

Simulationsrechnungen zur Untersuchung molekularer  
Mechanismen in P-Typ-ATPasen

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Physik  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

von

Christian Weidemüller  
aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main 2010

(D 30)



**VOM FACHBEREICH DER PHYSIK DER**

**JOHANN WOLFGANG GOETHE – UNIVERSITÄT ALS DISSERTATION ANGENOMMEN.**

**DEKAN: : Prof. Dr. Michael Huth**

**GUTACHTER : Prof. Dr. Karin Hauser**

**Prof. Dr. Werner Mänteke**

**DATUM DER DISPUTATION: .....**





## **Publikationen**

Weidemüller, C., Hauser, K.: "Ion transport and energy transduction of P-type ATPases: implications from electrostatic calculations", *Biochim. Biophys. Acta - Bioenergetics*, 2009, 1787, 721-729

Weidemüller, C., Siu, S., Böckmann, R., Hauser, K.: "Ion transport and energy transduction of P-type ATPases studied by simulations ", *Eur. Biophys. J. Suppl.* 1, 2009, 38, 59

Weidemüller, C., Hauser, K.: "A computational approach to study the energy transduction mechanism in the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase", in: "From Computational Biophysics to System Biology (CBSB08)", U.H.E. Hansmann, J. Meinke, S. Mohanty, W. Nadler, O. Zimmermann (eds.), ISBN 978-3-9810843-6-8, NIC Series, Jülich 2008, 40, 409-411

Weidemüller, C., Hauser, K.: "Impact of an electric field on P-type ATPases", *Spectroscopy*, 2008, 22, 319-325

## **Manuskripte in Vorbereitung**

Weidemüller, C., Barth, A., Hauser, K. : " Proton paths in the Ca<sup>2+</sup>-ATPases studied by electrostatic calculations"

Weidemüller, C., Siu, S., Böckmann, R., Hauser, K.: "The energy transduction of the Ca<sup>2+</sup>-ATPases studied by a combination of electrostatics and molecular dynamics simulations"

## **Vorträge**

Weidemüller, C.: "Proton pathways in the Calcium-ATPase studied by electrostatic calculations", The Annual Meeting of the German Biophysical Society, 4.10.2010, Bochum, Germany

Weidemüller, C.: "Energy transduction in P-type ATPase studied by simulations", Kolloquium des SFB 472 „Molekulare Bioenergetik“, 18.6.2008, Frankfurt am Main, Germany

## **Posterpräsentationen**

Weidemüller, C., Siu, S., Böckmann, R., Hauser, K. (2009): "Ion transport and energy transduction of P-type ATPases studied by simulations"; EBSA-European Biophysics Congress, Genoa, Italy

Weidemüller, C., Siu, S., Böckmann, R., Hauser, K. (2009): "The energy transduction of P-type ATPases studied by a combination of electrostatics and molecular dynamics simulations"; Workshop on Computer Simulation and Theory of Macromolecules, Hünfeld, Germany

Weidemüller, C., Hauser, K. (2008): "The energy transduction of P-type ATPases studied by a combination of electrostatics and molecular dynamics simulations"; Annual Meeting of the German Biophysical Society, Berlin, Germany

Weidemüller, C., Hauser, K. (2008): "Theoretical study of the energy transduction in P-type ATPases"; 12th International ATPase Conference, Aarhus, Denmark

Weidemüller, C., Hauser, K. (2008): "A computational approach to study the energy transduction mechanism in the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase"; Workshop "From Computational Biophysics to System Biology 2008", Jülich, Germany

Weidemüller, C., Hauser, K. (2007): "Impact of an electric field on P-type ATPases simulated by electrostatic calculations"; 12th European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules, Bobigny, France

# INHALTSVERZEICHNIS

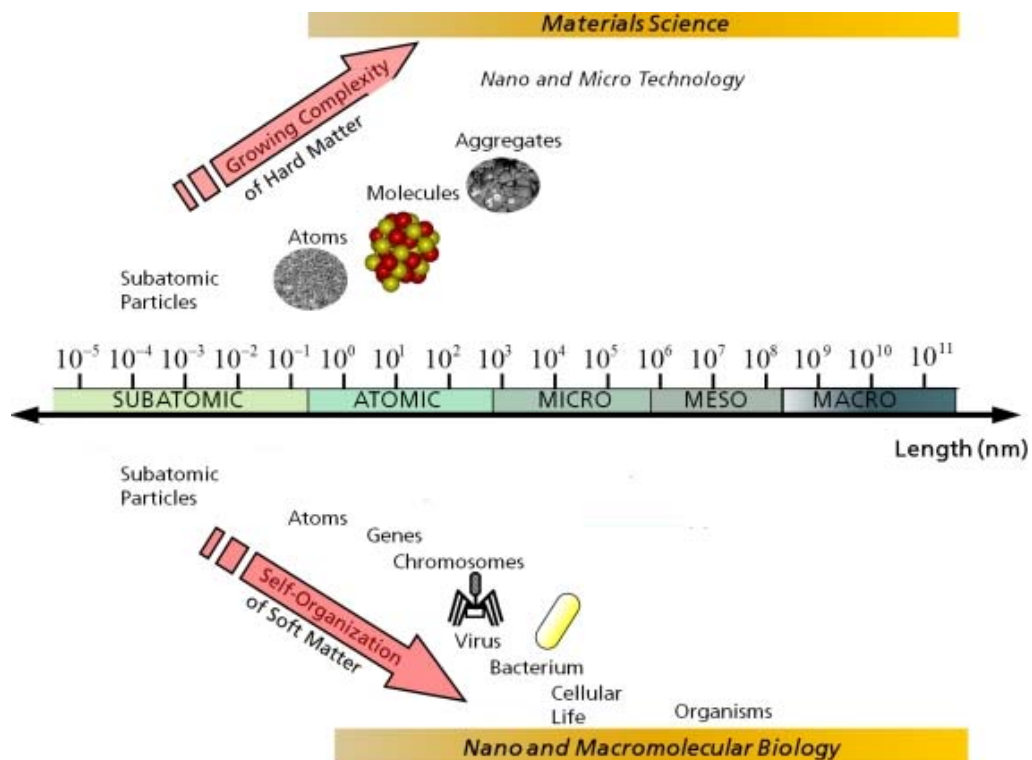
<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>PROTEINE .....</b>	<b>13</b>
2.1	WECHSELWIRKUNGSKRÄFTE IN PROTEINEN .....	17
2.2	ELEKTROSTATIK IN PROTEINEN .....	20
2.3	IONISIERUNGSGLEICHGEWICHTE IN PROTEINEN .....	22
<b>3</b>	<b>P-TYP-ATPASEN.....</b>	<b>25</b>
3.1	STRUKTUR UND FUNKTION DER $Ca^{2+}$ -ATPASE .....	27
3.2	STRUKTUR UND FUNKTION DER $Na^+/K^+$ -ATPASE .....	31
3.3	REAKTIONSZYKLUS.....	32
3.4	ENERGIETRANSDUKTION .....	34
3.5	IONENTRANSPORT UND PROTONENGEGENTRANSPORT IN DER $Ca^{2+}$ -ATPASE .....	36
<b>4</b>	<b>MOLEKULARE SIMULATION.....</b>	<b>40</b>
4.1	SIMULATIONEN AN P-TYP-ATPASEN.....	43
4.2	ELEKTROSTATIK-SIMULATIONEN.....	44
4.2.1	<i>Poisson-Boltzmann-Gleichung</i> .....	44
4.2.2	<i>Numerische Lösung der Poisson-Boltzmann-Gleichung</i> .....	47
4.2.3	<i>Die Finite-Differenzen-Methode</i> .....	47
4.3	MULTICONFORMATION CONTINUUM ELECTROSTATICS(MCCE)-METHODE.....	50
4.3.1	<i>Ablaufschema MCCE</i> .....	51
4.3.2	<i>Erstellen des Datenformats und Hinzufügen von Protonen</i> .....	52
4.3.3	<i>Erzeugen der Rotamere</i> .....	53
4.3.4	<i>Energieberechnung und Erstellen von Energietabellen</i> .....	54
4.3.5	<i>Simulierte pH- oder Eh-Titration</i> .....	55
4.4	MOLEKULARDYNAMIK-SIMULATION.....	57
4.4.1	<i>Fehlerbetrachtung der Simulationsmethoden</i> .....	63
4.5	STRUKTURDATEN .....	64
4.5.1	<i>Energietransduktion</i> .....	66
4.5.2	<i>Protonengegentransport in der <math>Ca^{2+}</math>-ATPase</i> .....	68
4.6	SIMULATIONSPARAMETER.....	71
4.6.1	<i>Simulationsparameter für MCCE</i> .....	71
4.6.2	<i>Simulationsparameter für MD-Simulationen</i> .....	72
4.7	HARD- UND SOFTWARERESSOURCEN .....	73

<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION .....</b>	<b>74</b>
5.1	ENERGIETRANSDUKTION IN P-TYP-ATPASEN .....	74
5.1.1	<i>Molekularer Kondensator .....</i>	76
5.1.2	<i>Auswertung der Elektrostatik-Rechnungen .....</i>	78
5.1.3	<i>Zusammensetzung der Transmembranhelices der Ca<sup>2+</sup>-ATPase.....</i>	80
5.1.4	<i>Zusammensetzung der Transmembranhelices der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase .....</i>	81
5.1.5	<i>Berechnung des SAS-Wertes der Transmembranhelices M1 - M10.....</i>	82
5.1.6	<i>MCCE-Simulationen an der Ca<sup>2+</sup>-ATPase .....</i>	83
5.1.7	<i>MCCE-Simulationen an der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase .....</i>	88
5.1.8	<i>Molekulardynamik-Simulationen der Ca<sup>2+</sup>-ATPase.....</i>	95
5.1.9	<i>Kombination von MD-Simulation und MCCE an der Ca<sup>2+</sup>-ATPase .....</i>	100
5.1.10	<i>Vergleich der simulierten Ca<sup>2+</sup>-ATPase-Zustände E1 und E2 .....</i>	108
5.1.11	<i>Kombination von MD-Simulationen und MCCE an der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase.....</i>	110
5.1.12	<i>Zusammenfassung der Energietransduktion in P-Typ-ATPasen .....</i>	114
5.2	PROTONENTRANSPORTWEG IN DER CA <sup>2+</sup> -ATPASE .....	116
5.2.1	<i>Einfügen der Wassermoleküle mit dem Programm Dowser.....</i>	120
5.2.2	<i>Bestimmung der Simulationsparameter.....</i>	121
5.2.3	<i>Protonierungen im E1P-Zustand mit und ohne Calciumionen .....</i>	124
5.2.4	<i>Protonierungen im E2P-Zustand.....</i>	134
5.2.5	<i>Protonierungen im E2-P-Zustand.....</i>	137
5.2.6	<i>Protonierungen im E2-Zustand.....</i>	138
5.2.7	<i>Protonierungen im E1-Zustand mit und ohne Calciumionen .....</i>	140
5.2.8	<i>pK-Werte der Aminosäuren im Transmembranbereich.....</i>	144
5.2.9	<i>Zusammenfassung des Protonentransportes in der Ca<sup>2+</sup>-ATPase.....</i>	146
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>151</b>
<b>7</b>	<b>LITERATUR.....</b>	<b>153</b>
<b>8</b>	<b>ABKÜRZUNGEN.....</b>	<b>165</b>
<b>9</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>166</b>
<b>10</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>168</b>
<b>11</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>169</b>

# 1 EINLEITUNG

Die meisten und vor allem die faszinierendsten Fragestellungen in den Naturwissenschaften betreffen Phänomene, die sich über mehrere Zeit- und Längenskalen erstrecken. Auch Prozesse, die vordergründig in einem bestimmten räumlichen oder zeitlichen Bereich ablaufen, beeinflussen ein System oftmals als Ganzes und können sich somit auf alle Zeit- und Längenskalen auswirken. So haben z.B. Wechselwirkungen auf der mikroskopischen Ebene auch Auswirkungen auf das Verhalten des zu untersuchenden Systems auf der makroskopischen Ebene. Dieses Phänomen ist nicht auf einzelne Disziplinen der Naturwissenschaften beschränkt und kann speziell bei der Untersuchung von biologischen Systemen beobachtet werden. Dabei handelt es sich oft um mikroskopische, komplexe, vierteilige Systeme, die miteinander wechselwirken oder kommunizieren.

Für die Biophysik ist es eine große Herausforderung, die Komplexität der lebenden Materie zu analysieren. Um beispielsweise die komplexen Vorgänge in biologischen Zellen zu verstehen, ist es erforderlich, die Funktionen und Strukturen der vielen einzelnen Komponenten zu untersuchen. Ein Schwerpunkt sowohl der biophysikalischen Grundlagenforschung als auch der anwendungsbezogenen Forschung in Industrie und Medizin bilden die Proteine. Diese sind mit einem großen Anteil in biologischen Zellen vertreten und bestimmen deren Funktion wesentlich.



**Abb. 1:** Schematische Darstellung der Längenskala in der Biologie und den Materialwissenschaften ( nach Steinhauser und Hiermaier 2009).

Das wissenschaftliche Interesse an Proteinen resultiert aus deren Funktionsvielfalt, z.B. der Katalyse von Reaktionen, dem Transport von Molekülen und Atomen über biologische Membranen und als stützende Gerüstbausteine in der Haut oder den Haaren. Aber nicht nur solche elementare Funktionen, sondern auch komplexere wie die Immunabwehr oder die Signalrezeption werden von Proteinen übernommen.

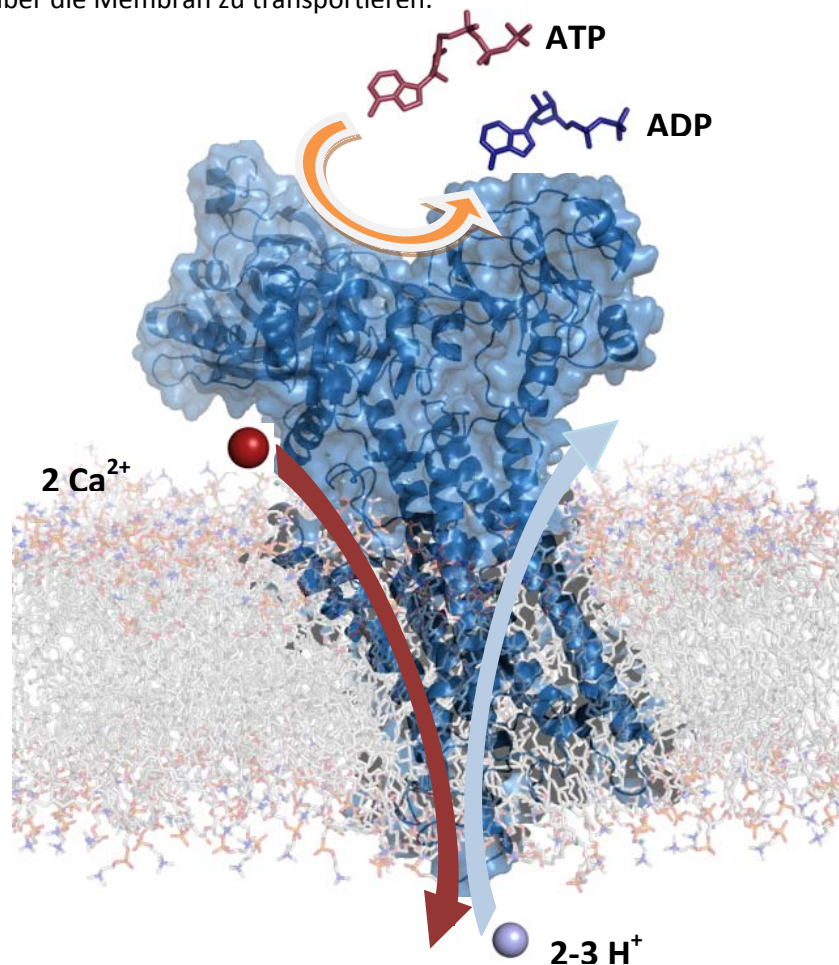
Die Familie der Membranproteine bildet unter allen Proteinen, die in Lebewesen vorkommen, eine große Gruppe. Ca. 30 % der bekannten Gene codieren Membranproteine (Wallin und von Heijne 1998). Diese integralen Membranproteine sind verantwortlich für eine Vielzahl von zellulären Prozessen. Grundlegend für viele dieser Prozesse ist die Verbindung verschiedener Zellkompartimente durch diese Membranproteine, dadurch können z.B. Substanzen über intrazelluläre Membranen in Organellen oder über Zellmembranen transportiert werden.

Um die Strukturen und Funktionen von Proteinen aufzuklären, werden die unterschiedlichsten experimentellen Methoden, wie z.B. spektroskopische oder biochemische Methoden, angewendet. Zunehmend werden aber auch computergestützte Methoden eingesetzt. Die enorme Leistungszunahme der Computer- und Programmier technik (z.B. schnellere Algorithmen und parallelisierte Programme) ermöglicht es, computergestützte Untersuchungen auch auf biologische Makromoleküle und deren komplexe Prozesse anzuwenden (van Gunsteren et al. 2006). Computergestützte Methoden haben sich zur Untersuchung der konformellen Dynamik und der damit verbundenen Beziehung zwischen Struktur und Funktion oder der elektrostatischen Eigenschaften und der molekularen Wechselwirkungen etabliert. Dabei beruhen die theoretischen Methoden, die verwendet werden, auf den grundlegenden physikalischen Gesetzen, die die Wechselwirkung und Bewegung von Atomen beschreiben, wie z.B. die Elektrostatik, die molekulare und statistische Mechanik sowie die Quantenmechanik.

Der Einsatz computergestützter Methoden hat einen Stand erreicht, auf dem diese komplementäre Informationen zu experimentellen Daten liefern oder sogar die Grundlage für die Interpretation von experimentell gewonnenen Informationen bilden. Der große Vorteil der computergestützten Methoden ist, dass auch Eigenschaften untersucht werden können, die nur sehr aufwendig oder gar nicht für Experimente zugänglich sind und damit auch Voraussagen von Reaktionsmechanismen ermöglicht werden.

Nachdem es lange Zeit nur sehr wenige Strukturuntersuchungen an Membranproteinen gab, liegt heute eine große Vielfalt von Membranproteinen als hochaufgelöste Strukturdaten vor (Torres et al. 2003, Carpenter et al. 2008).

Ausgehend von diesen Strukturdaten sollen in der vorliegenden Arbeit computergestützte Methoden auf die Membranproteinfamilie der P-Typ-ATPasen angewendet werden. Die P-Typ-ATPasen befinden sich in allen Domänen des Lebens, und sie stellen die größte Gruppe aktiver Ionentransporter in Zellen dar. Es handelt sich bei den P-Typ-ATPasen um integrale Membranproteine, die eine große Anzahl verschiedenster Ionen aktiv über eine biologische Membran transportieren. Die für den aktiven Transport benötigte Energie wird durch Hydrolyse von ATP freigesetzt und durch Phosphorylierung des Proteins auf die P-Typ-ATPasen übertragen. Die so gewonnene Energie muss dann innerhalb des Proteins zu den Ionenbindestellen transferiert werden, um die Ionen über die Membran zu transportieren.



**Abb. 2:** Schematische Darstellung der ionentransportierenden Ca<sup>2+</sup>-ATPase unter Verbrauch von ATP.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll der Mechanismus der Energietransduktion in P-Typ-ATPasen im Allgemeinen und der Mechanismus des Protonengegengentransports bzw. ein potentieller Protonentransportweg in der Ca<sup>2+</sup>-ATPase im Speziellen untersucht werden. Es liegen zwar sehr viele experimentelle Arbeiten über die P-Typ-ATPasen vor, aus denen auf deren biologische Funktion geschlossen werden kann, jedoch liefern diese noch keinen vollständigen Aufschluss über die Funktionsweise der beiden Mechanismen auf molekularer Ebene. Aus diesem Grund sollen diese

beiden oben genannten Mechanismen mittels computergestützter Methoden analysiert werden. Die P-Typ-ATPasen sind prädestiniert für computergestützte Untersuchungen, da für diese Proteinfamilie sehr viele hochaufgelöste Röntgenstrukturdaten vorliegen, wenn auch bisher aufgrund der Größe und der Komplexität des Systems nur sehr wenige theoretische Arbeiten durchgeführt wurden. Weiterhin liegen für diese Proteinfamilie umfangreiche experimentelle Daten aus verschiedensten Untersuchungsmethoden vor, sodass die durch Simulation gewonnenen Daten mit denen aus Experimenten verglichen und verifiziert werden können. Gestützt auf diese experimentell verifizierten Simulationsdaten können neue, biologisch relevante Schlüsse gezogen bzw. komplementäre Erkenntnisse zu den bisher aus Experimenten bekannten hinzugefügt werden. Weiterhin besteht die Möglichkeit, die aufgrund von Experimenten formulierten Hypothesen zu überprüfen.

