

Chapter 6

Summary

In this work, the dynamics of some electron-transfer protein complexes involved in photosynthesis were investigated theoretically. Protein association, electron-transfer paths, protonation probabilities, and the similarity of isofunctional proteins were explored. For these investigations, several methods were not only combined, but also further developed.

The coupling between the electron and proton transfer between the quinones in the bacterial photosynthetic reaction center was studied by a continuum electrostatic method (Rabenstein *et al.*, 1998b). The existent method was extended in two respects. Not only the protonation but also the redox state of the quinones were considered (Rabenstein *et al.*, 1998b) and conformational variability was allowed in the calculation (Rabenstein *et al.*, 1998a). The theoretical framework developed in this work allows to calculate protonation and oxidation probabilities of proteins in dependence on pH and redox potential of the solution. The energy differences between the different states of the reaction center occurring during the electron transfer and protonation were computed. These energy differences account for possible protonation changes of titratable groups during these reactions. Protonation probabilities of titratable groups were obtained by a Monte Carlo calculation. In contrast to earlier studies, atomic partial charges derived from quantum-chemical calculations were used. The calculated reaction energies are in agreement with experimental results. Surprisingly, the proton uptake by the reaction center is stronger coupled to changes of the redox state of the quinones than to changes of their protonation state. Thus, the proton uptake by the reaction center occurs predominantly before the protonation of Q_B . According to these computations, the reduction of Q_B^- to the doubly-negative state Q_B^{2-} is in the reaction center energetically even more unfavorable than in solution. Therefore, it is suggested that the second electron transfer from Q_A to Q_B occurs after Q_B has received its first proton. It was found in these calculations that the $Q_A^-Q_B^-$ state is more populated at pH 7.5 than the $Q_A^-Q_BH$ state. The low concentration of the $Q_A^-Q_BH$ state may be the reason why the singly-protonated Q_B could not be detected spectroscopically. The calculations imply that the first protonation of Q_B^- is a prerequisite for the second electron transfer between Q_A and Q_B . Therefore, a pH-dependence of the equilibrium between the states $Q_A^-Q_B^-$ and $Q_A^-Q_BH$ can also explain the experimentally observed pH-dependence of the rate for the second electron-transfer step. Based on the calculated reaction energies, the following sequence for the electron-transfer and protonation reactions is proposed: (1) first electron transfer from Q_A to Q_B , (2) first protonation of Q_B (at the distal oxygen close to Ser L223), (3) second electron transfer from Q_A to Q_B , (4) second protonation of Q_B (at the proximal oxygen close to His L190).

The analysis of the association of plastocyanin and cytochrome *f* was done in four steps (Ullmann *et al.*, 1997b). In the first step, Monte Carlo sampling was used to generate docked

complexes. Molecular configurations that had relatively low energies were grouped together into six families by a cluster algorithm. In the second step, six configurations having the lowest energies, one from each family, were used as starting point of a molecular dynamics simulation. Hydration was considered explicitly in these simulations. In the third step, the following three contributions to the energy of binding were calculated: polarization of water by the proteins, determined from numerical solutions of the Poisson-Boltzmann equation; non-electrostatic (van der Waals and other) interactions involving the proteins and water; and the Coulomb interactions within and between the protein molecules. The relative association energy was calculated with a thermodynamic cycle. In the fourth step, relative electronic coupling between the copper and heme sites in the six configurations was analyzed and compared by the *Pathways* method. The *Pathways* method was extended to consider the anisotropy of the copper-ligand interaction (Ullmann & Kostić, 1995). The configuration having the most efficient path for electron tunneling turned out to be not the most stable configuration.

