7	10
Water $pK_{a,2}$		15.7	10

F. Curriculum vitae of the author

Peter Vagedes

25.10.1969 born in Damme, Germany

1976-1980 primary school in Rieste

1980-1989 high school Gymnasium Bersenbrück, Abitur 1989

1989-1990 civil service

1990-1997 study of chemistry at *Carl von Ossietzky-Universität Oldenburg*, Diplom 1997

1995-1996 study of biochemistry (licence) at Université d'Orléans, France

1997-2000 PhD student in the Macromolecular Modelling Group of Prof. E. W. Knapp

Present address:

office:

Institut für Chemie (Kristallographie)

Takustraße 6

D-14195 Berlin

Germany

e-mail: vagedes@chemie.fu-berlin.de

phone: +49-30-838-53890

fax: +49-30-838-53464

private:

Eichenstrasse 14

D-13156 Berlin

Germany

phone: +49-30-28384784