Zur Untersuchung des Energietransduktionsmechanismus in P-Typ-ATPasen soll mittels Elektrostatik-Rechnungen der Einfluss eines elektrischen Feldes auf die verschiedenen Transmembranhelices untersucht werden. Dazu soll ein Simulationssystem entwickelt werden, welches aus einem molekularen Kondensator besteht, der im Simulationsmodell das Anlegen eines homogenen elektrischen Feldes über den Transmembranbereich ermöglicht.

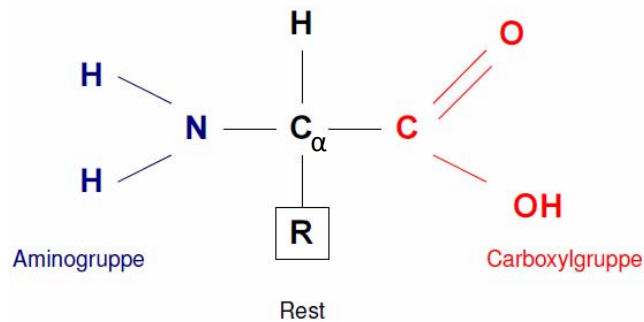
Da es sich bei dem Energietransduktionsmechanismus um einen dynamischen Prozess handelt, sollen die Elektrostatik-Rechnungen um Molekulardynamik-Simulationen erweitert werden. Diese ermöglichen, die konformelle Dynamik der P-Typ-ATPasen während der Energietransduktion in die Elektrostatik-Rechnungen einzubeziehen.

Um einen möglichen Protonentransportweg durch die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase zu identifizieren, sollen in die Röntgenkristallstrukturen der verschiedenen Enzymzustände explizite Wassermoleküle eingefügt werden. Aus experimentellen Daten ist bekannt, dass in der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase ein Protonengegentransport stattfindet, und zwar entlang von Wassermolekülen und titrierbaren Aminosäuren. Aus diesem Grund sollen mittels Elektrostatik-Rechnungen die Protonierungen der eingefügten expliziten Wassermoleküle sowie der titrierbaren Aminosäuren für verschiedenen Enzymzustände der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase bestimmt werden. Anhand dieser Protonierungszustände in den einzelnen Enzymzuständen lässt sich ein möglicher Protonenweg und ein Mechanismus des Protonengegentransportes postulieren.



## 2 PROTEINE

Proteine sind die wichtigsten biologischen Makromoleküle, die in der Natur auftreten. Trotz ihrer vielfältigen Aufgaben und Funktionen bestehen alle Proteine nur aus 20 verschiedenen Aminosäuren in unterschiedlichen Anordnungen. Die einzelnen Aminosäuren setzen sich aus einer Aminogruppe (-NH<sub>2</sub>), einer Carboxylgruppe (-COOH), einem Wasserstoffatom (H) und einer Restgruppe (R) zusammen. Diese einzelnen Gruppen sind über ein zentrales Kohlenstoffatom (C<sub>α</sub>) miteinander verbunden (Abb. 3). Die Aminogruppe und die Carboxylgruppe gehen eine starke kovalente Bindung mit diesem zentralen Kohlenstoffatom ein. Die Restgruppe bezeichnet man als Seitenkette der Aminosäure. Die Seitenketten unterscheiden sich z.B. bezüglich der Größe, Ladung und Polarität und legen somit die physikochemischen Eigenschaften der jeweiligen Aminosäure fest.



**Abb. 3:** Schematische Darstellung einer Aminosäure. Auf der linken Seite ist die Aminogruppe (blau) und auf der rechten Seite die Carboxylgruppe (rot) abgebildet. Diese sind verbunden über das zentrale Kohlenstoffatom. Die verschiedenen Reste der Aminosäure sind schematisch durch ein "R" dargestellt (nach Stryer 2007).

Physikochemische Eigenschaft	Aminosäure
Neutral-polar	Serin, Threonin, Cystein, , Asparagin und Glutamin
Aliphatisch	Glycin, Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Prolin und Methionin
Aromatisch	Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan
Sauer	Glutaminsäure und Asparaginsäure
Basisch	Arginin, Lysin und Histidin

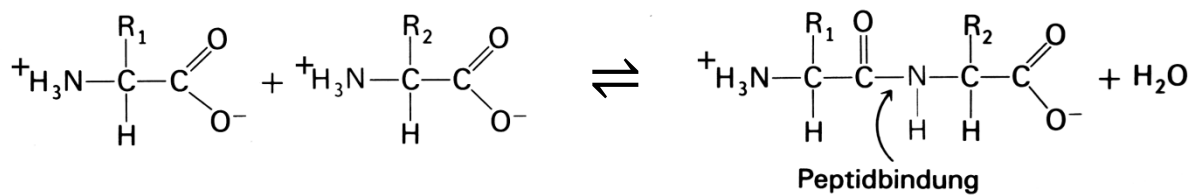
**Tabelle 1:** Physikochemische Eigenschaften von Aminosäuren<sup>1</sup> (nach Müller-Esterl 2004).

Abhängig von der Eigenschaft der Seitenkette, polar oder unpolar zu sein, werden die Aminosäuren in hydrophile (polare) und hydrophobe (apolare) Gruppen eingeteilt. Polare Gruppen neigen dazu, hydratisiert zu werden, apolare Seitenketten dagegen weisen Wasser ab. Eine weitere Einteilung in

<sup>1</sup> Eine Übersicht der Strukturformeln und des Dreibuchstabencodes aller Aminosäuren findet sich im Anhang.

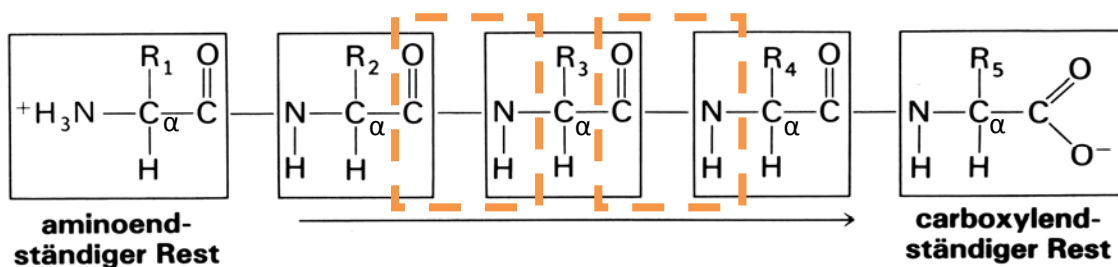
saure und in basische Aminosäuren basiert auf dem Ladungszustand der Seitenketten. Des Weiteren lassen sich die Aminosäuren in aromatische und aliphatische Gruppen einteilen. Bei beiden bestehen die Seitenketten nur aus Kohlenstoff- und Wasserstoffatomen. Als aromatische Aminosäuren werden jene bezeichnet, bei denen die Kohlenstoffseitenkette als Ring vorliegt.

Die einzelnen Aminosäuren sind in einem Protein über die Peptidbindung miteinander verbunden. Diese Bindung hat den Charakter einer partiellen Doppelbindung und entsteht zwischen der Carboxylgruppe der einen Aminosäure und der Aminogruppe der anderen unter Abspaltung von Wasser.



**Abb. 4:** Schematische Darstellung der Bindung zweier Aminosäuren mittels der Peptidbindung unter Abspaltung von Wasser (nach Stryer 2007).

Durch diese Verkettung der einzelnen Aminosäuren zu langen, unverzweigten, linearen Ketten entsteht eine Polypeptidkette, die als Rückgrat des Proteins bezeichnet wird.

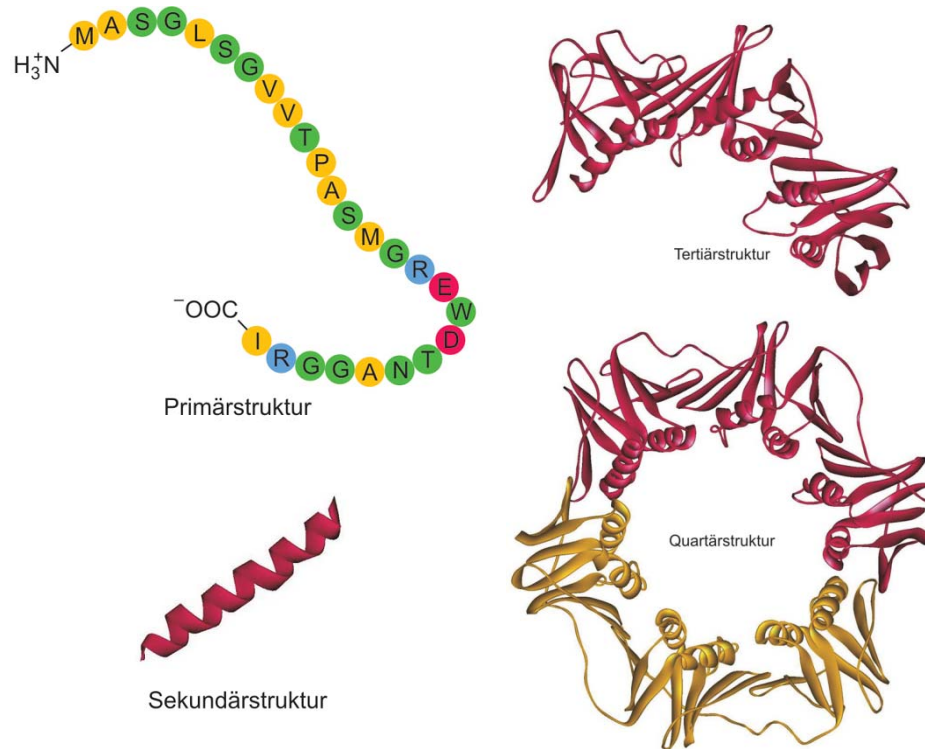


**Abb. 5:** Schematische Darstellung einer Polypeptidkette, repräsentiert durch fünf Aminosäuren (schwarze Umrandung), beginnend bei dem aminoendständigen Rest (N-Terminus) und endend bei dem carboxylendständigen Rest (C-Terminus). Zwei Peptidgruppen sind exemplarisch in orange markiert (nach Stryer 2007).

Die Peptidgruppe ist aufgrund des partiellen Doppelbindungscharakters der Peptidbindung planar und starr. Sie ist somit auch nicht rotierbar. Die Bindungen zwischen N-C<sub>α</sub> und C-C<sub>α</sub> sind hingegen weitgehend frei drehbar.

Aufgrund der vielen möglichen Kombinationen sowohl in der Anzahl (wenige bis hin zu vielen tausend Aminosäuren) als auch in der Abfolge der Aminosäuren in einer Polypeptidkette entsteht eine außerordentliche Vielfalt von Proteinen mit den unterschiedlichsten Funktionen. Die Funktionsfähigkeit eines Proteins wird durch die Faltung der Polypeptidkette in eine für das Protein

spezifische dreidimensionale Struktur erreicht. Dabei lässt sich die Struktur eines Proteins in vier Ebenen einteilen (Abb. 6).



**Abb. 6:** Darstellung der vier Strukturebenen. Beginnend bei der linearen Abfolge der Aminosäuren (Primärstruktur), über die räumliche Organisation benachbarter Aminosäuren (Sekundärstruktur), in die räumliche Anordnung mehrerer solcher benachbarter Faltungsmotive (Tertiärstruktur) bis hin zur Anordnung mehrerer Untereinheiten zum vollständigen, biologisch funktionierenden System (Quartärstruktur) (nach Müller-Esterl 2004).

Man unterscheidet dabei folgende Ebenen:

- **Primärstruktur:** So wird die Sequenz der Aminosäuren innerhalb der Polypeptidkette bezeichnet. Die Sequenz ist in den Genen der jeweiligen Spezies kodiert.
- **Sekundärstruktur:** Damit bezeichnet man lokale Struktur motive innerhalb einer Polypeptidkette, die durch die Faltung der Kette zustande kommen. Typische Sekundärstruktur motive sind  $\alpha$ -Helices,  $\beta$ -Faltblätter, Schleifen (Turns) oder ungeordnete Strukturen (Random Coil). Die  $\alpha$ -Helix entsteht durch die Verdrillung der Polypeptidkette und wird durch Wasserstoffbrücken zwischen C=O- und N-H-Gruppen stabilisiert. Im Gegensatz dazu wird beim  $\beta$ -Faltblatt die Stabilität zwischen zwei gestreckten Peptidketten, die sich parallel zueinander anordnen, mittels Wasserstoffbrücken zwischen den beiden Ketten erzielt. Dabei bilden sich die Wasserstoffbrücken ebenfalls über die C=O- und N-H-Gruppen aus.

- **Tertiärstruktur:** Dies ist die Bezeichnung für die Verbindung der Sekundärstrukturmotive und ihrer räumlichen Anordnung zueinander. Die Tertiärstruktur beschreibt somit die dreidimensionale Struktur des Proteins.
- **Quartärstruktur:** So wird die dreidimensionale Anordnung mehrerer Polypeptidketten (Untereinheiten) eines Proteins zueinander bezeichnet. Diese entstehen durch nicht-kovalente Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Untereinheiten.

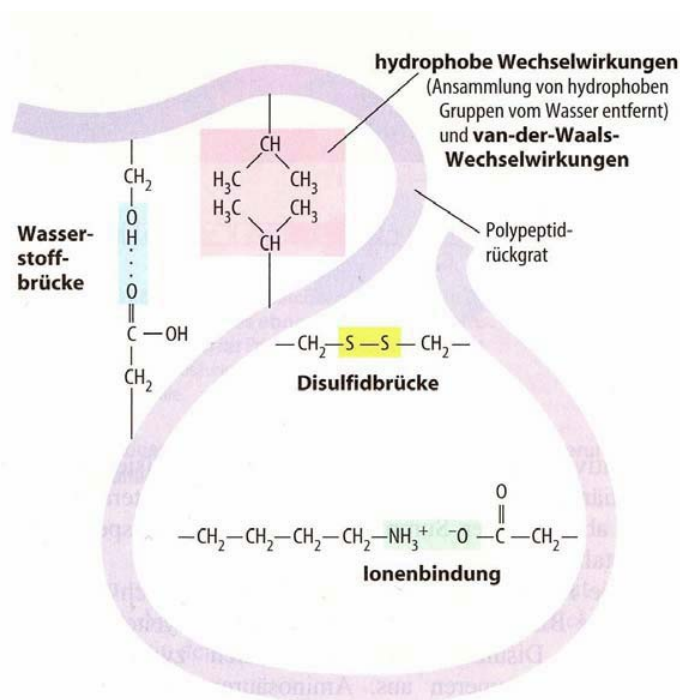
Die vollständige Funktionsfähigkeit eines Proteins ist aber in vielen Fällen erst dann gegeben, wenn außer der korrekt dreidimensional gefalteten Polypeptidkette noch zusätzliche organische oder anorganische Kofaktoren, wie z.B. die Häm-Gruppe eines Cytochroms, gegeben sind. Die Faltung der Polypeptidkette in die dreidimensionale Struktur beruht hauptsächlich auf den Wechselwirkungen der Aminosäuren untereinander und auf den Wechselwirkungen des Proteins bzw. der Aminosäuren mit der Umgebung, z.B. mit dem umgebenden Solvens (nach Creighton 1993, Müller-Esterl 2004 und Stryer 2007). Diese, für die Struktur so wichtigen Wechselwirkungen, sollen im nächsten Kapitel eingehend beschrieben werden.

## 2.1 Wechselwirkungskräfte in Proteinen

Für die Struktur eines Proteins sind sowohl kovalente als auch nichtkovalente Wechselwirkungen wichtig. Eine kovalente Bindung entsteht durch die Überlappung der Orbitale zweier Atome. Durch diese Überlappung ist die Bindung gerichtet und sie gehört zu den stärksten Wechselwirkungen innerhalb eines Proteins. Die Energie dieser Bindung reicht bis zu 500 kJ/mol und besitzt atomspezifische Abstände und Bindungswinkel. Eine weitere kovalente Bindung sind Disulfidbrücken zwischen Cysteinen. Diese sorgen für eine erhöhte Proteinstabilität, da sie sich zwischen verschiedenen Untereinheiten bzw. gegenüberliegenden Strängen derselben Polypeptidkette ausbilden können.

Die nichtkovalenten Wechselwirkungen umfassen folgende vier Wechselwirkungskräfte:

- ionische Bindung
- Wasserstoffbrückenbindung
- van-der-Waals-Wechselwirkungen
- hydrophobe Wechselwirkungen

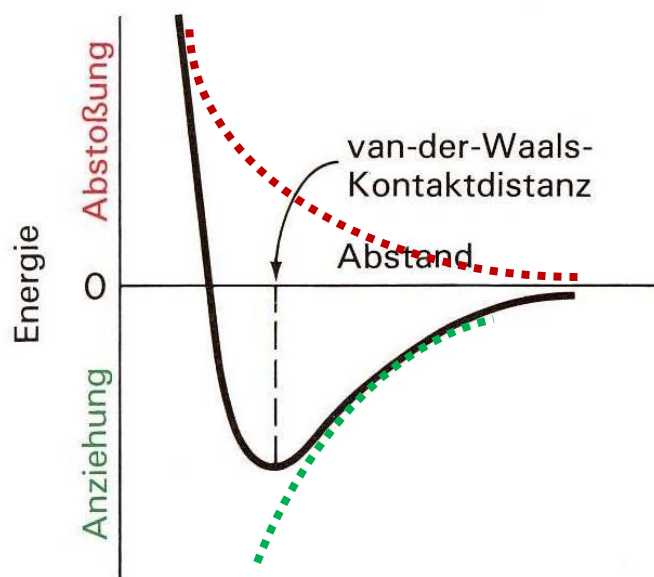


**Abb. 7:** Wechselwirkungen in Proteinen. Dargestellt sind die Disulfidbrücken (gelb), die Ionenbindung (grün), die Wasserstoffbrückenbindungen (blau) und die hydrophoben Wechselwirkungen (rot) (Campbell und Reece 2003).

Die ionische Bindung zwischen zwei geladenen Aminosäuren (Ion-Ion-Wechselwirkung) bzw. zwischen einer geladenen Gruppe und einem Dipol (Ion-Dipol-Wechselwirkung) weisen

Wechselwirkungsenergien auf, die typischerweise im Bereich von 30-100 kJ/mol liegen. Somit gehört die ionische Bindung ebenso wie die kovalente Bindung zu den starken Wechselwirkungsenergien innerhalb eines Proteins oder Biomoleküls. Da die ionische Bindung elektrostatischen Ursprungs ist, lässt sie sich klassisch mittels des Coulomb-Gesetzes beschreiben.

Wasserstoffbrückenbindungen bilden sich zwischen einem elektronegativen Atom (Protonenakzeptor A) und einem Wasserstoffatom aus, das kovalent an ein anderes elektronegatives Atom (Protonendonator D) gebunden ist, z.B. (O-H, N-H). Wasserstoffbrückenbindungen übernehmen eine wichtige Funktion für die Strukturbildung eines Proteins ebenso wie die ionische Bindung. Insbesondere für die Ausbildung der Sekundärstruktur sind diese Wechselwirkungen wichtig. Die typischen Energien für Wasserstoffbrückenbindungen liegen bei 10-30 kJ/mol.