There are indications that the possible interaction between Lys65 in cytochrome *f* and Tyr83 in plastocyanin may involve the ammonium group of the former and the aromatic ring of the latter. These surprisingly strong non-covalent interactions, so-called charge- π interactions, have recently been discovered and are important for molecular recognition. Modeling and structural optimization of these interactions are at the moment beyond the state of the art in molecular mechanics, but these studies should become possible with improved force fields. A participation of cation- π system in the electron-transfer reaction between plastocyanin and cytochrome *f* or in the proton-transfer reaction of cytochrome *f* is discussed. The functional importance of the cation- π system is corroborated by analyzing available amino-acid sequences. Because Lys65 is missing in all known cyanobacterial cytochrome *f* sequences, a cation- π interaction can not occur *between* cytochrome *f* and plastocyanin from cyanobacteria, but may be formed *within* cyanobacterial plastocyanin between Tyr83 and Arg88.

The electron-transfer reaction between cupriplastocyanin and ferrocyanochrome *f* is fast in the non-covalent complex and undetectably slow in the covalent complex (Qin & Kostić, 1993). This contrast is explained by two alternative models. First, the initial orientation of plastocyanin after association is not the electron-transfer active orientation. A reorientation is required in order to allow the electron transfer. Chemical crosslinking prevents this reorientation. Second, a cation- π complex is involved in the electron-transfer reaction. The chemical crosslink destroys this cation- π complex and the electron transfer can not occur. A recent NMR study supports the first model (Ubbink *et al.*, 1998).

The blue copper protein plastocyanin and the heme protein cytochrome *c*₆ differ in composition and in structure, but perform the same function in the photosynthetic electron-transport chain. These two proteins are compared on the basis of their electrostatic potentials in order to understand the structural basis of their functional equivalence (Ullmann *et al.*, 1997a). The recently developed FAME algorithm (Hauswald, 1998) was applied to superimpose proteins. The program FAME superimposes molecules by optimizing the similarity of their electrostatic potentials with respect to the relative orientation of the molecules, a common strategy in indirect drug design. On the basis of the FAME alignments of plastocyanin and cytochrome *c*₆, the docking and the electron-transfer reactions of these two proteins with its physiological reaction partner cytochrome *f* were analyzed. It is the first time that an algorithm commonly used to superimpose drug molecules is applied to proteins. Functional analogies for individual amino acids in possible electron-transfer paths in the interprotein redox reactions are proposed. Two surface patches in cytochrome *c*₆ that may be involved in electron-transfer paths are identified. The hydrophobic patch with the exposed heme edge in cytochrome *c*₆ may be functionally equiva-

lent to the hydrophobic patch with His87 in plastocyanin, whereas Trp63 in cytochrome c_6 may be equivalent to Tyr83 in plastocyanin. An aromatic amino acid is present at the position of Trp63 in all known cytochrome c_6 sequences. The electronic coupling between the heme or the copper site on the one side and several potentially important amino-acid residues on the other is analyzed by the *Pathways* method. It was proposed that Lys65 of cytochrome f and Tyr83 of plastocyanin form a cation- π system that is functionally important. Interestingly, a cation- π interaction may also be present between Trp63 and Arg66 within cytochrome c_6 .

Ferredoxin and flavodoxin are two isofunctional proteins that differ not only in structure but also in size. Nevertheless they perform the same physiological function. Both molecules are superimposed by the FAME algorithm and their interaction with their reaction partners is discussed. Two superpositions were found in which both molecules completely overlap. The molecules are, however, not concentric in these superpositions, which is in agreement with recent electron microscopic studies on photosystem I crosslinked to ferredoxin and flavodoxin. The residues of ferredoxin and flavodoxin that are potentially important for the interaction with their reaction partners are listed.

The explored examples emphasize the importance of electrostatic interactions in protein association and in protein function. Several interpretations of experimental observations were proposed on the basis of the calculations in this work. These interpretations can be tested in future experiments. Theoretical investigations not only help experimentalist to interpret their results and guide them to new experiments, but can also provide new insights into the function of proteins.