**Abb. 8:** Van-der-Waals-Wechselwirkung zwischen zwei Atomen. Eingezeichnet sind die anziehenden und die abstoßenden Kräfte und die daraus resultierende van-der-Waals Kraft, die durch das Lennard-Jones-Potential angenähert werden kann (nach Stryer 2007).

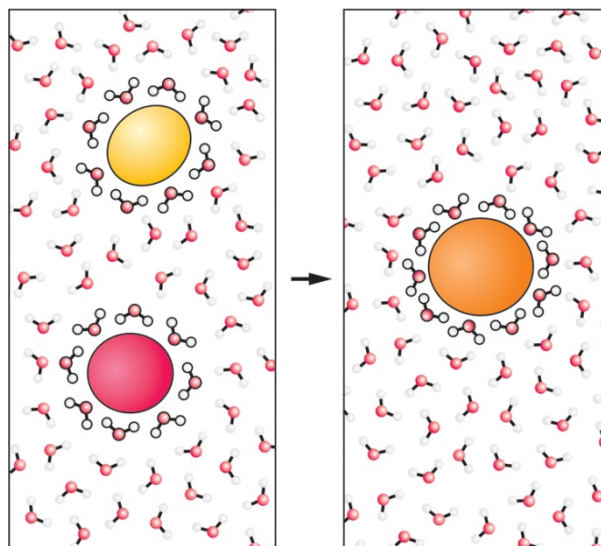
Die van-der-Waals-Wechselwirkung beruht auf der Wechselwirkung von Atomen und Molekülen, die sich gegenseitig aufgrund der induzierten Polarisierungseffekte anziehen. Diese können sich zwischen permanenten Dipolen, zwischen permanenten und induzierten Dipolen und zwischen induzierten Dipolen ausbilden. Die Polarisierungseffekte entstehen durch die thermische Bewegung der Atome. Die van-der-Waals-Kräfte sind die schwächsten Wechselwirkungen im Protein. Sie besitzen nur geringe Reichweiten und typische Bindungsenergien von nur wenigen kJ/mol und sind somit im Energiebereich der thermischen Bewegung ( $kT \approx 2,5$  kJ/mol bei Raumtemperatur). Sie lassen sich durch das Lennard-Jones-Potential beschreiben

$$V = 4\varepsilon \left[ \left( \frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma}{r} \right)^6 \right]$$

wobei  $V$  das Potential,  $r$  der Abstand zwischen den Atomen,  $\epsilon$  die Potentialtiefe des Energieminimums und  $\sigma$  ein stoffspezifischer Faktor ist. In dieser Gleichung beschreibt der erste Term den abstoßenden und der zweite Term den anziehenden Teil. Die Abstoßung beruht auf der Pauli-Abstoßung zweier Atome mit überlappenden Elektronenorbitalen und der anziehende Anteil beruht auf den van-der-Waals Kräften.

Die Umgebung, in der sich Proteine vorwiegend befinden, bewirkt eine weitere, nicht zu vernachlässigende Wechselwirkung. Da die Proteine elektrisch nicht neutral sind, wechselwirken sie mit den umgebenden dipolaren Wassermolekülen. Dadurch richtet die Ladung des Proteins die permanenten und induzierten Dipolmomente der Wassermoleküle aus und polarisiert die Wasserumgebung des Proteins. Die Folge ist eine attraktive Wechselwirkung zwischen dem Protein und den Wassermolekülen, die man als Solvatation bezeichnet.

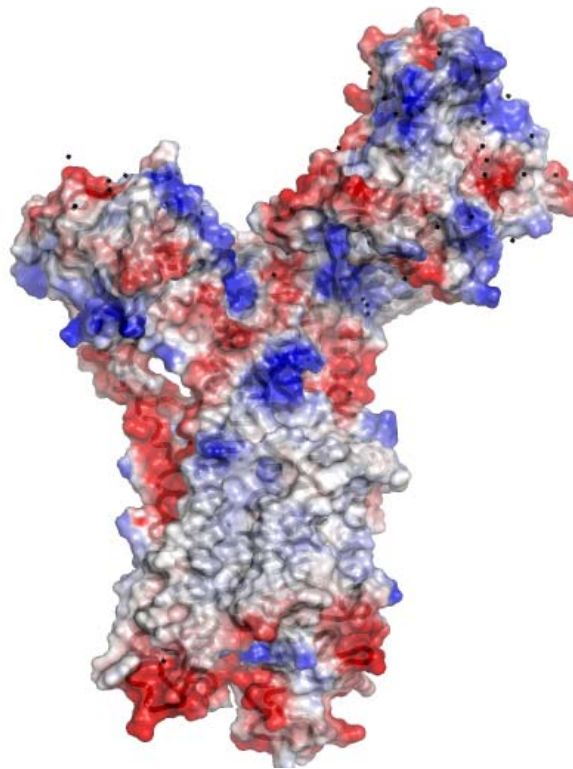
Als hydrophoben Effekt bezeichnet man den Prozess, der den Kontakt von unpolaren Substanzen mit dem umgebenden Wasser minimiert. Der Effekt beruht darauf, dass unpolare Substanzen keine Wasserstoffbrückenbindungen mit den umgebenden Wassermolekülen ausbilden können. Daher stören die unpolaren Substanzen die Struktur des Wasser. Diese Störung wird minimiert, wenn sich die unpolaren Substanzen zusammenlagern. Es handelt sich bei dem hydrophoben Effekt um einen Entropieeffekt, da die Zusammenlagerung der unpolaren Substanzen und die Neuausrichtung der Wassermoleküle die Entropie im System erniedrigt.



**Abb. 9:** Der hydrophobe Effekt begünstigt die Zusammenlagerung (orange) zweier unpolarer Substanzen (rot und gelb) in Wasser (Müller-Esterl 2004).

## 2.2 Elektrostatik in Proteinen

Elektrostatische Wechselwirkungen sind essentiell für nahezu alle biologischen Systeme und Prozesse (Honig et al. 1993, Warshel und Papazyan 1998). Proteine enthalten eine Vielzahl von ionisierbaren Gruppen, deren Ladungszustand mit den funktionellen Eigenschaften des jeweiligen Moleküls zusammenhängt. Typische Beispiele für solche Prozesse sind die Bindung von spezifischen Substraten an das Protein in geladenen Bindetaschen (Protein-Liganden-Wechselwirkung) oder der Transport von Molekülen und Ionen. Die elektrostatischen Wechselwirkungen sind aber auch für die Stabilität bzw. die Ausbildung von Strukturelementen in einem Protein (intramolekulare Wechselwirkungen) verantwortlich. Speziell für die Funktion sind aber nicht nur die intramolekularen, sondern vor allem auch die intermolekularen Wechselwirkungen wesentlich, da sich z.B. elektrische Ladungen nicht nur in Proteinen, sondern auch in Nukleinsäuren oder Phospholipiden befinden.



**Abb. 10:** Oberflächenladungsverteilung der Ca<sup>2+</sup>-ATPase. Dabei sind die negativen Potentialoberflächen rot und die positiven Potentialoberflächen blau dargestellt. Die weißen Oberflächenbereiche sind neutral.

Die elektrostatischen Wechselwirkungen gehören zu den nicht gebundenen Wechselwirkungen. Als solche sind sie sehr langreichweitig und nicht auf eine einzelne Bindung zwischen zwei Atomen festgelegt. Lösungen mit einem stark polaren Charakter, wie z.B. Wasser, üben einen starken Einfluss auf die elektrostatischen Wechselwirkungen aus. Deshalb müssen weitere Effekte, die auf das Protein und seine Umgebung einwirken, berücksichtigt werden. Zu diesen gehören z.B. die



Umorientierung von Dipolen sowie die Anordnung von Wassermolekülen um das Protein (siehe Kapitel 2.1).

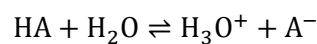
Die elektrostatischen Wechselwirkungen lassen sich in klassischer Näherung durch das Coulomb-Gesetz beschreiben. Dieses Gesetz kann aber die meisten der zuvor beschriebenen Effekte nicht erfassen und liefert somit nur eine grobe Näherung an die realen Wechselwirkungen. Mittels der Poisson-Boltzmann-Gleichung lassen sich die elektrostatischen Wechselwirkungen in biologischen Systemen genauer beschreiben (siehe Kapitel 4.2.1). Mit dieser Gleichung lässt sich nicht nur die Proteinstruktur, sondern auch der Einfluss der Gegenionen des umgebenden Mediums berücksichtigen. Dies ist sehr wichtig für eine genaue Berechnung des elektrostatischen Potentials, da diese sowohl die elektrostatischen Wechselwirkungen der geladenen Seitenketten mit den restlichen Seitenketten als auch die elektrostatischen Wechselwirkungen mit dem umgebenden Solvens beeinflussen.

Selbst mit diesem vereinfachenden Modell aus der Poisson-Boltzmann-Theorie ist es eine mathematische und computertechnische Herausforderung, die elektrostatischen Potentiale von Biomolekülen zu berechnen. Die wesentliche Herausforderung ist dabei die große Anzahl von Ladungen, die innerhalb eines biologischen Komplexes vorliegt und die Anzahl der Ladungen mit dem Quadrat in die Berechnung eingeht (Koehl 2006).

Grundsätzlich lassen sich die elektrostatischen Methoden zur Berechnung der elektrostatischen Wechselwirkungen, je nach Betrachtung des Solvens, in explizite und in implizite Methoden einteilen. Die explizite Betrachtung ermöglicht eine exakte Modellierung eines biologischen Systems, sie führt aber zu einer starken Vergrößerung des zu simulierenden Systems (Ren und Ponder 2003). Dies liegt vor allem daran, dass zur Solvation des zu simulierenden biologischen Systems oft wesentlich mehr Wassermoleküle eingefügt werden müssen als Atome im Protein vorhanden sind. Somit steigt die Rechenzeit, die für die Simulation aufgewendet werden muss, sehr schnell an. Der implizite Ansatz repräsentiert das Solvens als ein Dielektrikum und erlaubt damit, ein Modell aus der Kontinuumselektrostatik anzuwenden (Baker 2005, Davis und MacCammon 1990, Honig und Nicolls 1995, Warshel und Papazyan 1998).

## 2.3 Ionisierungsgleichgewichte in Proteinen

Als Ionisierungsgleichgewicht wird das Gleichgewicht bezeichnet, bei dem in jeweils gleicher Konzentration die saure und die basische Form eines Moleküls vorliegt. Nach der Definition von Brønsted und Lowry bezeichnet man den protonierten Zustand eines Moleküls als dessen saure Form und den unprotonierten Zustand als basische Form des Moleküls. Somit sind Säuren Protonendonatoren und Basen Protonenakzeptoren. Nach dieser Definition lässt sich die Säure-Base-Reaktion wie folgt darstellen



Dabei ist HA eine Säure, die mit einer Base  $\text{H}_2\text{O}$  unter Bildung der konjugierten Säure  $\text{H}_3\text{O}^+$  und der konjugierten Base  $\text{A}^-$  reagiert. Diese Reaktionsgleichung wird in der Regel abgekürzt mit



welches implizit voraussetzt, dass die Reaktion mit Wasser stattfindet. Diese Dissoziationsreaktion einer Säure HA ist durch die Dissoziationskonstante K für verdünnte, wässrige Lösungen charakterisiert

$$K = \frac{[\text{H}^+][\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$$

K beschreibt das Gleichgewicht zwischen der geladenen Form und der neutralen Form der zu betrachtenden Säure und ist damit ein Maß für die relative Protonenaffinität des konjugierten Säure-Base-Paares.

Aus dieser Gleichung für die Dissoziationskonstante lässt sich der pK-Wert herleiten. Dazu wird Gleichung nach  $[\text{H}^+]$  aufgelöst und der negative dekadische Logarithmus gebildet

$$-\log[\text{H}^+] = -\log K - \log \frac{[\text{HA}]}{[\text{A}^-]}$$

mit der Definition des pH- und des pK-Wertes

$$\text{pH} = -\log[\text{H}^+] \text{ und } \text{pK} = -\log K$$

ergibt sich die Henderson-Hasselbalch-Gleichung

$$\text{pH} = \text{pK} + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$$

Diese beschreibt das Säure-Base-Gleichgewicht einer dissoziierten Base in Abhängigkeit vom pH-Wert. Für den Fall, dass  $[A^-] = [HA]$  ist, ist der negative dekadische Logarithmus gleich null und die Gleichung reduziert sich zu (nach Atkins 2006)

$$\text{pH} = \text{pK}$$

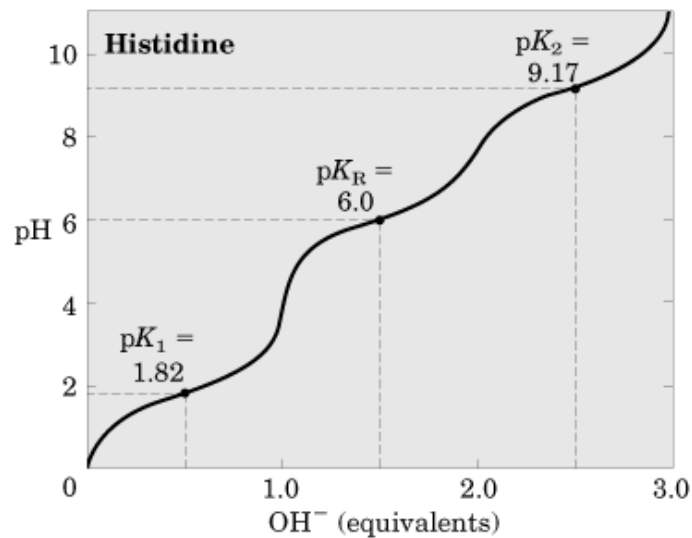
Somit ist der pK-Wert der pH-Wert, bei dem die Konzentration der sauren Form gleich der Konzentration der basischen Form ist.

In Proteinen gibt es spezielle Aminosäuren, die titrierbar sind (Tabelle 2). Die Seitenketten dieser Aminosäuren können Protonen aufnehmen oder abgeben, wodurch der Ladungszustand der Aminosäure verändert wird. Wendet man die Definition des pK-Wertes auf Aminosäuren an, so bedeutet das für die titrierbaren Aminosäuren, dass bei ihrem spezifischen pK-Wert 50 % der ionisierbaren Gruppen protoniert und 50 % der ionisierbaren Gruppen deprotoniert vorliegt. Somit lässt sich am pK-Wert feststellen, wann eine Aminosäure den ionisierten Zustand einnimmt, bzw. es lässt sich für einen gegebenen pH-Wert der Anteil der de- bzw. protonierten ionisierbaren Gruppe bestimmen.

Aminosäure	pK-Wert	Form
Arginin	12	basisch
Asparaginsäure	3,8	sauer
Glutaminsäure	4,3	sauer
Lysin	10,5	basisch
Histidin	6,0	neutral

**Tabelle 2:** pK-Werte der ionisierbaren Aminosäuren in wässriger Lösung bei pH = 7 (Forsyth et al. 2002). In Proteinen können außer den Seitenketten der oben genannten Aminosäuren auch noch die terminale COOH- und NH<sub>2</sub>-Gruppe de- bzw. protoniert werden.

Die gegebenen Referenz-pK-Werte gelten für Aminosäuren, die sich in einer wässrigen Lösung befinden. Diese Referenz-pK-Werte können mit den pK-Werten von Aminosäuren in Proteinen übereinstimmen. Dies ist im Allgemeinen aber nur dann der Fall, wenn die Polypeptidkette noch ausgestreckt im Solvens vorliegt. Nach der Faltung der Polypeptidkette in die native dreidimensionale Konformation des Proteins werden viele Aminosäuren eines Proteins nicht von einer wässrigen Lösung (hydrophile Umgebung), sondern von dem Protein selbst umgeben (hydrophobe Umgebung). Auch wenn die meisten geladenen Aminosäuren auf der Oberfläche des Proteins lokalisiert sind, befinden sich oftmals geladene, meist funktionelle Aminosäuren innerhalb des Proteins. Somit ist das Ionisierungsgleichgewicht bzw. der pK-Wert einer Aminosäure im Protein von mehreren Faktoren abhängig.



**Abb. 11:** Titrationskurve der Aminosäure Histidin in wässriger Lösung. Die Aminosäure His besitzt einen pK-Wert im sauren Bereich, den  $pK_1$ -Wert der COOH-Gruppe. Der  $pK_2$ -Wert der  $NH_2$ -Gruppe liegt im basischen. Der  $pK_R$ -Wert der Seitenkette liegt dagegen im neutralen Bereich (nach Nelson und Cox 2000).

Die Aminosäuren werden beeinflusst durch die Umgebung, in der sie lokalisiert sind. Weiterhin wechselwirken die Aminosäuren sowohl auf der Oberfläche als auch im Inneren des Proteins miteinander. Ebenfalls ist der zugängliche Konformationsraum der Aminosäureseitenketten innerhalb des Proteins beschränkt. Auch dies kann zu einer Verschiebung des pK-Wertes führen, da im Vergleich zu den pK-Werten in wässriger Lösung, unterschiedliche Wechselwirkungen durch die unterschiedlichen Konformationen der Seitenketten entstehen. Aus diesem Grund kann der intrinsische pK-Wert einer Aminosäure im Protein um mehrere Einheiten verschoben sein (Antosiewicz et al. 1996, Kim et al. 2005). Da der Ionisierungszustand von Aminosäuren oft mit den funktionellen Aufgaben des Proteins verknüpft ist, ist die genaue Bestimmung der pK-Werte von Aminosäuren essentiell. So sind z.B. 65 % der Aminosäuren in den aktiven Zentren von katalytischen Enzymen ionisierbare Aminosäuren (Bartlett et al. 2002).

### 3 P-TYP-ATPASEN

Die Phosphorylierungs-Typ-Adenosinriphosphatasen (P-Typ-ATPasen) stellen die größte Gruppe aktiver Transportsysteme in Zellen dar (Bublitz et al. 2010). Man findet sie in allen Domänen des Lebens, d.h. in Eukaryoten, Archaea und Bakterien. Nach der Einteilung von Pedersen und Carafoli gibt es außer den P-Typ-ATPasen noch F- und V-Typ-ATPasen, die hauptsächlich Protonen transportieren (Pedersen und Carafoli 1987). Ebenso gehören auch die ABC-Transporter zu den ATPasen, die eine Vielzahl von verschiedenen Substraten aktiv durch die Membran transportieren (Pedersen 2007, Wuytack 2009). Die P-Typ-ATPasen sind integrale Membranproteine, die nach dem Mechanismus benannt wurden, mit dem diese Überfamilie von Proteinen aktiv die verschiedensten anorganischen ein- oder zweiwertigen Kationen transportiert. Dies geschieht entweder über Zellmembranen oder über intrazelluläre Membranen in Organellen, z.B. das *Endoplasmatische* oder das *Sarkoplasmatische Retikulum*. Die für den aktiven Transport gegen einen Konzentrationsgradienten benötigte Energie wird durch Hydrolyse von ATP freigesetzt (Pedersen und Carafoli 1987, Moller et al. 1996). Während des aktiven Transportes entsteht ein kovalent gebundenes, energiereiches Aspartylphosphat-Intermediat durch die Übertragung der  $\gamma$ -Phosphatgruppe des hydrolysierten ATPs auf ein spezifisches Aspartat (Asp 351). Dieses befindet sich in einem hochkonservierten Aminosäuresequenzmotiv DKTGTLT in der P-Domäne des Proteins (Green und MacLennan 1989).

Seit der Entdeckung der ersten P-Typ-ATPase durch Jens Christian Skou 1957, für die er 1997 den Nobelpreis in Chemie erhielt (Skou 1957), wurden und werden diese Proteine intensiv untersucht. Ein Grund für dieses Interesse an den P-Typ-ATPasen ist durch die Vielzahl von fundamentalen Prozessen in der Biologie, an denen sie beteiligt sind, gegeben. Aber nicht nur für die Grundlagenforschung sind die P-Typ-ATPasen von Bedeutung, sondern auch für Mediziner und Pharmakologen, da sie ebenfalls potentielle Zielproteine für Medikamente sind (Yatime et al. 2009). Die Funktionen der P-Typ-ATPasen reichen von der Beteiligung an der Erzeugung des Ruhemembranpotentials ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase), über die Muskelrelaxation ( $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase) bis hin zur Produktion der Magensäure ( $\text{H}^+/\text{K}^+$ -ATPase). Man nimmt an, dass der molekulare Reaktionsmechanismus bei allen Mitgliedern dieser Familie ähnlich abläuft.