In my future work, I am going to extend the methods applied and developed here in order to investigate the bioenergetic reactions. Particularly, I am interested in the coupling of electron and proton transfer reactions. This coupling is the basis for most bioenergetic processes linked to membranes. In order to study processes in membranes theoretically, it is however necessary to consider the membrane in electrostatic calculations and it is required to include typical membrane effects such as membrane potentials and proton gradients. The theoretical basis for considering membrane potentials in electrostatic calculations is given by Roux, 1997. I would like to combine the electrostatic methods described in Chapter 4 with Density Functional Calculations to calculate pK_a value of amino acids that coordinate to metals in proteins. Another interesting topic is the search of proton transfer paths in proteins. A method similar to that used for the search of electron-transfer paths (Onuchic *et al.*, 1992) described in Chapter 3 can probably be used. Also the understanding of the docking of small molecules (such as quinones) or proteins (such as cytochrome c) to membrane proteins and the influence of membranes potentials on these processes is required to understand the bioenergetic reactions.

Once biochemical reaction systems are understood structurally and functionally, the use of methods that describe enzymatic networks (Heinrich & Schuster, 1996) can help to get deeper insights to interrelationship between the members of biological reaction systems. The knowledge of the structure of biomolecules that is available now and will become available in the future can also help in understanding larger biological entities such as organelles and cells. I expect that in near future theoretical approaches in biological science will get an impact to biology that will be as high as the impact of theory in physics in the past and today.

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Dynamik von einigen Elektronentransfer-Proteinkomplexen, die an der Photosynthese beteiligt sind, theoretisch untersucht. Dabei wurden Proteinassoziation, Elektronentransfer-Pfade, Protonierungswahrscheinlichkeiten sowie die Ähnlichkeit isofunktionaler Proteine betrachtet. Für diese Untersuchungen wurden nicht nur verschiedene Methoden kombiniert, sondern auch weiterentwickelt.

Die Kopplung von Elektronen- und Protonentransfer im bakteriellen photosynthetischen Reaktionszentrum wurde mit Hilfe einer Kontinuumselktrostatische Methode untersucht (Rabenstein *et al.*, 1998b). Eine existierende Methode konnte in zweierlei Hinsicht erweitert werden. Zum einen wurden nicht nur die Protonierungszustände, sondern auch die Redoxzustände der Chinone berücksichtigt (Rabenstein *et al.*, 1998b), und zum anderen wurde konformationelle Variabilität in den Berechnungen zugelassen (Rabenstein *et al.*, 1998a). Der theoretische Hintergrund der Methode erlaubt es, Protonierungs- und Oxidationswahrscheinlichkeiten von Proteinen in Abhängigkeit von pH-Wert und Redoxpotential der Lösung zu berechnen. Die Energiedifferenzen zwischen den verschiedenen Zuständen des Reaktionszentrums, die während der Elektronentransfer- und Protonierungsreaktionen auftreten, wurden berechnet. Diese Energiedifferenzen berücksichtigen auch, daß sich Protonierungen titrierbarer Gruppen ändern können. Die Protonierungswahrscheinlichkeiten titrierbarer Gruppen wurden mit Hilfe von Monte-Carlo-Rechnungen bestimmt. Im Gegensatz zu vorhergehenden Rechnungen wurden atomare Partialladungen verwendet, die aus quantenchemischen Berechnungen abgeleitet wurden. Die berechneten Reaktionsenergien stimmen mit experimentellen Daten überein. Überraschenderweise ist die Protonenaufnahme durch das Reaktionszentrum stärker an die Änderung der Redoxzustände der Chinone gekoppelt als an deren Protonierungszustandsänderung. Das heißt: Die Protonenaufnahme durch das Reaktionszentrum erfolgt, bevor Q_B protoniert wird. Diesen Berechnungen zufolge ist die Reduktion von Q_B^- zum doppelt-negativen Zustand Q_B^{2-} im Reaktionszentrum sogar weniger vorteilhaft als in Lösung. Deshalb wird vorgeschlagen, daß der zweite Elektronentransfer von Q_A nach Q_B erfolgt, nachdem Q_B sein erstes Elektron erhalten hat. In diesen Berechnungen wurde festgestellt, daß der Zustand $Q_A^- Q_B^-$ bei pH 7.5 stärker populiert ist als der Zustand $Q_A^- Q_B H$. Die niedrige Konzentration des Zustandes $Q_A^- Q_B H$ kann der Grund dafür sein, daß das einfach protonierte Q_B spektroskopisch nicht detektiert werden konnte. Aus den Berechnungen kann man schlußfolgern, daß die erste Protonierung von Q_B^- eine Voraussetzung für den zweiten Elektronentransfer zwischen Q_A und Q_B . Deshalb kann die pH-Abhängigkeit des Gleichgewichtes zwischen $Q_A^- Q_B^-$ und $Q_A^- Q_B H$ auch die experimentell beobachtete pH-Abhängigkeit der Rate des zweiten Elektronentransferschrittes erklären. Basierend auf den berechneten Reaktionsenergien, wird folgende Sequenz für die Elektronentransfer- und Protonierungsreaktionen vorgeschlagen: (1) erster Elektronentransfer von Q_A nach Q_B , (2) erste Protonierung von Q_B (am distalen Sauerstoff nahe Ser L223), (3) zweiter Elektronentransfer von Q_A nach Q_B , (4) zweite Protonierung von Q_B (am proximalen Sauerstoff nahe His L190).