Auch wenn bei den P-Typ-ATPasen eine Strukturähnlichkeit sowie konservierte Sequenzanteile vorliegen, so unterscheiden sie sich doch grundsätzlich von anderen ATPasen. Axelsen und Palmgren teilten die Überfamilie der P-Typ-ATPasen aufgrund von phylogenetischen Untersuchungen und mit Hilfe der Substratspezifität der P-Typ-ATPasen in weitere fünf Unterfamilien ein (Palmgren und Axelsen 1998). Eine Erweiterung auf 22 Unterfamilien wird diskutiert (Thever und Saier 2009).

- **Typ-I-ATPasen:** Diese Unterfamilie wird unterteilt in die Typ-IA-ATPasen, die aus bakteriellen Ionenpumpen besteht (z.B. die  $K^+$ -Pumpe von *E. coli*) und in die Typ-IB-ATPasen. Diese umfassen vor allem die Schwermetallpumpen, z.B. CopA und ZntA, die toxische Ionen (z.B.  $Cu^{2+}$  oder  $Zn^{2+}$ ) aus der Zelle entfernen.
- **Typ-II-ATPasen:** Diese Unterfamilie umfasst alle ATPasen, die für den Transport der Ionen des zellulären Metabolismus verantwortlich sind, z.B. die  $Na^+/K^+$ -ATPase und die  $Ca^{2+}$ -ATPase. Diese ATPasen weisen dieselbe Topographie auf.
- **Typ-III-ATPasen:** Diese Unterfamilie umfasst die Protonenpumpen (Typ-IIIA) und Magnesiumpumpen (Typ-IIIB).
- **Typ-IV-ATPasen:** Diese ATPasen sind für den Transport von Phospholipiden verantwortlich.
- **Typ-V-ATPasen:** Diesen ATPasen konnte bisher noch keine definierte Substratspezifität zugeordnet werden.

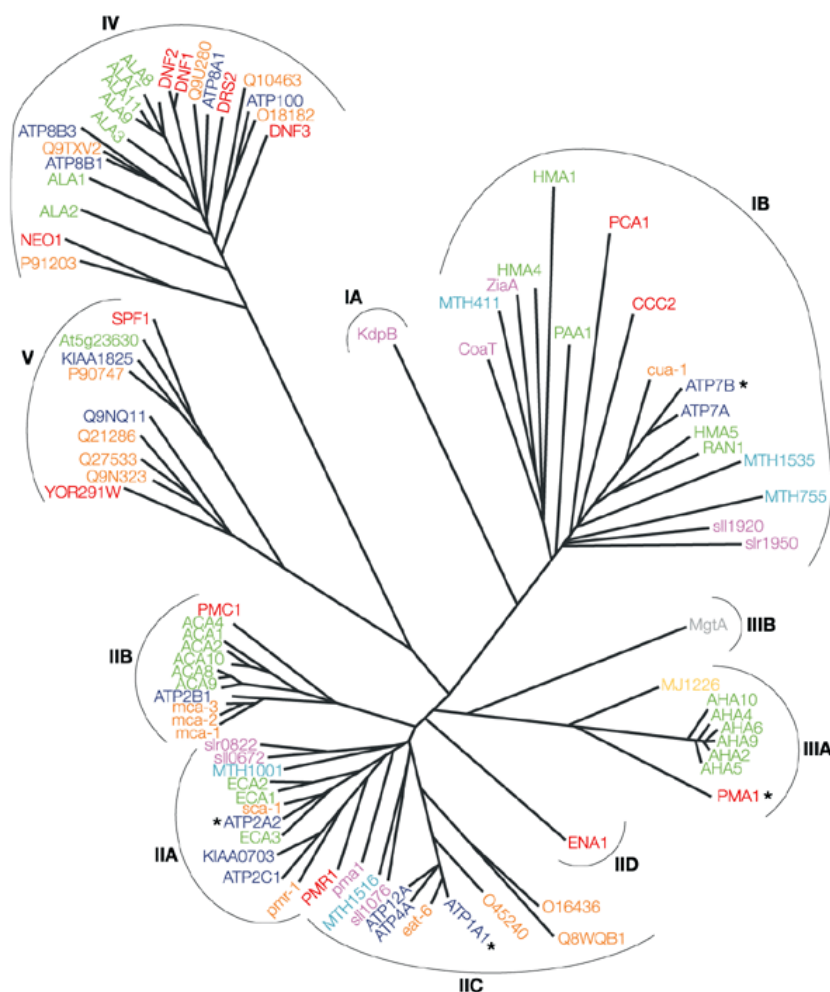


Abb. 12: Phylogenetischer Baum der P-Typ-ATPasen (Kühlbrandt 2004).

### 3.1 Struktur und Funktion der Ca<sup>2+</sup>-ATPase

Die Ca<sup>2+</sup>-ATPase ist aufgrund der vielen vorliegenden hochaufgelösten Strukturdaten die sowohl funktionell als auch strukturell am besten untersuchte P-Typ-ATPase<sup>2</sup>. Dies macht sie zum idealen Modellsystem der P-Typ-ATPasen. Die Ca<sup>2+</sup>-ATPase wird in die Unterfamilie der Typ-IIA-ATPasen eingeordnet, zu der auch die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase gehört. Wie alle P-Typ-ATPasen ist die Ca<sup>2+</sup>-ATPase ein integrales Membranprotein. Sie besteht aus einer einzigen Polypeptidkette, deren Sequenz sich aus 994 Aminosäuren zusammensetzt. Die Ca<sup>2+</sup>-ATPase hat eine Molekülmasse von 110 kDa.

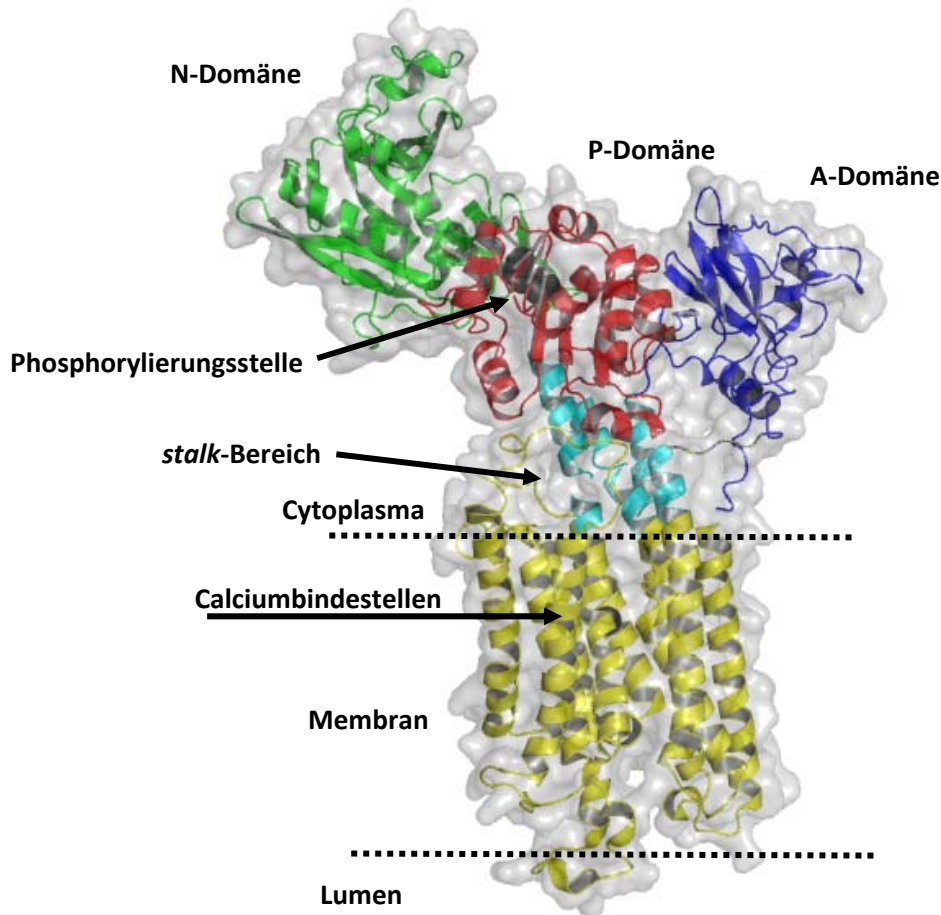
Die sarkoplasmatische Ca<sup>2+</sup>-ATPase (SERCA-ATPase) befindet sich in den *Sarkoplasmatischen Retikuli* des Muskelgewebes. Diese *Sarkoplasmatischen Retikuli* sind eine spezielle Form der *Endoplasmatischen Retikuli*, die im Cytoplasma der Muskeln vorkommen. Die Ca<sup>2+</sup>-ATPase bewirkt die Muskelrelaxation nach einer Kontraktion durch den aktiven Transport von Calciumionen. Während des Transports von Calciumionen aus dem Cytoplasma in das Lumen findet gleichzeitig ein Gegentransport von Protonen statt. Obwohl es sich bei der Ca<sup>2+</sup>-ATPase um eine elektrogene Pumpe handelt, wird kein Protonengradient über die Membran aufgebaut, da die Membran durchlässig für die zuvor transportierten Protonen ist. Die für diesen Transportprozess benötigte Energie wird durch Hydrolyse des ATPs und Phosphorylierung der Ca<sup>2+</sup>-ATPase mittels ATP gewonnen. Durch die Übertragung der  $\gamma$ -Phosphatgruppe des hydrolysierten ATPs auf das spezifische Aspartat (Asp 351) wird ein Aspartylphosphat-Intermediat gebildet, das eine Energie von ca. 12 kcal zur Verfügung stellt. Berechnungen zeigen, dass ca. 12 kcal aufgewendet werden müssen, um 2 mol Calciumionen durch die Membran zu transportieren (Walz und Caplan 1988). Da dies einer Umwandlungsrate von fast 100 % entspricht, arbeitet die Ca<sup>2+</sup>-ATPase sehr effizient (Tanford 1981). In kontrahierenden Muskelzellen ist die Ca<sup>2+</sup>-ATPase für 20 % des Gesamtverbrauches von ATP verantwortlich (Rolfe und Brown 1997). Dieser hohe Energieverbrauch lässt sich durch den hohen Anteil der Ca<sup>2+</sup>-ATPase an der Gesamtzahl aller Proteine (60-80 %), die im *Sarkoplasmatischen Retikulum* enthalten sind, erklären (Franzini-Armstrong und Ferguson 1985). Die restliche freigesetzte Energie wird in Wärme umgewandelt (Kjelstrup et al. 2008, Kjelstrup et al. 2009, Bedeaux und Kjelstrup 2008).

Die Struktur der Ca<sup>2+</sup>-ATPase war die erste Struktur einer P-Typ-ATPase, die im Jahr 2000 von Toyoshima mittels Röntgenbeugung an Enzymkristallen aufgelöst werden konnte (Toyoshima et al. 2000). Davor war es nur möglich, Modelle dieses Proteins auf Basis der Primärsequenz zu postulieren. Unterstützt wurden diese Strukturmodelle durch elektronenmikroskopische Untersuchungen der Ca<sup>2+</sup>-ATPase (Martonosi 1995, Toyoshima et al. 1993, Ogawa et al. 1998). Diese ließen aber nur sehr grobe Bilder mit einer Auflösung von ca. 9 Å zu.

---

<sup>2</sup> Eine gute Übersicht über die Ca<sup>2+</sup>-ATPase findet sich in folgenden Übersichtsartikeln (Lee und East 2001, Lee 2002, Stokes und Green 2003, Toyoshima und Inesi 2004, Barth 2008, Toyoshima 2009).

Die Abmessung der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase beträgt ca.  $140 \text{ \AA} \times 80 \text{ \AA}$ . Das Ausmaß des Transmembranbereiches beträgt ca.  $40 \text{ \AA}$  und entspricht somit der typischen Dicke einer biologischen Membran. Die Struktur der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase lässt sich grob in einen Transmembranbereich und einen großen cytoplasmatischen Kopfbereich einteilen, wobei dieser in drei Domänen (A-, N-,P-Domäne) unterteilt ist. Die Unterteilung der Domänen ist durch die Funktionen der jeweiligen Domäne bestimmt.



**Abb. 13:** Die Domänen der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. Der cytoplasmatische Bereich setzt sich aus der N-Domäne (grün), der P-Domäne (rot) und der A-Domäne (blau) zusammen und erstreckt sich über die Aminosäuren 1 - 40, 123 - 243 und 316 - 755. Der Transmembranbereich, der aus zehn  $\alpha$ -Helices besteht, ist gelb markiert. Der stalk-Bereich (hellblau) verbindet den transmembran- mit dem cytoplasmatischen Bereich (pdb-Datei: 1SU4).

Die **A(ktuator)-Domäne** ist an der Regulation der Ionenbindung und Ionenfreisetzung beteiligt. Sie ist die kleinste der drei cytoplasmatischen Bereiche und besteht aus ca. 160 Aminosäuren. Sie setzt sich aus den Aminosäuren 1 - 40 und 123 - 243 zusammen. In dieser Domäne befindet sich das Motiv TGES, welches in allen P-Typ-ATPasen auftritt und eine wichtige Aufgabe während der Ausbildung des Aspartylphosphat-Intermediats übernimmt (Daiho et al. 2003, Daiho et al. 2007). Aufgrund großer Schleifen (mehr als 10 Residuen) und nur einer Kontaktstelle zur P-Domäne weist die A-Domäne eine erhebliche Bewegungsfreiheit auf. Der A-Domäne ist es daher möglich, als Aktuator zu agieren und damit die Ionenbindung und Ionendissoziation der Calciumionen zu regulieren.



Die **N(ukleotid-bindende)-Domäne** ist zuständig für die Bindung des ATPs. Sie ist die größte der drei cytoplasmatischen Domänen (Asn 359 - Asp 601) und ist zwischen den beiden Teilen der P-Domäne lokalisiert. In dieser Domäne befindet sich die ATP-Bindungstasche. Sie ist mit der P-Domäne an zwei Stellen über  $\beta$ -Faltblätter verbunden, was ihr eine präzise Domänenbewegung ermöglicht. Wichtig für die Bindung von ATP ist die Aminosäure Phe 487, die eine aromatische Wechselwirkung mit dem Adeninring eingeht. Dies ist typisch für ATP-Bindestellen.

Die **P(hosphorylierungs)-Domäne** enthält die spezifische Aminosäure Asp 351, an der das Protein phosphoryliert wird. Diese Domäne wird aus zwei Regionen der Aminosäuresequenz gebildet, die weit voneinander entfernt sind (Thr 316 - Thr 357 und Asp 601 - Asn 755). Allerdings liegen Austritt und Eintritt der Polypeptidkette nahe beieinander. Die P-Domäne liegt als Rossmann-Faltung vor, einem typischen Merkmal von nukleotidbindenden Proteinen. Diese Struktur der P-Domäne ist ebenfalls wichtig für die Rotationsbewegung der A-Domäne. Die phosphorylierbare Aminosäure Asp 351 befindet sich in der P-Domäne am Ende des Carboxy-Terminus des ersten  $\beta$ -Faltblattes. Zur Phosphorylierung wird außerdem noch Magnesium benötigt. Dieses wird durch Asp 703 koordiniert.

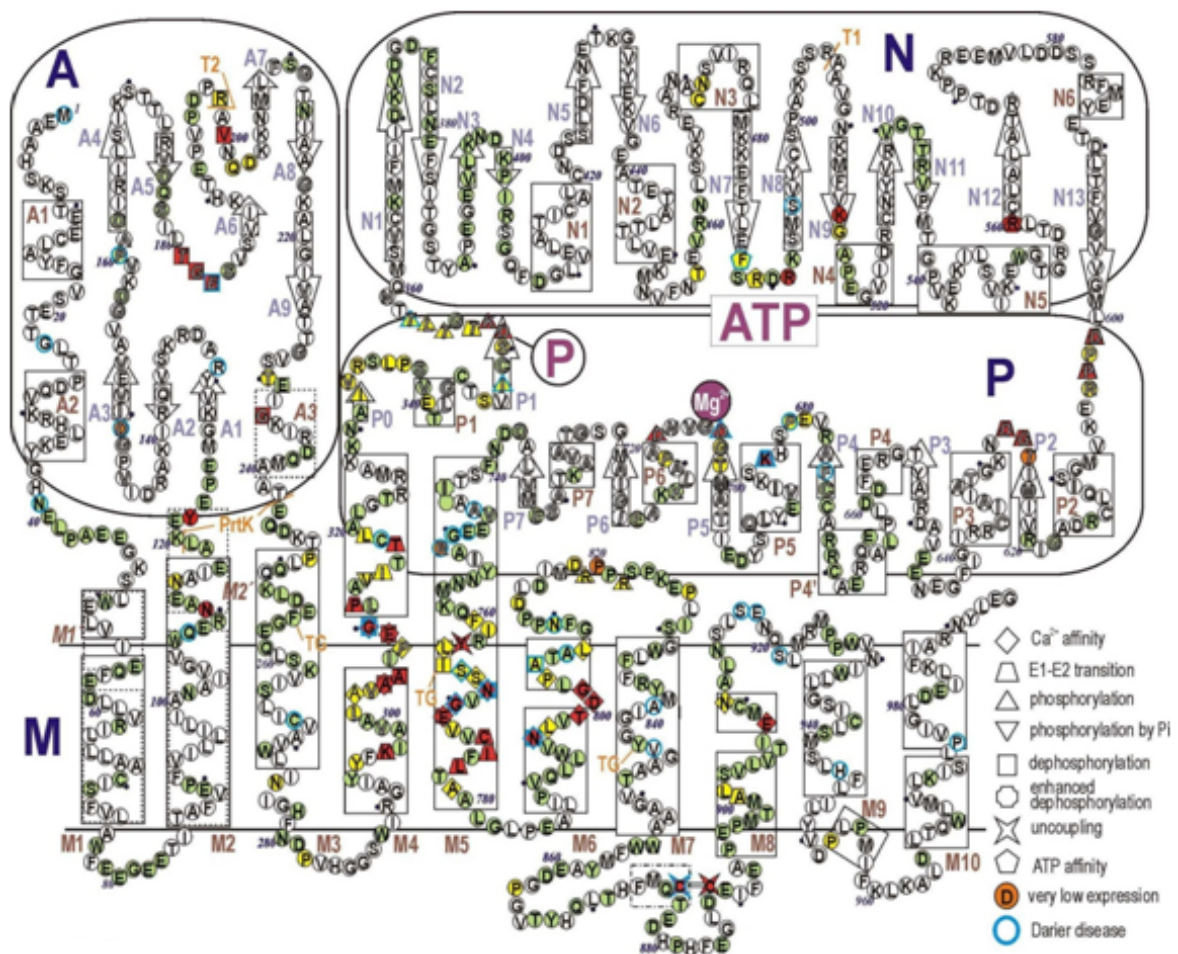


Abb. 14: Sequenz und Sekundärstruktur der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (Toyoshima und Inesi 2004).

Der **Transmembranbereich** umfasst ca. 400 Aminosäuren, von denen etwa die Hälfte die zehn transmembranen  $\alpha$ -Helices M1 bis M10 bilden. Der Transmembranbereich ist mit dem cytoplasmatischen Bereich über die sogenannten *stalk*-Region S2-S5 verbunden (Abb. 13). Dabei handelt es sich um vier lange cytoplasmatische Verlängerungen der  $\alpha$ -Helices, die sich direkt über den Transmembranhelices M2-M5 befinden. Besonders die Helices M4+S4 und M5+S5 erstrecken sich mit einer Länge von ca. 60 Å über das ganze Protein vom lumenalen Bereich bis zum Ende der P-Domäne. Die *stalk*-Region ist wegen ihrer Flexibilität essentiell für die Funktion der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, insbesondere für den konformellen Übergang aus dem E1-Zustand in den E2-Zustand (siehe Kapitel 3.3). Die Transmembranhelices M1-M6 sind während des Reaktionszyklus beweglich, während die Helices M7-M10 sich praktisch nicht bewegen und somit als Anker für das Protein fungieren.

Im Transmembranbereich befinden sich auch die für die Funktion der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase fundamentalen Calciumbindestellen (siehe Kapitel 3.5). Sie sind etwa 50 Å von der Phosphorylierungsstelle entfernt und liegen in der Mitte des Transmembranbereiches nebeneinander. Während des Reaktionszyklus unterliegt die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase einer großen konformellen Änderung im cytoplasmatischen Kopfbereich. Der Transmembranbereich hingegen unterliegt nur kleinen Konformationsänderungen.

### 3.2 Struktur und Funktion der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase

Die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, auch bekannt als Natrium-Pumpe, konnte 1957 von Jens Skou durch eine von Magnesium-, Natrium- und Kaliumionen abhängige ATPase-Aktivität in einer Membranfraktion aus Krabbenerven nachgewiesen werden (Skou 1957). Die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase gehört zu der Familie der P-Typ-ATPasen und kommt in fast allen Vertebratenzellen vor. Die Funktion der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase besteht darin, durch aktiven Transport von Kaliumionen in die Zelle und von Natriumionen aus der Zelle, das Ruhepotential, welches an der Zelle herrscht, aufrecht zu erhalten. Pro Transportzyklus werden dabei drei Natriumionen aus der Zelle heraus und zwei Kaliumionen hinein transportiert, d.h. die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase arbeitet elektrogen, da der Nettotransport pro Pumpzyklus einer positiven Ladung entspricht. Durch diesen Transport wird die Natriumkonzentration in der Zelle gering und die Kaliumkonzentration hoch gehalten. Sowohl der Natrium- als auch der Kalium-Gradient ist für viele der elektrischen Membraneigenschaften essentiell, z. B. für die Erregbarkeit von Nerven und Muskelzellen sowie für den Transport von Nährstoffen über die Membran. Das Protein ist aber ebenso an der Osmoregulation und der Zellvolumenkontrolle beteiligt.

Die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase ist ein Membranprotein, das aus drei Untereinheiten besteht. Die  $\alpha$ -Untereinheit ist die funktionelle Einheit mit einer molekularen Masse von 113 kDa. Sie setzt sich aus 1014 Aminosäuren zusammen. Die  $\beta$ -Untereinheit dient der Verankerung der Natrium-Kalium-Pumpe in der Zellmembran und hat eine molekulare Masse von 40 kDa. Die  $\gamma$ -Untereinheit ist für die Regulierung des Ionentransportes mitverantwortlich (Lingrel und Kuntzweiler 1994, Jorgensen et al. 2003). Lange Zeit lagen keine hochaufgelösten Strukturen der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase vor. Im Jahr 2007 konnte die erste Struktur mit einer Auflösung von 3,5 Å präsentiert werden (Morth et al. 2007). Diese Struktur wurde im E2P-Zustand mit zwei gebundenen Rubidiumionen aufgelöst. Diese Ionen ersetzen in der Kristallstruktur aufgrund ihrer Ähnlichkeit die Kaliumionen. Sie werden somit ebenfalls in der Kaliumbindestelle okkludiert, weisen aber eine bessere Streuung bei der Röntgenstrukturaufklärung auf und können somit eindeutiger zugeordnet werden. Eine weitere Struktur mit einer höheren Auflösung von 2,4 Å ist seit dem Jahr 2009 verfügbar (Shinoda et al. 2009).

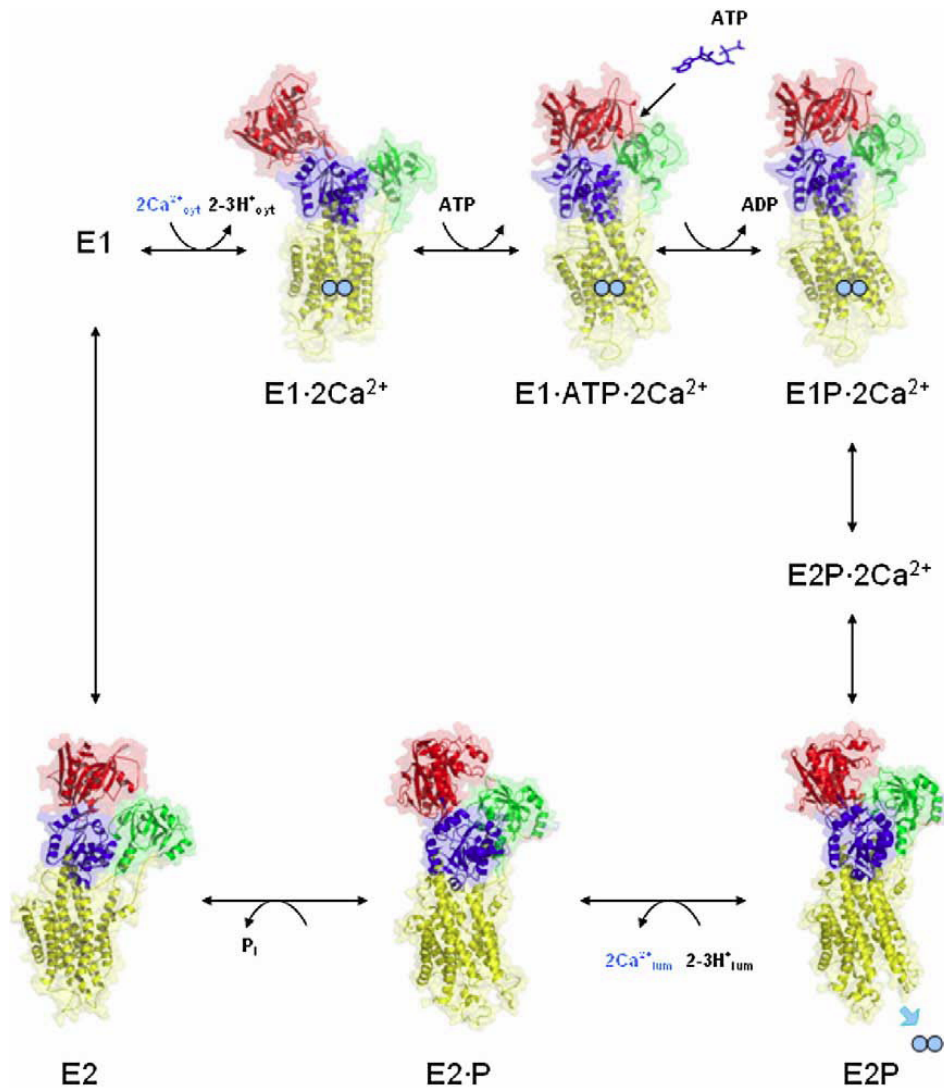
Wie die Ca<sup>2+</sup>-ATPase besteht auch die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase aus zehn transmembranen  $\alpha$ -Helices sowie einem großen cytoplasmatischen Kopf, der in Homologie zur Ca<sup>2+</sup>-ATPase in drei Domänen eingeteilt wird. Diese sind die A-(Aktuator-), N-(Nukleotid-bindende-) und die P(Phosphorylierungs)-Domäne.

### 3.3 Reaktionszyklus

Um aktiv Ionen über eine biologische Membran pumpen zu können, unterliegen P-Typ-ATPasen einem Reaktionszyklus. Die grundlegenden Schritte im Zyklus werden für alle P-Typ-ATPasen als ähnlich angenommen und werden mittels des Post-Albers-Schemas beschrieben (Post et al. 1972, Albers 1967). Maßgeblich bestimmt wird dieser Reaktionszyklus durch die zwei Hauptenzymzustände E1 und E2. Diese beiden Zustände unterscheiden sich durch ihre Ionenaffinität und durch die unterschiedliche Zugänglichkeit der Bindestellen. Der Reaktionszyklus der P-Typ-ATPasen besteht aus einer Abfolge von Konformationsänderungen, die durch die Phosphorylierung bzw. durch die Dephosphorylierung hervorgerufen werden und diese sind wiederum verantwortlich für die Okklusion bzw. für die Freisetzung der zu transportierenden Ionen (Abb. 15).

Im Folgenden wird ausführlich der Reaktionsmechanismus der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase beschrieben (Abb. 15). Prinzipiell sind die Reaktionszyklen der P-Typ-ATPasen ähnlich, unterscheiden sich aber durch die verschiedenen Kationen, die transportiert werden.

Zwei Calciumionen, die sich im cytoplasmatischen Bereich befinden, binden während des E1-Zustandes sequenziell und kooperativ an die beiden Calciumbindestellen, welche eine hohe Affinität für Calcium im E1-Zustand aufweisen (Zhang et al. 2000, Martin 1992). In diesem Zustand sind die cytoplasmatischen Domänen eindeutig voneinander getrennt, wobei vor allem die N-Domäne weit von der A-Domäne entfernt ist. ATP bindet dann unabhängig von der Bindung der Calciumionen an die Nukleotid-bindende Domäne. Die Hydrolyse des gebundenen ATPs wird jedoch erst durch die Bindung der Calciumionen initiiert (E1·ATP·2Ca<sup>2+</sup>-Zustand) (MacLennan et al. 1985, Brandl et al. 1986). Die Domänen A, N und P legen sich um das gebundenen ATP. Dadurch kann die Phosphorylgruppe des ATPs auf das Protein übertragen werden und die P-Domäne wird phosphoryliert. Als Folge wird der energiereiche Calcium-gebundene Zustand E1P·2Ca<sup>2+</sup> ausgebildet, bei dem die Calciumionen okkludiert sind. Während der Umwandlung in den ebenfalls phosphorylierten E2P-Zustand ändert sich sowohl die Affinität der Calciumbindestellen als auch deren Zugänglichkeit. Vor allem lassen sich die beiden Zustände E1P und E2P durch die ADP-Sensitivität unterscheiden. Dies bedeutet, dass im E1P-Zustand ATP aus ADP synthetisiert werden kann, während dies im E2P-Zustand nicht mehr möglich ist. Die Calciumbindestellen sind im E2P-Zustand vom Lumen aus zugänglich. Die beiden gebundenen Calciumionen können aufgrund der Affinitätsänderung der Calciumbindestellen ins Lumen dissoziieren. Ebenfalls können durch den geöffneten Kanal zum Lumen Protonen aufgenommen werden. Zwischen den beiden Zuständen E1P·2Ca<sup>2+</sup> und E2P wird ein weiterer Zustand vermutet, bei dem die Calciumionen noch gebunden sind, die Struktur aber bereits in den E2-Zustand übergegangen ist. Dieser wird als E2P·2Ca<sup>2+</sup>-Zustand bezeichnet (Daiho et al. 2007).



**Abb. 15:** Reaktionszyklus der P-Typ-ATPasen am Beispiel der Ca<sup>2+</sup>-ATPase (Weidemüller und Hauser 2009). Der Reaktionszyklus startet mit der Bindung von zwei Calciumionen (hellblau) im E1-Zustand. Der konformelle Übergang des E1P·2Ca<sup>2+</sup>- in den E2P-Zustand wird durch Hydrolyse des ATPs und Phosphorylierung des Proteins angeregt. Im E2P-Zustand können die okkludierten Calciumionen dann an das Lumen abgegeben werden. Durch Dephosphorylierung kann das Protein über den Calcium-freien E2-Zustand wieder in den E1-Zustand zurückkehren.

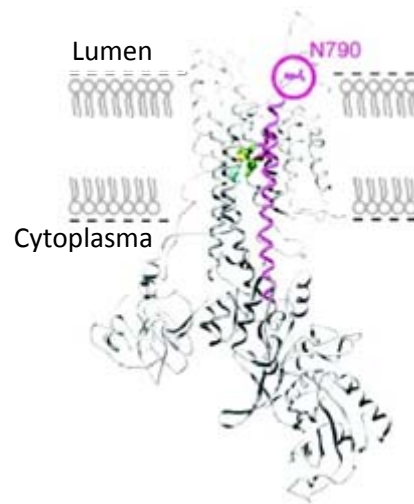
Für diesen liegen allerdings noch keine Röntgenstrukturdaten vor. Die Dephosphorylierung aus dem E2·P- in den E2-Zustand erfolgt durch die Reaktion des E2·P-Zustandes mit Wasser unter Freisetzung von anorganischem Phosphat. Der resultierende E2-Zustand ist nicht stabil, da die Wechselwirkungen fehlen, um die Ca<sup>2+</sup>-ATPase weiterhin im E2-Zustand zu stabilisieren. Als Folge ändert sich die Konformation der Ca<sup>2+</sup>-ATPase wieder in den Anfangszustand E1<sup>3</sup>. Aufgrund des beschriebenen Reaktionszyklus wird der E1-Zustand als Calcium-gebundener Zustand und der E2-Zustand als Calcium-freier Zustand bezeichnet.

<sup>3</sup> Für eine genauere Beschreibung des Reaktionszyklus der Ca<sup>2+</sup>-ATPase siehe z.B. (Mintz und Guillain 1997, Toyoshima und Inesi 2004, Stokes und Green 2003, Møller et al. 2005).

### 3.4 Energietransduktion

Damit die P-Typ-ATPasen aktiv Ionen gegen einen Konzentrationsgradienten durch eine Membran transportieren können, benötigen sie Energie. Diese Energie entsteht durch die Hydrolyse von ATP und die Phosphorylierung der P-Typ-ATPasen im cytoplasmatischen Kopfbereich. Die zu transportierenden Ionen sind hingegen im Transmembranbereich okkludiert, welcher ca. 50 Å von der Phosphorylierungsstelle entfernt ist. Dies bedeutet, dass die gewonnene Energie fast durch das ganze Protein geleitet werden muss. Der Mechanismus dieser Energietransduktion konnte bisher noch nicht vollständig geklärt werden. Es gibt Vermutungen, abgeleitet aus den strukturellen Daten, dass die Helices M4 und M5 nur durch ihre mechanische Bewegung an dieser Energietransduktion beteiligt sind (Mandal et al. 2003, Sorensen und Andersen 2000). Die vorliegenden strukturellen Daten lassen aber auch den Schluss auf Elektronenwege entlang der Transmembranhelices zu, über die Energie transferiert werden könnte (Scarborough 2002). Eine Beteiligung der Helix M5 und der Schleife M5-M6 an der Energietransduktion wird mit großer Wahrscheinlichkeit angenommen, da diese beiden Segmente stark konserviert in allen P-Typ-ATPasen vorliegen (Sweadner und Donnet 2001). Alle bisherigen Erkenntnisse deuten auf eine essentielle Rolle der Helix M5 bei der Kopplung der ATP-Hydrolyse mit dem Ionentransport hin. Diese wichtige Funktion der Helix M5 wurde auch für die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (Lutsenko et al. 1995) und die H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (Gatto et al. 1999) postuliert.

Im Gegensatz zu den anhand von Strukturdaten vermuteten Mechanismen können mit Hilfe der Spannungsklemmen-Fluorometrie (Voltage-Clamp-Fluorometry) lokale Proteinbewegungen unter physiologischen Bedingungen *in situ* detektiert werden (Mannuzzu et al. 1996, Cha und Bezanilla 1998). Diese Methode wurde eingesetzt, um an der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase die Proteinbewegung, die während des Reaktionszyklus vom E1- in den E2-Zustand erfolgt, zu beobachten (Geibel et al. 2003). Dazu wurde die Schleife zwischen den Helices M5 und M6 ausgewählt und mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert (Abb. 16). Diese Schleife bietet sich als Markierungsstelle an, da sich die Helix M5+S5 von der Transmembranbindestelle bis hin zur Phosphorylierungsstelle im cytoplasmatischen Teil des Proteins ausdehnt. Durch die Sensitivität des Markers auf die umgebende Polarität kann die Proteinbewegung dieser beiden Helices nachverfolgt werden. Eine mögliche Beteiligung der Helix M5 an der Energietransduktion während des Reaktionszyklus kann somit überwacht werden. Mit Hilfe der Spannungsklemmen-Fluorometrie konnte gezeigt werden, wie der Übergang aus der E1- in die E2-Zustand im funktionellen Zusammenhang mit den Transportprozessen steht (Geibel et al. 2003, Dempski et al. 2009). Auch hier wird die Helix M5 als mögliches Transduktionselement diskutiert.



**Abb. 16:**  $\alpha$ -Untereinheit der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  - in die Struktur der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase ( pdb-Datei:1EUL ) modelliert. Die Helix M5 und die Aminosäure N790 sind rot markiert (Geibel et al. 2003).

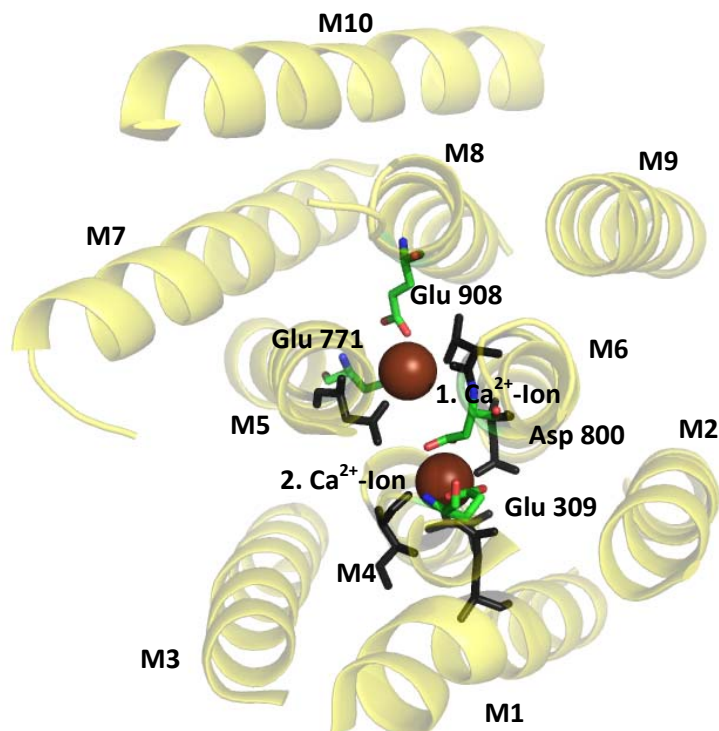
Angenommen wird, dass die Helix M5 die Rolle eines Energietransduktionselementes einnimmt. Diese verbindet die cytoplasmatischen Proteindomänen mit dem Transmembranbereich und überträgt die durch Phosphorylierung im cytoplasmatischen Bereich gewonnene Energie zur Kationenbindungsstelle.

Wie die Spannungsklemmen-Fluorometrie-Experimente zeigen, lässt sich der Reaktionszyklus nicht nur durch die Bindung und Hydrolyse von ATP starten, sondern er kann auch durch ein angelegtes elektrisches Feld induziert werden.

### 3.5 Ionentransport und Protonengegentransport in der $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase

Bei der Kontraktion des Muskels werden Calciumionen aus einer Organelle, dem *Sarkoplasmatischen Retikulum*, über Calciumkanäle in die Muskelzellen freigesetzt. Die *Sarkoplasmatischen Retikuli* stellen einen Speicher für die Calciumionen im Muskel dar. Damit der Muskel wieder relaxieren kann, werden pro Reaktionszyklus der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase aktiv zwei Calciumionen aus dem Cytoplasma zurück in die *Sarkoplasmatischen Retikuli* transportiert (Inesi 1987, Orłowski und Champeil 1991, Tanford et al. 1987). Im Austausch findet ein Gegentransport von zwei bis drei Protonen aus dem Lumen in das Cytoplasma statt (Chiesi und Inesi 1981, Martin 1992, Yu et al. 1993, Forge et al. 1993, Nakamura 1994, Peinelt und Apell 2002, Tadini-Buoninsegni et al. 2006). Dadurch sinkt innerhalb von 50 ms die Calciumkonzentration im Muskel von 1,5 mM auf 0,1  $\mu\text{M}$ , d.h. um den Faktor  $10^4$  (Martin und Tanford 1981) und löst dadurch die gewünschte Relaxation aus.

Die Bindung der Calciumionen in den Calciumbindestellen findet im Transmembranbereich der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase statt.