Die Untersuchung der Assoziation von Plastocyanin und Cytochrom *f* wurde in vier Schritten durchgeführt (Ullmann *et al.*, 1997b). Im ersten Schritt wurde eine Monte-Carlo-Simulation benutzt, um gedockte Komplexe zu generieren. Die molekularen Konfigurationen, die eine re-

lativ niedrige Energie haben, wurden durch einen Cluster-Algorithmus in sechs Familien zusammengefaßt. Im zweiten Schritt wurden die Konfigurationen mit der niedrigsten Energie aus jedem der sechs Cluster als Startstruktur einer Molekulardynamik-Simulation verwendet. Wasser wurde in den Simulationen explizit berücksichtigt. Im dritten Schritt wurden die folgenden drei Beiträge zur Bindungsenergie berechnet: die Veränderung der Polarisation des Wassers durch die Komplexbildung; nicht-elektrostatische Wechselwirkung der Proteine mit Wasser; und die Coulomb-Wechselwirkung innerhalb und zwischen den Proteinmolekülen. Die relative Bindungsenergie wurde mit Hilfe eines thermodynamischen Zyklus berechnet. Im vierten Schritt wurde die relative elektronische Kopplung zwischen dem Kupferatom und der Häm-Gruppe in den sechs Konfigurationen mit Hilfe der *Pathways*-Methode (Onuchic *et al.*, 1992) analysiert und verglichen. Die *Pathways*-Methode wurde erweitert, um die Anisotropie der Kupfer-Liganden-Wechselwirkung zu berücksichtigen (Ullmann & Kostić, 1995). Die Konfiguration mit dem effizientesten Elektronentransferpfad ist jedoch nicht die stabilste Konfiguration in den Berechnungen.

Es gibt Anzeichen, daß eine Wechselwirkung der Aminogruppe von Lys65 in Cytochrom *f* mit dem aromatischen Ring von Tyr83 in Plastocyanin möglich ist. Solche starken nichtkovalenten Wechselwirkungen, sogenannte Kationen- π -Wechselwirkungen, wurden kürzlich entdeckt und sind für molekulare Erkennungsmechanismen wichtig. Die Modellierung und die strukturelle Optimierung dieser Wechselwirkung geht über derzeitig verwendete Kraftfelder hinaus. Aber diese Untersuchungen werden mit verbesserten Kraftfeldern möglich sein. Die Beteiligung des Kation- π -Komplexes an der Elektronentransferreaktion zwischen Plastocyanin und Cytochrom *f* oder an der Protonentransferreaktion von Cytochrom *f* wird diskutiert. Die funktionelle Bedeutung des Kation- π -Komplexes wird unterstützt durch die Analyse vorhandener Sequenzen. Da Lys65 in allen bekannten cyanobakteriellen Sequenzen von Cytochrom *f* fehlt, kann sich der Kation- π -Komplex nicht zwischen Cytochrom *f* und Plastocyanin bilden, aber er kann innerhalb von Plastocyanin zwischen Tyr83 und Arg88 gebildet werden.