**Abb. 17:** Aufsicht auf die Calciumbindestelle. Die Calciumliganden der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase sind schwarz, die Liganden, die Carboxylgruppen aufweisen sind grün, die einzelnen Transmembranhelices sind gelb und die Calciumionen sind rot markiert.

Die Liganden der beiden Calciumbindestellen befinden sich auf den Helices M5, M6 und M8. Die erste Bindestelle ist umgeben von den Helices M5, M6 und M8. Die Bindung des ersten Calciumions

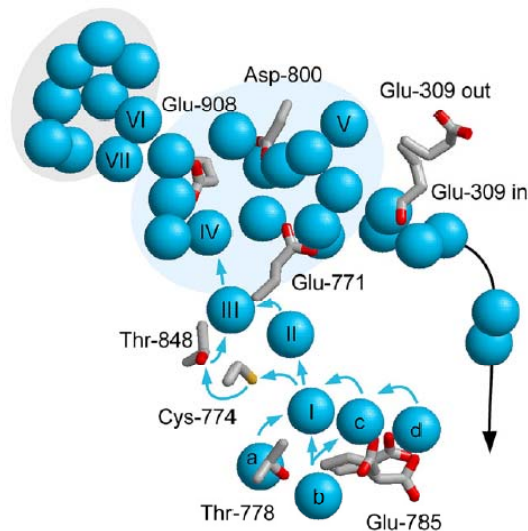


wird koordiniert durch den Sauerstoff der Seitenketten der Aminosäuren Asn 768 und Glu 771 auf der M5, Thr 799 und Asp 800 auf der M6 und Glu 908 auf der M8 sowie durch zwei Wassermoleküle (Abb. 17). Die zweite Calciumbindestelle wird durch Liganden auf den Helices M4 und M6 gebildet. Das Calciumion in dieser Bindestelle wird durch den Sauerstoff des Proteinrückgrats der Aminosäuren Val 304, Ala 305 und Ile 307 und durch den Sauerstoff der Seitenketten der Aminosäuren Glu 309 auf der M4 sowie Asn 796 und Asp 800 auf der M6 gebunden. Die Aminosäure Asp 800 ist als einzige der Calciumliganden an der Bindung beider Calciumionen beteiligt. An der Bindung des ersten Calciumions sind keine Sauerstoffatome des Proteinrückgrates beteiligt. An der Bindung des zweiten Calciumions sind keine Wassermoleküle beteiligt. Die Calciumliganden der Bindestellen wurden durch ortsgerichtete Mutagenese identifiziert (Clarke et al. 1989, Vilsen und Andersen 1998). Calciumkanäle wurden sowohl zwischen den Helices M2, M4 und M6 als auch zwischen den Helices M1 und M2 für den Calcium-gebundenen Zustand postuliert (Toyoshima et al. 2000, Sorensen et al. 2004). Für den Calciumkanal in Richtung Lumen wurde ein Weg zwischen den Helices M1, M2, M4, M5 und M6 vorgeschlagen (Morth et al. 2007).

Der Transport von Calciumionen mittels der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase über die Membran ist verbunden mit einem Gegentransport von Protonen (Chiesi und Inesi 1980, Levy et al. 1990, da Costa und Madeira 1993, Yu et al. 1994). Bei der Dissoziation der Calciumionen in das Lumen im E2P-Zustand werden gleichzeitig Protonen aus dem Lumen aufgenommen und bei bzw. nach der Bindung von Calciumionen in das Cytoplasma freigesetzt. Dabei konkurrieren sowohl die Calciumionen als auch die Protonen um die gleiche Bindestelle (Martin 1992, Peinelt und Apell 2002). Die Stöchiometrie dieses Gegentransportes beträgt zwei bis drei Protonen pro transferierten Calciumion (Levy et al. 1990, Yu et al. 1994, Yu et al. 1993, Tadini-Buoninsegni et al. 2006). Auch wenn durch diesen Transport kein Protonengradient aufgebaut werden kann, da die Membran durchlässig für Protonen ist, scheint der Gegentransport von Protonen eine wichtige Funktion für die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase zu sein. Bisher konnte festgestellt werden, dass die Protonen für die Stabilität der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase wichtig sind, da diese die negativ geladenen Calciumliganden neutralisieren können (Toyoshima und Inesi 2004). Die Calciumbindestellen enthalten vier Carboxylgruppen der Liganden Glu 309, Glu 771, Asp 800 und Glu 908. Die Protonierung der Calciumliganden wurde mittels elektrostatischer Rechnungen in Kombination mit Fourier-Transformations-Infrarot-(FTIR)-Messungen im E1-, E2P- und E2-Zustand untersucht (Andersson et al. 2008). Es ist zu erwarten, dass die geladenen Calciumliganden im Calcium-gebundenen E1-Zustand deprotoniert und im Calcium-freien E2-Zustand protoniert vorliegen. Es konnte gezeigt werden, dass alle Calciumliganden im Calcium-gebundenen Zustand bei physiologischem pH deprotoniert vorliegen und sowohl im E2- als auch im E2P-Zustand die Calciumliganden Glu 771, Asp 800 und Glu 908 protoniert sind. Mittels elektrostatischer Rechnungen konnten die Liganden Glu 771, Asp 800 und Glu 908 als wichtig für den Protonengegentransport

identifiziert werden. Der Calciumligand Glu 309 zeigt sehr unterschiedliche pK-Werte im Calcium-freien Enzymzustand. Diese beruhen auf den unterschiedlichen Konformationen, die der Ligand Glu 309 einnehmen kann. Die eine Orientierung ist zu den Calciumliganden hin und die andere ist nach außen in einen Kanal, der im Kontakt mit dem Cytoplasma steht, gerichtet. Daher ist anzunehmen, dass der Ligand Glu 309 als Protonentransporter von der 1. Calciumbindestelle zum Cytoplasma dient (Hauser 2006, Hauser und Barth 2007). Ebenso konnte durch Mutagenese-Experimente an den Liganden Glu 309, Glu 771 und Asn 796 die Bindung von Protonen und Oxonium-Ionen ( $\text{H}_3\text{O}^+$ ) nachgewiesen werden (Vilsen und Andersen 1998, Andersen und Vilsen 1994).

Allgemein ist der Transport von Protonen ein häufig auftretender Prozess in vielen biologischen Systemen. Dabei werden die meisten Protonen nach dem Grotthus-Mechanismus transportiert (Cukierman 2006, Wraight 2006), d.h. sie werden entlang einer Kette von Wassermolekülen transportiert, die durch Wasserstoffbrücken gebunden sind. Basierend auf dieser Annahme wurden in den Untersuchungen von Karjalainen et al. explizite Wassermoleküle in unterschiedliche Enzymzustände der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase eingefügt und, aufbauend auf einer sterischen Analyse dieser Wassermoleküle, ein Protonen- und Calciumtransportweg postuliert (Karjalainen et al. 2007).



**Abb. 18:** Postulierter Protonenweg in der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (Karjalainen et al. 2007). Die expliziten Wassermoleküle sind blau dargestellt. Zur besseren Übersicht sind nur Aminosäurereste berücksichtigt, die auch an dem Transport beteiligt sind. Die blauen Pfeile zeigen einen möglichen Protonentransportweg. Der schwarze Pfeil zeigt den Weg der Calciumionen.

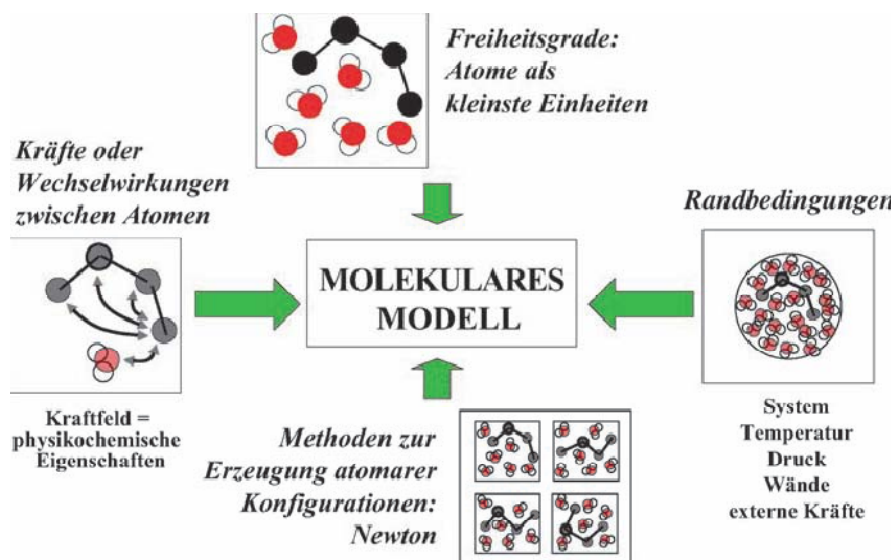
Ein möglicher Protonentransportweg ist in Abb. 18 durch blaue Pfeile und der Calciumtransportweg durch einen schwarzen Pfeil dargestellt. Der Calciumtransportweg befindet sich zwischen den Transmembranhelices M1, M2, M4 und beginnt an der Aminosäure Glu 309. Der postulierte Protonentransportweg befindet sich hauptsächlich zwischen den Helices M5 und M8. Ein möglicher lumenaler Kanaleingang wird durch die Schleifen an den Transmembranhelices M1 - M2, M3 - M4

und M7 - M8, die als L1 - L2, L3 - L4 und L7 - L8 bezeichnet werden, gebildet. In diesem Kanal befindet sich die Aminosäure Glu 785, an der der mögliche Protonenweg beginnt. Dieser ist in Abb. **18** mit vier Wassermolekülen a bis d umgeben, welche die Protonen an das Wasser I weitergeben. Von dort aus werden die Protonen über die Wasser II bis IV weitergeleitet. Durch die umgebenden Wassermoleküle des Wassers IV können die Protonen sehr gut an die Calciumliganden abgegeben werden. Die Protonen können dann durch den gleichen Kanal entlang der Helices M2, M4 und M6 wie die Calciumionen zum Cytoplasma transportiert werden. Dieser postulierte Protonentransportweg basiert auf sterischen Überlegungen von explizit eingeführten Wassermolekülen und nicht auf berechneten intramolekularen Wechselwirkungen. Der Protonenweg ist detailliert für die Umgebung der Bindestellen dargestellt, konnte aber im Detail nicht für den kompletten Weg durch das Protein postuliert werden.

Der konformelle Übergang aus dem E1- in den E2-Zustand wirkt sich wesentlich stärker auf die Helices M1, M2 und M4 aus als auf die Helices M5 und M8. Dies deutet darauf hin, dass durch die konformelle Änderung die Calciumionen entlang des schwarzen Pfeiles zum Lumen hin dissoziieren können, wohingegen der Protonentransport nicht auf große konformelle Änderungen angewiesen ist.

## 4 MOLEKULARE SIMULATION

Biologische Systeme sind heterogene Systeme, die sich aus einer Vielzahl von unterschiedlichen Bausteinen zusammensetzen. So bestehen z.B. Proteine aus einer oder mehreren langen, gefalteten Ketten von Aminosäuren, die von Wasser oder von Phospholipiden (biologische Membranen) umgeben sein können. Zusätzlich kann jede dieser Aminosäuren verschiedene Konformationen im Raum annehmen und die titrierbaren Aminosäuren können in unterschiedlichen Ionisierungszuständen vorliegen. Das sind nur einige wenige der Parameter, die bei einer Simulation von biologischen Systemen allgemein und von Proteinen im Speziellen zu berücksichtigen sind. Daraus folgt, dass ein zu simulierendes Protein ein großes System mit sehr vielen Freiheitsgraden darstellt.



**Abb. 19:** Verschiedene zu berücksichtigende Bedingungen an das Simulationsmodell (van Gunsteren et al. 2006).

Molekulare Simulationsmethoden versuchen diese Freiheitsgrade möglichst vollständig zu berücksichtigen. Molekulardynamik(MD)-Simulationen, Molekülmechanik(MM)-Rechnungen und Elektrostatik-Rechnungen sind häufig verwendete Methoden aus dem Bereich der mathematischen Modellierung und der Computer-Simulation, die zur Untersuchung von Proteinen und anderen biologischen Systemen eingesetzt werden. Diese ermöglichen, die Umgebungsbedingungen bzw. die Kräfte, die auf ein Protein einwirken, möglichst umfassend zu simulieren oder so zu verallgemeinern, dass die Simulationsergebnisse der Realität entsprechen.

Die Molekulardynamik-Simulation ist besonders geeignet, dynamische Prozesse in Proteinen zu untersuchen. Dazu berechnet diese Methode den zeitlichen Verlauf der Atomkoordinaten, d.h. eine Trajektorie aller Atome des Proteins. Die Trajektorie erlaubt, verschiedene Prozesse, wie z.B. die

Bindung von Liganden (Docking) oder den Transport von Molekülen über eine Membran, zu untersuchen. Aber auch thermodynamische Eigenschaften des zu simulierenden Systems, wie die Temperatur oder die Wärmekapazität, lassen sich so feststellen. Aufgrund der Komplexität der Systeme und der dafür benötigten hohen Rechnerkapazität können biologische Systeme mittels MD-Simulationen erst seit ca. 30 Jahren numerisch untersucht werden. Die erste MD-Simulation fand an einem kleinen Protein (BPTI) mit weniger als 1000 Atomen statt (McCammon et al. 1977). Obwohl es sich um ein einfaches Simulationssystem handelt konnte die Dynamik dieses Proteins nur über einen Zeitraum von 10 ps simuliert werden. Dank des rasanten Fortschrittes der Computertechnologie ist es heute möglich, große Proteine oder auch Proteinkomplexe (bis zu  $10^6$  Teilchen) in einer expliziten Wasserumgebung für einige Nano- bis Millisekunden zu simulieren (Karplus und McCammon 2002, Bahar et al. 2010).

Elektrostatik-Methoden sind im Unterschied zu den MD-Simulationen nicht zur Untersuchung von dynamischen Prozessen geeignet, sondern für die Bestimmung der Ionisierungszustände der titrierbaren Aminosäuren. Die Aminosäuren Arginin (Arg), Asparaginsäure (Asp), Glutaminsäure (Glu) und Lysin (Lys) stellen in einem durchschnittlichen Protein bis zu 25 % aller Aminosäuren. Dem Ionisierungszustand bzw. den damit verbundenen pK-Werten dieser titrierbaren Aminosäuren kommt eine wichtige Aufgabe bei den verschiedensten biologischen Prozessen zu. Dazu gehören z.B. Elektronen- und Protonentransport sowie Ligandenbindung und Ionentransport (Warshel und Russell 1984, Warshel und Aqvist 1991, Honig und Nicholls 1995, Bashford 2004, Gunner et al. 2006). Die pK-Werte dieser Aminosäuren sind zwar für die jeweilige Aminosäure in einer wässrigen Lösung bekannt, diese können innerhalb von Proteinen jedoch stark verschoben sein (siehe Kapitel 2.3). Zur Berechnung der pK-Werte in Proteinen haben sich Programme, welche die Poisson-Boltzmann-Gleichung und ein Monte-Carlo-(MC)-Sampling benutzen, etabliert. Die Poisson-Boltzmann-Gleichung ermöglicht die Berechnung der elektrostatischen Wechselwirkungen der Aminosäuren eines Proteins in einem Dielektrikum. Die Verwendung der Poisson-Boltzmann-Gleichung gewährleistet, dass eine ortsabhängige Dielektrizitätskonstante gewählt und die Ionenstärke des umgebenden Mediums berücksichtigt werden kann (Warwicker und Watson 1982, Gilson et al. 1985, Baker 2005). Das MC-Sampling wird für die Berechnung der Besetzungswahrscheinlichkeit der zuvor erzeugten Zustände des Proteins eingesetzt. Aus diesen lassen sich dann die Ionisierungszustände bestimmen.

Zur Berechnung von elektrostatischen Eigenschaften in Proteinen existieren noch weitere Methoden, die verschiedene Vor- und Nachteile aufweisen. Einige dieser oft verwendeten Methoden zur Simulation von biologischen Systemen sollen hier erwähnt werden.

Elektrostatische Energien können auch mit dem generalisierten Born-Modell (GB-Modell) berechnet werden. Diese Methode basiert auf einer analytischen Annäherung, die Ionen als harte Kugeln mit einem definierten Radius und Ladung annimmt, um die elektrostatischen Wechselwirkungsenergien zu berechnen (Bashford und Case 2000, Feig und Brooks 2004). Die Berechnung von pK-Werten kann auch auf der Basis von empirisch gewonnenen Daten und wissensbasierten Parametern erfolgen. Dabei werden die verwendeten Parameter an einen möglichst großen Datensatz von experimentellen pK-Werten angepasst. Damit lassen sich die berechneten pK-Werte in gute Übereinstimmung mit den gemessenen pK-Werten bringen (Wisiz und Hellinga 2003, Li et al. 2005). Auch die Langevin-Dipole-Methode, die auf einer semimikroskopischen Sicht der Proteine und des Solvens beruht, wurde erfolgreich eingesetzt. Dabei werden die Wassermoleküle durch Dipole, die auf einem Gitternetz angebracht sind, modelliert. Ihre Stärke und Orientierung ist abhängig von den Ladungen der umgebenden Ionen (Warshel und Levitt 1976, Lee et al. 1993, Sham et al. 2000). Die neueren Methoden, die erst durch den Fortschritt der Computertechnik möglich wurden, basieren auf der Kombination von Quantenmechanischen- und Molekülmechanischen(QM/MM)-Methoden (Kamerlin et al. 2009). Diese Methoden beruhen auf der Annahme, dass im Simulationssystem bestimmte Bereiche quantenmechanisch betrachtet werden müssen, wohingegen andere Bereiche klassisch betrachtet werden können. Daher ist es möglich, trotz der intensiven Rechnerressourcen, die für quantenmechanische Rechnungen nötig sind, komplexe Systeme zu simulieren.

## 4.1 Simulationen an P-Typ-ATPasen

Obwohl die P-Typ-ATPasen ein sehr gut untersuchtes biologisches System sind, gibt es bisher kaum theoretische Arbeiten über diese Proteinfamilie. Dies liegt zum einen daran, dass die erste hochaufgelöste Struktur erst seit dem Jahr 2000 vorliegt und zum anderen aber auch an der Größe des zu simulierenden Systems. Die P-Typ-ATPasen setzen sich aus ca. 1000 Aminosäuren zusammen, mit der Folge, dass allein für das biologische System ca. 15.000 Atome in der Simulation berücksichtigt werden müssen. Ergänzt man die Simulation um die physiologische Umgebung der P-Typ-ATPasen, so muss zusätzlich eine Membran (z.B. eine POPC oder DOPC-Modellmembran) und das umgebende Wasser explizit hinzugefügt werden. Daran lässt sich erkennen, dass es sich bei P-Typ-ATPasen um sehr große Simulationssysteme handelt (siehe Kapitel 4.4). Derart große Simulationssysteme benötigen massive Computerressourcen, die erst seit einigen Jahren zur Verfügung stehen.

Möchte man weiterhin Funktionen des Proteins untersuchen, so ist man meistens darauf angewiesen, den kompletten Reaktionszyklus der P-Typ-ATPasen zu betrachten. Dieser dauert allerdings mehrere Millisekunden. Aufgrund der Größe des Systems ist es daher nicht möglich, den kompletten Reaktionsmechanismus mittels computergestützter Methoden, z.B. durch MD-Simulationen, zu betrachten.

Computergestützte, theoretische Untersuchungen an den P-Typ-ATPasen erfolgten bisher im Zusammenhang mit folgenden Fragestellungen:

Die Bindung von Ionen (Costa und Carloni 2003), Inhibitoren (Lape et al. 2008, Sugita et al. 2006, Deye et al. 2009), ATP (Kubala 2006, Kubala et al. 2009), Domänenbewegungen (Li und Cui 2002, Reuter et al. 2003, Pyrkof et al. 2007, Winters et al. 2008), Ionentransport (Morii et al. 2008) und Transportmechanismen (Law et al. 2008, Huang et al. 2009), Wärmetransport und thermodynamische Größen der P-Typ-ATPasen (Bedeaux und Kjelstrup 2008, Kjelstrup et al. 2008, Kjelstrup et al. 2009).

Die meisten dieser computergestützten Arbeiten wurden an der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase durchgeführt, da sie als Modellsystem für die P-Typ-ATPasen gilt und für diese ATPase die meisten hochaufgelösten Strukturdaten für verschiedene Enzymzustände vorliegen. Dabei wurden vor allem MD-Methoden (z.B. Docking) und die Normal-Moden-Analyse eingesetzt. Elektrostatik-Rechnungen wurden bisher nur zum Protonierungsverhalten der Calciumliganden (Sugita et al. 2005, Obara et al. 2005, Hauser und Barth 2007) und zum Protonengegentransport (Karjalainen et al. 2007, Hauser und Barth 2007) durchgeführt.

## 4.2 Elektrostatik-Simulationen

Proteine bestehen aus einer Vielzahl von Aminosäuren. Ein Teil dieser Aminosäuren im Protein ist nicht neutral, sondern trägt Ladungen. Die Ansammlung verschieden geladener Aminosäuren und Ionen führt zu einer komplexen Verteilung von Dipolen und Ladungen im Protein, die durch die Gesetze der Elektrostatik beschrieben werden kann. Die Kontinuumselektrostatik kann die resultierenden Wechselwirkungen von Proteinen mit ihrer Umgebung (Solvens, Liganden, weitere Proteine) berechnen.

In der Kontinuumselektrostatik wird das Protein und das umgebende Lösungsmittel als Kontinuum beschrieben. Trotz dieser Vereinfachung lassen sich mittels der Kontinuumselektrostatik sehr gute Aussagen über die elektrostatischen Eigenschaften von Proteinen in Lösung machen (Bashford und Karplus 1990).

### 4.2.1 Poisson-Boltzmann-Gleichung

Ausgehend vom Coulomb-Gesetz kann das Potential einer Ladungsdichteverteilung  $\rho(\vec{r})$  definiert werden durch

$$\phi(\vec{r}) = \int_V \frac{\rho(\vec{r}')}{\epsilon |\vec{r} - \vec{r}'|} dV$$

wobei  $\epsilon$  die Dielektrizitätskonstante ist.

Das Coulomb-Gesetz berücksichtigt jedoch nicht, dass sich auch andere geladene Moleküle (z.B. Calcium, Magnesium oder Natrium) außerhalb des Proteins im Wasser befinden können. Zur mathematischen Behandlung dieser Effekte ist die Poisson-Boltzmann-Gleichung geeignet. Diese erfasst sowohl die vorhandenen Ionen in der Lösung als auch die Geometrie des Proteins und die damit verbundene Verteilung der Ladungen innerhalb des Proteins. Die Voraussetzung für die Anwendbarkeit der Poisson-Boltzmann-Gleichung ist eine statische Ladungsverteilung im Protein und die eindeutige Beschreibung des umgebenden Solvens wie auch des Proteins durch eine makroskopische Dielektrizitätskonstante.

Im Falle eines dielektrisch homogenen Mediums, d.h. bei einer konstanten Dielektrizitätskonstante  $\epsilon$ , beschreibt die Poisson-Gleichung

$$\Delta\phi(\vec{r}) = -4\pi \frac{\rho(\vec{r})}{\epsilon}$$



das Verhalten des Gradienten eines elektrostatischen Potentials  $\phi(\vec{r})$  durch die Ladungsdichte  $\rho(\vec{r})$ . In ihrer natürlichen Umgebung befinden sich Proteine in einer wässrigen Lösung. Die Wassermoleküle sind gut polarisierbar und besitzen eine hohe Mobilität, d.h. Proteine befinden sich physiologisch in einem Lösungsmittel mit stark polarem Charakter. Es ist daher erforderlich, dem Protein und dem Solvens unterschiedliche Dielektrizitätskonstanten zuzuordnen. Typische Werte für die Dielektrizitätskonstante im Protein liegen zwischen 4 und 20 (Schutz und Warshel 2001, Warshel et al. 2006). Für Wasser ist die Dielektrizitätskonstante 80.

Aufgrund dieser heterogenen Verteilung der Dielektrizitätskonstante im Kontinuumsmodell des Protein-Solvens-Systems muss die Dielektrizitätskonstante  $\varepsilon$  als ortsabhängig betrachtet werden und die Poisson-Gleichung nimmt folgende Form an

$$\nabla \cdot [\varepsilon(\vec{r})\nabla\phi(\vec{r})] = -4\pi\rho(\vec{r})$$

Um die Effekte von beweglichen Ionen im Solvens zu berücksichtigen, muss die Poisson-Gleichung um die Ionenverteilung in einem Elektrolyt erweitert werden. Diese lässt sich mittels der Debye-Hückel-Theorie beschreiben, nach der die Ionen Boltzmann-verteilt sind. Für den Fall, dass die Kräfte zwischen den Teilchen elektrostatischer Natur sind, kann die resultierende Ladungsdichtenverteilung der Ionen ausgedrückt werden durch

$$\rho_{ion}(\vec{r}) = \sum_s c_s(\vec{r})q_s \exp\left(-\frac{q_s\phi(\vec{r})}{k_B T}\right)$$

wobei  $c_s$  die Konzentration der Ionen und  $q_s$  die Ladung der Ionen des Typs  $s$  ist.

Berücksichtigt man die Ionen im Solvens gemäß vorstehender Gleichung, so erhält man durch Einsetzen die Poisson-Boltzmann-Gleichung

$$\nabla \cdot [\varepsilon(\vec{r})\nabla\phi(\vec{r})] + 4\pi \sum_s c_s(\vec{r})q_s \exp\left(-\frac{q_s\phi(\vec{r})}{k_B T}\right) = -4\pi\rho(\vec{r})$$

Da die Debye-Hückel-Theorie Elektronenneutralität verlangt

$$\sum_s c_s(\vec{r})q_s = 0$$

kann für den Fall, dass sich im Solvens nur monovalente Ionen befinden, die Poisson-Boltzmann-Gleichung unter Verwendung des Sinus hyperbolicus  $\sinh(x) = \frac{1}{2}(e^x - e^{-x})$  dargestellt werden durch

$$\nabla \cdot [\varepsilon(\vec{r})\nabla\phi(\vec{r})] - \kappa'^2 \sinh(\phi(\vec{r})) = -4\pi\rho(\vec{r})$$

wobei  $\kappa'^2$  mit der inversen Debye-Hückel-Länge  $\kappa$  und der Ionenstärke  $I$  der Lösung in folgender Beziehung steht

$$\kappa^2 = \frac{\kappa'^2}{\varepsilon} = \frac{8\pi N_A e^2 I}{1000 \varepsilon k_B T}$$

$N_A$  ist die Avogadrozahl und  $I$  die Ionenstärke der Elektrolytlösung, die gegeben ist durch

$$I = \frac{1}{2} \sum_i c_i z_i^2$$

wobei  $c_i$  die Konzentration der Lösung und  $z_i$  die Ladungszahl ist. Damit berücksichtigt der 2. Term der Poisson-Boltzmann-Gleichung die Effekte der Gegenionen, die sich im Solvens befinden. Dieser Term ist nicht vorhanden, wenn sich keine beweglichen Ionen in der umgebenden Lösung befinden ( $\kappa'^2 = 0$ ). In diesem Fall geht die Poisson-Boltzmann-Gleichung wieder in die Poisson-Gleichung über.

Die nichtlineare Poisson-Boltzmann-Gleichung kann nur in den seltensten Fällen analytisch gelöst werden. Daher sind spezielle Lösungsmethoden, wie z.B. das Newton-Verfahren, erforderlich.

Die Poisson-Boltzmann-Gleichung lässt sich aber in eine linearisierte Form überführen, wenn angenommen werden kann, dass die elektrostatische Wechselwirkung wesentlich kleiner ist als die thermische Energie.

$$\frac{e_o \phi}{k_B T} \ll 1$$

In diesem Fall kann der Sinus hyperbolicus linear genähert werden

$$\sinh[\phi(\vec{r})] \approx \phi(\vec{r})$$

Damit erhält man die linearisierte Poisson-Boltzmann-Gleichung (nach Leach 2006)

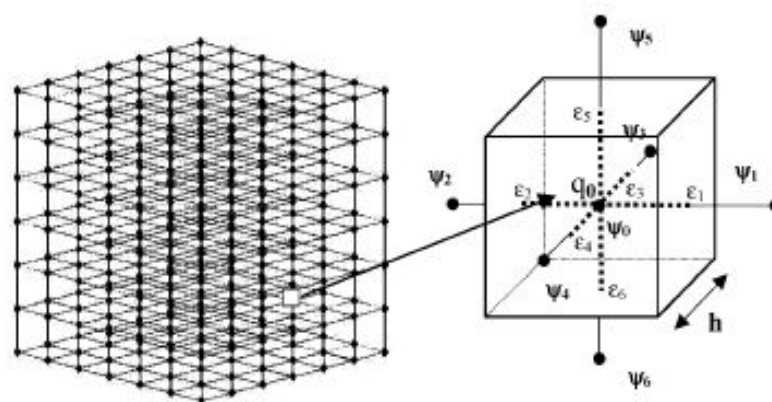
$$\nabla \cdot [\varepsilon(\vec{r}) \nabla \phi(\vec{r})] - \kappa'^2 \phi(\vec{r}) = -4\pi \rho(\vec{r})$$

## 4.2.2 Numerische Lösung der Poisson-Boltzmann-Gleichung

Nur in den wenigsten Fällen kann auch diese linearisierte Form analytisch gelöst werden, z.B. dann, wenn die Grenzflächen zwischen den verschiedenen Dielektrika einfache Geometrien aufweisen. Daher werden vereinfachte Modelle des zu untersuchenden Biomoleküls benutzt, z.B. Proteine als Kugeln oder Ellipsen (Tanford-Kirkwood-Theorie), DNA als Zylinder oder Membranen als Ebenen (Guy-Chapman-Theorie). In den meisten Fällen müssen aber numerische Methoden zur Lösung der Poisson-Boltzmann-Gleichung eingesetzt werden. Zu den bekanntesten und am meisten verwendeten numerischen Verfahren gehören die Randelementemethode (boundary element method) (Zauhar und Varnek 1996), die Mehrgittermethode (multigrid method) (Holst und Saied 1995) oder die Finite-Differenzen-Methode. Da in dieser Arbeit die Finite-Differenzen-Methode zur Lösung der Poisson-Boltzmann-Gleichung angewandt wird, soll auf die anderen Methoden hier nicht weiter eingegangen werden.

## 4.2.3 Die Finite-Differenzen-Methode

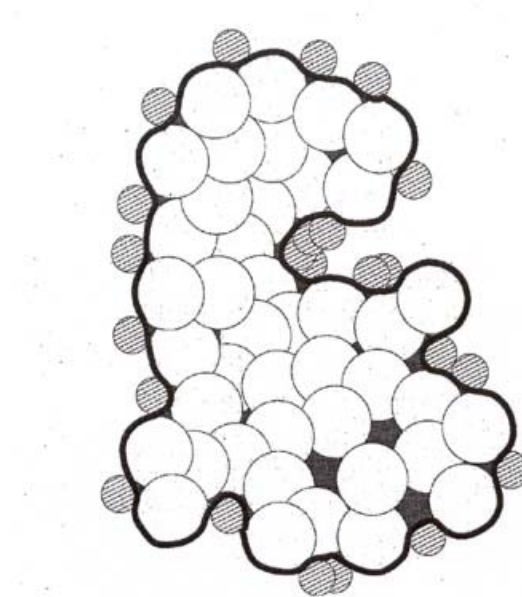
Die Finite-Differenzen-Methode wurde zuerst von Warwicker und Watson 1982 beschrieben (Warwicker und Watson 1982). Seitdem wurde diese Methode in mehrere Programme implementiert, z.B. DelPhi (Nicholls und Honig 1991), UHBD (Davis et al. 1991) und MEAD (Bashford 2004). Dieses numerische Verfahren beruht auf einer Diskretisierung der kontinuierlichen Methode in einen endlich-dimensionalen Satz von Basisfunktionen, die für den Fall der linearisierten Poisson-Boltzmann-Gleichung lineare Matrix-Vektor-Gleichungen sind, die sich direkt lösen lassen. Um die Finite-Differenzen-Methode anwenden zu können, müssen alle physikalisch relevanten Daten bekannt sein, d.h. die Ladung  $q$ , die Dielektrizitätskonstante  $\epsilon$ , die Ionenstärke  $I$  sowie das elektrische Potential  $\phi$ .



**Abb. 20:** Schema der Finite-Differenzen-Methode (Fogolari et al. 2002). Jedem Gitterpunkt werden die physikalischen Eigenschaften Ladung  $q$ , Dielektrizitätskonstante  $\epsilon$ , Ionenstärke  $I$  sowie das elektrische Potential  $\phi$  zugeordnet.

Dann wird ein kubisches Gitternetz mit der Gitternetzgröße  $h$  dem Biomolekül und dem Solvens überlagert und jedem Gitterpunkt die oben genannten physikalischen Eigenschaften zugeordnet. Ergänzend muss definiert werden, welche Bereiche des Gitters innerhalb und welche außerhalb des Proteins liegen. Allen Gitterpunkten außerhalb wird eine hohe Dielektrizitätskonstante und ein Wert für die Ionenstärke des Solvens zugeordnet, wohingegen Gitterpunkte innerhalb des Proteins eine niedrige dielektrische Konstante und keinen Wert für die Ionenstärke erhalten. Die Festlegung der Protein-Solvens-Grenzfläche erfolgt anhand der van-der-Waals-Radien der Atome und einer Testkugel, deren Radius vorgegeben werden kann (Abb. 21).

Des Weiteren muss die Ladungsverteilung definiert werden. Die Ladungen befinden sich im Allgemeinen nicht genau auf den Gitterpunkten des Netzes. Deshalb wird die Ladung gewichtet mit dem jeweiligen Abstand der Ladung zu dem jeweiligen Gitterpunkt, auf die umgebenden Gitterpunkte aufgeteilt.



**Abb. 21:** Bestimmung der Protein-Solvens-Grenzfläche mittels einer Solvensprobe mit definiertem Radius (grau), die entlang des Makromoleküls geführt wird (Bourne und Weissig 2003).

Die linearisierte Poisson-Boltzmann-Gleichung wird über das Volumen  $V$  integriert

$$\int_V \nabla \cdot [\varepsilon(\vec{r}) \nabla \phi(\vec{r})] dV - \int_V \kappa^2 \phi(\vec{r}) dV = - \int_V 4\pi \rho(\vec{r}) dV$$

Das erste Integral wird mit Hilfe des Gauß-Satzes in ein Oberflächenintegral umgewandelt

$$\int_V \nabla \cdot [\varepsilon(\vec{r}) \nabla \phi(\vec{r})] dV = \int_A \varepsilon(\vec{r}) \nabla \phi(\vec{r}) \cdot d\vec{A}$$

Damit lässt sich der Gradient des Potentials in Finiter-Differenzen-Form formulieren

$$\int_A \varepsilon(\vec{r}) \nabla \phi(\vec{r}) \cdot d\vec{A} = \sum_{i=1}^6 \varepsilon_i (\phi_i - \phi_0) h$$

wobei  $\phi_0$  das Potential des Gitterpunktes ist und  $\phi_i$  ( $i=1-6$ ) die Potentiale der benachbarten Gitterpunkte sind. Das zweite Integral lässt sich durch  $\kappa'_0 \phi_0 h^3$  annähern und für das dritte Integral erhält man  $4\pi q_0$ . Damit folgt für das Integral über das Volumen der Ausdruck

$$h \sum_{i=1}^6 \varepsilon_i (\phi_i - \phi_0) - \kappa'_0 \phi_0 h^3 + 4\pi q_0 = 0$$

Umstellen und auflösen nach  $\phi_0$  ergibt die Finite-Differenzen-Gleichung

$$\phi_0 = \frac{\left( \sum_{i=1}^6 \varepsilon_i \phi_i + \frac{4\pi q_0}{h} \right)}{\left( \sum_{i=1}^6 \varepsilon_i + \kappa'^2 h^2 \right)}$$

Ausgehend von einem gesetzten Anfangswert für  $\phi_0$  wird das elektrostatische Potential iterativ für jeden Gitterpunkt berechnet, bis ein bestimmtes Konvergenzkriterium erfüllt ist. Dieses liegt typischerweise bei 0,0001.

### 4.3 Multiconformation Continuum Electrostatics(MCCE)- Methode

Eine große Anzahl von Proteinen besitzt eine hohe konformelle Flexibilität. Diese Flexibilität ist verantwortlich dafür, dass Proteine eine Vielzahl von fundamentalen Aufgaben übernehmen. Nicht zu vernachlässigen ist diese Flexibilität auch im Zusammenhang mit den elektrostatischen Eigenschaften eines Proteins. Herkömmliche elektrostatische Methoden können diese Flexibilität nicht berücksichtigen. Bei diesen Methoden werden zwar unterschiedliche Ionisierungszustände der Aminosäuren in die Rechnung mit einbezogen, aber eine Protein- bzw. Seitenkettenflexibilität bleibt unberücksichtigt (Antosiewicz et al. 1996). Dieser Nachteil wird durch die Verwendung einer höheren Dielektrizitätskonstante des Proteins kompensiert. Mit dieser erhöhten Dielektrizitätskonstante wird versucht, die Flexibilität des Proteins zu mitteln. Auch vorhandene Strukturdaten verschiedener Proteinzustände eines Reaktionszyklus reichen nicht aus, die fehlende Flexibilität auszugleichen, da diese nur ein statisches Bild des Proteins zu einem bestimmten Zeitpunkt liefern können.

Die Multiconformation Continuum Electrostatics(MCCE)-Methode ist eine Hybridmethode aus Molekülmechanik und Kontinuumselktrostatik. Bei dieser Methodenkombination werden die Seitenkettenbewegungen der Aminosäuren explizit und der dielektrische Effekt des umgebenden Lösungsmittels implizit behandelt (Alexov und Gunner 1997, Georgescu et al. 2002, Song et al. 2009). Im Vergleich zu anderen Elektrostatik-Methoden werden in der MCCE-Methode konformelle Unterschiede der Seitenketten, die aufgrund von Ionisierungszustandsänderungen entstehen, berücksichtigt. Weiterhin kann MCCE evtl. nicht korrekte Orientierungen von Seitenketten der verwendeten Atomkoordinaten durch die Rotamererzeugung und Berechnung des energiegunstigen Rotamerzustandes ausgleichen.

Ausgehend von den Atomkoordinaten der zu untersuchenden Proteine können mit der MCCE-Methode die Gleichgewichtskonformationen und die Ionisierungszustände der Proteinseitenketten in Abhängigkeit des pH-Wertes (oder des Redoxpotentials  $E_h$ ) berechnet werden (Mao et al. 2003, Zheng und Gunner 2009). Auch Kofaktoren, Liganden und explizit behandelte Wassermoleküle können in die Rechnung einbezogen werden. MCCE berechnet die elektrostatischen Wechselwirkungen unter Berücksichtigung der vorher erzeugten Rotamere. Als Rotamer bezeichnet man eine durch MCCE erzeugte Orientierung der Seitenkette. Diese Rotamere werden durch systematische Rotation um rotierbare Bindungen erstellt. Dadurch werden jeder Aminosäure sogenannte Konformere zugeordnet, die sich nicht nur durch ihre Orientierung, d.h. durch verschiedene Seitenkettenrotamere, sondern auch durch die Wasserstofforientierungen und die Ionisierungszustände unterscheiden können (Hauser 2006). Die Gesamtheit aller Konformere

repräsentiert alle möglichen Zustände des Proteins, die in der Simulation berücksichtigt werden. Die paarweisen- und die eigen-elektrostatischen Wechselwirkungen (Wechselwirkungen zwischen den Seitenketten und dem Proteinrückgrat) werden mittels des Programms DelPhi berechnet (Nicholls und Honig 1991). DelPhi ist ein Programm, das die linearisierte Poisson-Boltzmann-Gleichung löst und somit die elektrostatischen Wechselwirkungen berechnet.