Die Elektronentransferreaktion zwischen Plastocyanin und Cytochrom *f* ist schnell im nichtkovalenten Komplex und nicht meßbar langsam im kovalenten Komplex (Qin & Kostić, 1993). Diese Beobachtung kann mit zwei alternativen Modellen erklärt werden. Erstens, die anfängliche Orientierung nach der Assoziation ist nicht die elektronentransferaktive Orientierung. Eine Umlagerung ist für die Elektronentransferreaktion erforderlich. Zweitens, ein Kation- π -Komplex ist an der Elektronentransferreaktion beteiligt. Die kovalente Bindung zerstört den Kation- π -Komplex, und der Elektronentransfer kann nicht stattfinden. Eine NMR-Studie unterstützt das erste Modell (Ubbink *et al.*, 1998).

Das blaue Kupferprotein Plastocyanin und das Häm-Protein Cytochrom *c*₆ unterscheiden sich in Zusammensetzung und Struktur, aber können die gleiche Funktion in der photosynthetischen Elektronentransferkette ausüben. Diese beiden Proteine wurden auf der Grundlage ihrer elektrostatischen Potentiale verglichen, um die strukturelle Basis ihrer funktionellen Äquivalenz zu verstehen (Ullmann *et al.*, 1997a). Der kürzlich entwickelte FAME-Algorithmus (Hauswald, 1998) wurde verwendet, um beide Proteine zu überlagern. Das Programm FAME überlagert Moleküle, indem es die Ähnlichkeit der elektrostatischen Potentiale beider Proteine hinsichtlich ihrer relativen Orientierung optimiert. Das ist eine übliche Methode im Indirekt-Drug-Design. Auf Grundlage der FAME-Überlagerungen von Plastocyanin und Cytochrom *c*₆ wurde das Docking und die Elektronentransferreaktion dieser beiden Proteine mit ihrem physiologischen Partner Cytochrom *f* analysiert. Es ist das erste Mal, daß ein Algorithmus, der üblicherweise zur Überlagerung kleiner Moleküle verwendet wird, auf Proteine angewendet wird. Funktionelle Analogien werden für individuelle Aminosäuren in mögliche Elektronentransferpfaden

vorgeschlagen. Zwei Oberflächenregionen, die möglicherweise an Elektronentransferreaktionen beteiligt sind, werden vorgeschlagen. Die hydrophobe Region mit dem exponierten Häm in Cytochrom c_6 könnte equivalent zu der hydrophoben Region mit His87 in Plastocyanin sein, und Trp63 in Cytochrom c_6 ist möglicherweise equivalent zu Tyr83 in Plastocyanin. Eine aromatische Aminosäure an der Stelle von Trp63 ist in allen bekannten Sequenzen von Cytochrom c_6 vorhanden. Die elektronische Kopplung zwischen dem Häm oder dem Kupfer auf der einen Seite und verschiedenen potentiell wichtigen Aminosäuren auf der anderen Seite wurde mit Hilfe des *Pathways*-Modells untersucht. Es wurde vorgeschlagen, daß Lys65 in Cytochrom f und Tyr83 in Plastocyanin einen funktionell wichtigen Kation- π -Komplex bilden. Interessanterweise kann ein Kation- π -Komplex auch zwischen Trp63 und Arg66 innerhalb von Cytochrom c_6 gebildet werden.

Ferredoxin und Flavodoxin sind zwei isofunktionale Proteine, die sich nicht nur in ihrer Struktur, sondern auch in ihrer Größe unterscheiden. Nichtsdestotrotz erfüllen sie dieselbe physiologische Funktion. Beide Proteine werden mit Hilfe des FAME-Algorithmus überlagert, und ihre Wechselwirkung mit ihren Reaktionspartnern wird diskutiert. Zwei Überlagerungen, in denen beide Moleküle komplett überlappen, wurden gefunden. Die Moleküle sind jedoch nicht konzentrisch in diesen Überlagerungen. Dieses Ergebnis ist in Einklang mit elektronenmikroskopischen Studien an kovalenten Komplexen von Photosystem I mit Ferredoxin und Flavodoxin (Mühlenhoff *et al.*, 1996a; Lelong *et al.*, 1996). Die Reste, die eventuell von funktioneller Bedeutung sind, werden aufgeführt.

Die untersuchten Beispiele unterstreichen die Wichtigkeit der elektrostatischen Wechselwirkung bei der Proteinassoziation und der Proteinfunktion. Verschiedene Interpretationen experimentell beobachteter Ergebnisse wurden auf der Grundlage der Berechnungen in dieser Arbeit vorgeschlagen. Diese Interpretationen können in zukünftigen Experimenten getestet werden. Theoretische Untersuchungen helfen nicht nur Experimentatoren, ihre Ergebnisse zu interpretieren und sie zu neuen Experimenten zu führen, sondern können auch neue Einsichten in die Funktion von Proteinen gewähren.

In meiner zukünftigen Arbeit möchte ich die Methoden, die ich während meiner Doktorarbeit entwickelt und angewendet habe, erweitern, um bioenergetische Reaktionen zu untersuchen. Besonders bin ich an der Kopplung von Elektronen- und Protonentransferreaktionen interessiert. Diese Kopplung ist die Grundlage für die meisten bioenergetischen Reaktionen, die an Membranen stattfinden. Um Prozesse an Membranen untersuchen zu können, ist es jedoch notwendig, die Membran in den elektrostatischen Rechnungen zu berücksichtigen, und es ist erforderlich, typische Membraneffekte, wie Membranpotential und Protonengradienten, zu berücksichtigen. Die theoretische Grundlage für die Berücksichtigung von Membranpotentialen in elektrostatischen Rechnungen wurden von Roux, 1997 gelegt. Ich möchte die elektrostatischen Methoden, die in Kapitel 4 beschrieben sind, mit Dichte-Funktional-Methoden kombinieren, um die pK_a von Aminosäuren, die an Metalle gebunden sind, zu berechnen. Ein weiteres interessantes Gebiet ist die Suche von Protonentransferpfaden in Proteinen. Eine Methode analog zu der, die zur Suche von Elektronentransferpfaden angewendet wird (Onuchic *et al.*, 1992), kann dazu verwendet werden. Der Protonentransfer durch Wasserstoffbrückenbindungen kann jedoch nicht in zwei Richtungen erfolgen. Auch das Verständnis des Dockings kleiner Moleküle (wie z. B. der Chinone) oder Proteine (wie z. B. Cytochrom c) an Membranproteine ist für das Verständnis bioenergetischer Reaktionen notwendig.

Wenn die biochemischen Reaktionssysteme strukturell verstanden sind, können Methoden zum Beschreiben enzymatischer Netzwerke (Heinrich & Schuster, 1996) helfen, um ein

besseres Verständnis der Wechselbeziehung der Komponenten der biologischen Reaktionssysteme zu erhalten. Das Wissen über die Struktur der Biomoleküle, das jetzt verfügbar ist und in Zukunft verfügbar sein wird, kann auch helfen, größere biologische Einheiten wie Organellen oder Zellen zu verstehen. Ich erwarte, daß in naher Zukunft theoretische Betrachtungen in den biologischen Wissenschaften eine ähnlich große Rolle spielen werden wie die Theorie in der Physik in der Vergangenheit und heute.