Nach der Berechnung der elektrostatischen Wechselwirkungen werden die Mikrozustände des Proteins gebildet. Ein Mikrozustand ist eindeutig definiert durch die Besetzung genau eines Konformers für jede Aminosäure. Ein Konformer ist gegeben durch eine Änderung der Seitenkettenorientierung, durch eine Änderung des Ionisierungszustandes oder durch die Kombination aus beidem. Dadurch entsteht schon bei wenigen hundert Konformeren eine sehr hohe Zahl von Mikrozuständen. Für die Gesamtheit dieser Mikrozustände wird die freie Energie  $\Delta G$  berechnet. Diese setzt sich aus den einzelnen Werten für die elektrostatischen und nicht elektrostatischen Wechselwirkungen zusammen. Aus diesen lassen sich Energietabellen („look-up-tables“) mit Eigen- und Paarweise-Wechselwirkungsenergien erzeugen. Abschließend wird die Besetzungswahrscheinlichkeit jedes Konformers mittels eines MC-Samplings in Abhängigkeit des pH-Werts (oder Redoxpotentials  $E_h$ ) bestimmt.

Das Programm MCCE wurde von Marylin Gunner und ihrer Arbeitsgruppe am City College of New York, USA entwickelt und wird im Folgenden genauer beschrieben.

#### 4.3.1 Ablaufschema MCCE

Das MCCE-Programm ist in vier Schritte unterteilt (Abb. 22). Als erstes werden die Strukturdaten überprüft und gegebenenfalls modifiziert bzw. korrigiert (Kapitel 4.3.2). Im zweiten Schritt werden zuerst alle Konformere erzeugt, um dann mittels einer einfachen Energiefunktion einige tausend Atompositionen der Aminosäureseitenketten aus der kompletten Anzahl der erzeugten Atompositionen auszuwählen (Kapitel 4.3.3). Im dritten Schritt werden die Energietabellen für die Selbstenergie jedes Konformers und die Wechselwirkungen zwischen jedem Konformer berechnet und erzeugt (Kapitel 4.3.4). Im vierten und letzten Schritt werden die Besetzungswahrscheinlichkeiten jedes Konformers in Abhängigkeit vom pH-Wert bzw. vom  $E_h$ -Wert bestimmt (Kapitel 4.3.5) (Song et al. 2009).

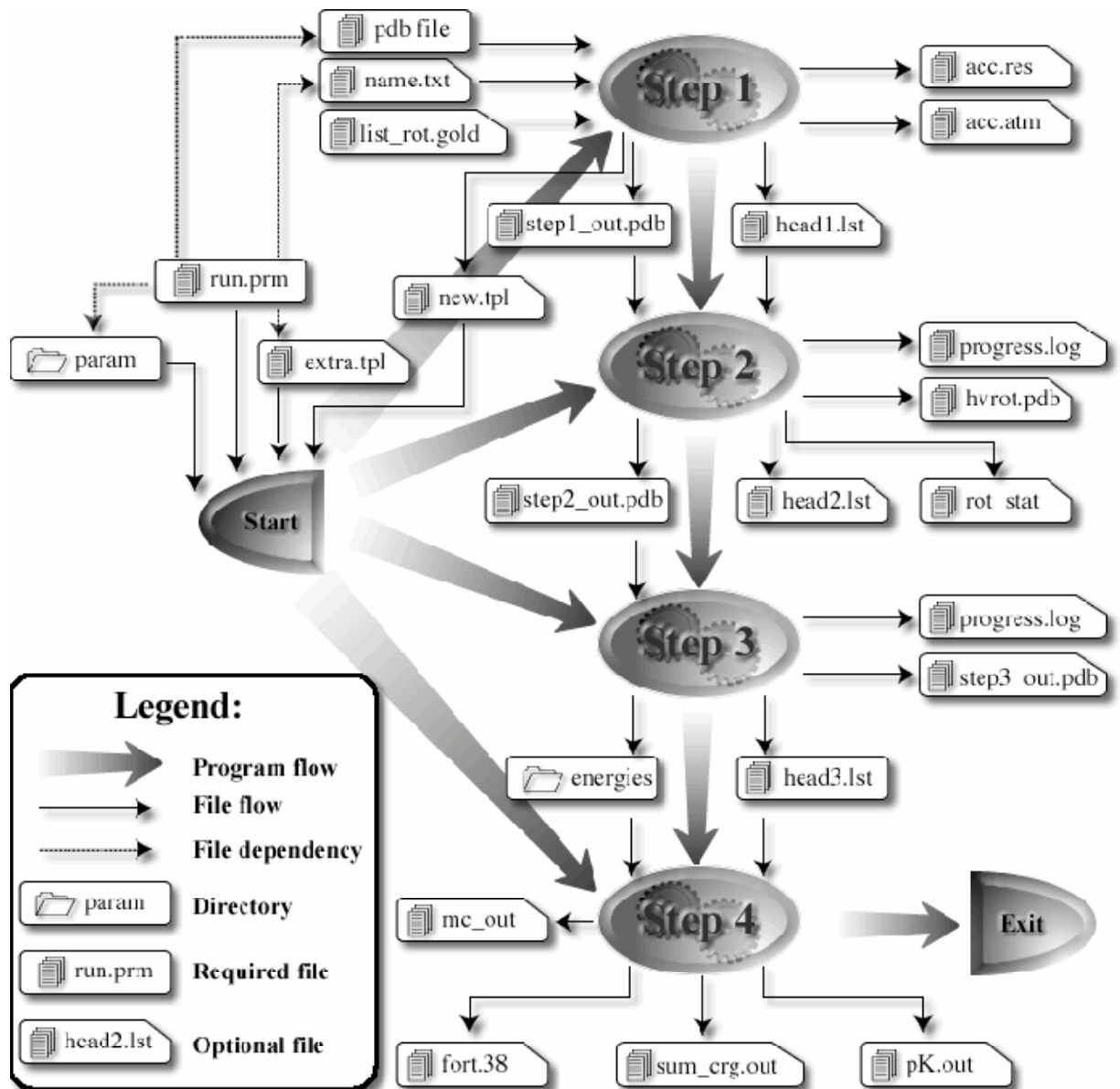


Abb. 22: Ablaufschema des MCCE-Programms (<http://134.74.90.158/>).

#### 4.3.2 Erstellen des Datenformats und Hinzufügen von Protonen

Zuerst müssen die Atomkoordinaten des zu simulierenden Proteins in das MCCE-Programm eingelesen werden. Diese können von der Proteindatenbank bezogen werden (Berman et al. 2000). Die eingelesenen Daten werden in ein MCCE-kompatibles Datenformat umgewandelt. Bei fehlenden oder fehlerhaften Atomkoordinaten werden diese durch das MCCE-Programm ergänzt bzw. korrigiert. Gelingt dies dem Programm wegen fehlender Daten in der MCCE-Datenbank nicht, so wird eine Fehlermeldung ausgegeben. Damit ist sichergestellt, dass nur vollständige und korrekte Datensätze zur Berechnung verwendet werden. Kofaktoren, die nicht in MCCE implementiert sind, müssen gegebenenfalls in den Parameterdateien (tpl-Dateien) definiert werden, da sie sonst wie neutrale Atome behandelt werden.

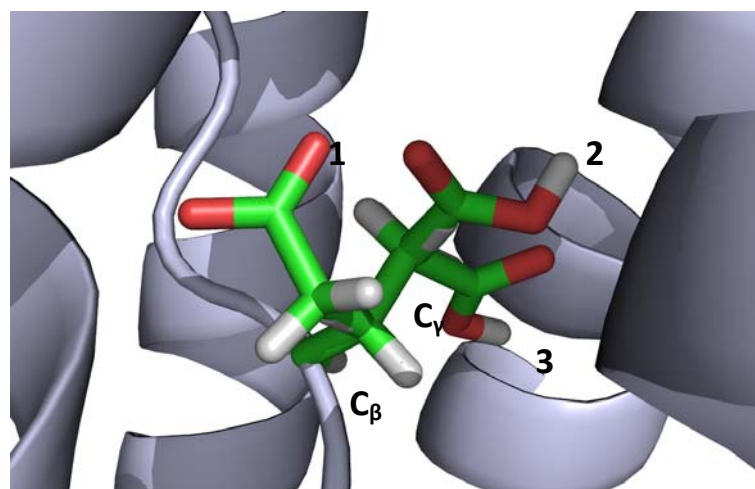


Bei der Formatierung der Strukturdaten in das MCCE-kompatible Datenformat werden die Koordinaten von Wasserstoffatomen, falls diese in der Strukturdatei enthalten sind, entfernt und nach spezifischen Regeln für die Lage von Wasserstoffatomen in Aminosäuren von MCCE hinzugefügt (Alexov und Gunner 1997, Georgescu et al. 2002).

Die solvenszugängliche Oberfläche (SAS) wird vom Programm SURFV berechnet (Sridharan et al. 1992). Diese Werte werden sowohl für die Residuen als auch für die einzelnen Atome ausgegeben. Danach werden Protonen in ihr Torsionsminimum gesetzt. Sollten explizite Wassermoleküle in der Strukturdatei vorhanden sein, wird auch deren SAS-Wert berechnet und mit einem einzustellenden Wert verglichen. Sollte der SAS-Wert der Wassermoleküle größer als der eingestellte Wert des Abbruchkriteriums sein, werden diese Wassermoleküle für die Berechnung entfernt und nicht in die weiteren Schritte einbezogen. Dies ist nötig, da explizite Wassermoleküle mit einem großen SAS-Wert eine große konformelle Freiheit aufweisen, welche sehr viele Konformere erzeugen und die Rechendauer sehr stark erhöhen würde.

### 4.3.3 Erzeugen der Rotamere

In MCCE werden für alle gegebenen Seitenketten der Aminosäuren Rotamere erzeugt. Dazu wird das Protein in ein starres Rückgrat und in flexible Seitenketten eingeteilt. Liegen in der zu simulierenden Strukturdatei auch Kofaktoren und explizit Wassermoleküle vor, so werden auch für diese Rotamere erzeugt. Ebenso werden für die ionisierbaren Gruppen sowohl neutrale als auch geladene Konformere erzeugt. Die Rotamere entstehen durch Rotation der Seitenketten der einzelnen Residuen um die rotierbaren Bindungen (Abb. 23). Der Rotationswinkel lässt sich vor Beginn der Rechnung in den MCCE-Parametern festlegen. Rotamere, die sterisch nicht möglich sind, werden nicht zugelassen, d.h. sie werden gelöscht.



**Abb. 23:** Drei beispielhafte Konformere der Glutaminsäure. (1) ionisiertes Konformer. (2) und (3) protonierte Rotamere, die am  $C_\beta$  bzw. am  $C_\gamma$  gedreht sind.

Fügt man eine zu hohe Anzahl von Rotameren hinzu, indem man den vorgegebenen Rotationswinkel sehr klein wählt, so erhöht dies einerseits die Rechenzeit und andererseits kann sich dadurch, vor allem an der Oberfläche des Proteins, die dielektrische Grenze signifikant verschieben. Erzeugt man zu wenige Rotamere, so können Konformationsänderungen möglicherweise nicht beobachtet werden. Als geeigneter Parameter für die Einstellung der Rotationswinkel für große Proteine (>500 Residuen) hat sich ein Winkel von 60° herausgestellt (Weidemüller und Hauser 2008, Weidemüller und Hauser 2009). Vorteilhaft ist es aber, während einer Simulation gezielt die Rotationswinkel für Bereiche besonderen Interesses zu erhöhen. Zum Ausgleich der dadurch erhöhten Rechenzeit ist es zweckmäßig, die Rotationswinkel anderer Bereiche zu erniedrigen. Vor allem sollte der Rotationswinkel der explizit behandelten Wassermoleküle nicht zu hoch gewählt werden (max. 120°). Wegen der im Allgemeinen sehr hohen Rotationsfreiheit von Wassermolekülen besteht die Gefahr, dass zu viele ähnliche Wassermoleküle erzeugt werden, die einerseits die Rechenzeit stark verlängern und andererseits keinen Vorteil für die Genauigkeit bzw. für die Auswertung der Simulationen darstellen.

#### 4.3.4 Energieberechnung und Erstellen von Energietabellen

Für die Erstellung der Energietabelle der  $M$  Konformere, werden  $M$ -dimensionale Vektoren erstellt. Diese enthalten die:

- $\Delta G_{torsion}$  die Torsionsenergie
- $\Delta G_{bkbni}^{LJ}$  die nicht-elektrostatischen Wechselwirkungen mit dem Rückgrat
- $\Delta G_{bkbni}^{CE}$  die elektrostatischen Wechselwirkungen mit dem Rückgrat
- $\Delta\Delta G_{rxn,i}$  die Desolvatationsenergie

Für jedes Konformer wird die elektrostatische Energie mittels des Programms DelPhi berechnet. Dabei wird eine dielektrische Konstante von  $\epsilon = 4$  für das Protein und  $\epsilon = 80$  für das umgebende Solvens mit einer Ionenstärke von  $I = 0,15$  M verwendet. Diese Parameter können vor Beginn der Rechnung verändert werden, sind standardmäßig aber auf die vorher erwähnten Werte festgelegt. PARSE-Parameter (Parameters for solvation energy) werden für die Atomladungen und Atomradien benutzt (Sitkoff et al. 1994). Die Torsions- und die nicht-elektrostatischen Wechselwirkungen (Lennard-Jones-Potential) werden aus Referenztabellen bezogen (Alexov und Gunner 1997, Georgescu et al. 2002). Die Differenz der Desolvatationsenergie wird berechnet, indem das Residuum  $A$  mit dem Konformer  $i$  aus der Solvensumgebung in die Proteinumgebung gebracht wird.

$$\Delta\Delta G_{rxn,i} = \Delta G_{rxn,Ai} - \Delta G_{rxn,Ai(solv)}$$

### 4.3.5 Simulierte pH- oder Eh-Titration

Im letzten Schritt wird mittels eines Monte-Carlo-Samplings die Besetzungswahrscheinlichkeit der einzelnen Konformere durch die Berechnung der Energien der einzelnen Mikrozustände bestimmt. Ein Mikrozustand ist definiert durch ein Konformer eines Residuums. Die Besetzungswahrscheinlichkeiten ergibt sich aus der freie Energie  $\Delta G_n$  des n-ten Mikrozustandes.

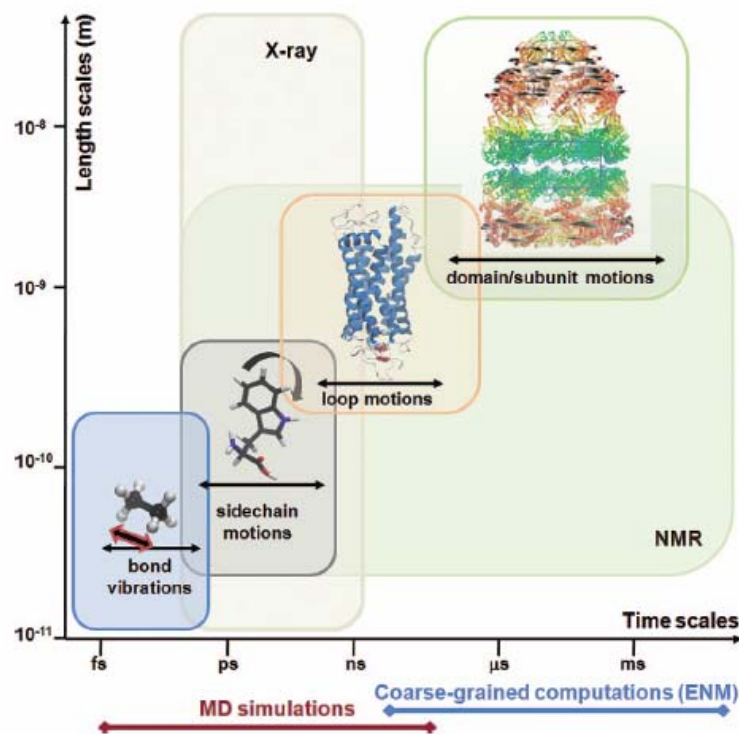
$$\begin{aligned} \Delta G_n = & \sum_{i=1}^M \delta_n(i) \{ \gamma(i) [2,3k_b T (pH - pK_{sol,i}) - n_i F (E_h - E_{m.sol,i})] \\ & + (\Delta\Delta G_{rxn,i} + \Delta G_{bkbni}^{CE} + \Delta G_{bkbni}^{LJ} + \Delta G_{torsion,i} + \Delta\Delta G_{SAS,i}) \} \\ & + \sum_{i=1}^M \delta_n(i) \sum_{j=i+1}^M \delta_n(j) [\Delta G_{ij}^{CE} + \Delta G_{ij}^{LJ}] \end{aligned}$$

$k_b T$	0,43 $\Delta pK$ -Einheiten (0,58 kcal/mol bei 20° C)
M	Anzahl der Konformere
n	Anzahl der Elektronen, die während einer Redoxreaktion gewonnen und abgegeben werden
F	Faradaykonstante
$\delta_n(i) = 1$	für die ausgewählten Konformere im betrachteten Zustand
$\delta_n(i) = 0$	für alle anderen Konformere eines Residuums
$\gamma(i) = 1$	für Basen
$\gamma(i) = -1$	für Säuren
$\gamma(i) = 0$	für alle neutralen Gruppen (polare Gruppen, neutrale Säuren, neutrale Basen und Wassermoleküle)
$pK_{sol,i}$	pK-Wert einer Aminosäure in Lösung
$E_{m.sol,i}$	Mittelpunktpotential in Lösung
$\Delta\Delta G_{rxn,i}$	Differenz der Desolvatationsenergien für das i-te Residuum in Lösung und im Protein
$\Delta G_{bkbni}^{CE}$	elektrostatische Wechselwirkungsenergie zwischen dem i-ten Konformer und den Dipolen des Rückgrats
$\Delta G_{bkbni}^{LJ}$	nicht-elektrostatische Lennard-Jones-Wechselwirkungsenergie zwischen dem i-ten Konformer, dem Rückgrat und den Seitenketten ohne Bewegungsfreiheitsgrade
$\Delta G_{torsion,i}$	Torsionsenergie des i-ten Konformer
$\Delta\Delta G_{SAS,i}$	van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen dem i-ten Konformer und dem impliziten Solvens
$\Delta G_{ij}^{CE}$	elektrostatische Wechselwirkungsenergie zwischen dem i-ten und j-ten Konformer
$\Delta G_{ij}^{LJ}$	Lennard-Jones-Wechselwirkungsenergie zwischen dem i-ten und j-ten Konformer.

Das MC-Sampling beruht auf folgendem Prinzip. Ausgehend von einer zufällig gewählten Besetzung eines Konformers pro Residuum wird die Systemenergie für das Protein berechnet. Dies geschieht durch Addieren der Wechselwirkungsenergien, die das Programm vorher durch Berechnung der Poisson-Boltzmann-Gleichung bestimmt hat. Dann wird ein zufällig gewähltes Residuum mit einem genauso zufällig ausgewählten Konformer neu besetzt und abermals die Systemenergie berechnet. Ist die Differenz der beiden Systemenergien  $\Delta E$  kleiner null, wird der neue Zustand akzeptiert. Ist der Wert für  $\Delta E$  größer als null, wird der neue Wert mit einer Wahrscheinlichkeit von  $\exp(-\Delta E/kT)$  akzeptiert. Die Wahrscheinlichkeit, mit der das jeweilige Konformer für einen bestimmten pH-Wert besetzt wird, basiert dann auf den Energien aller Zustände, die für dieses Konformer vorliegen.

## 4.4 Molekulardynamik-Simulation

In Molekulardynamik(MD)-Simulationen werden die Eigenschaften und das zeitliche Verhalten von Mehrteilchensystemen untersucht. MD-Simulationen beruhen auf der numerischen Lösung der Newtonschen Bewegungsgleichung für ein System mit  $N$  wechselwirkenden Teilchen. Die erste MD-Simulation wurde 1957 von Alder und Wainwright an zweidimensionalen, harten Kugeln durchgeführt (Alder 1957). Erst viele Jahre später wurden die ersten Simulationen an Proteinen durchgeführt (McCammon et al. 1977, van Gunsteren und Karplus 1982). Nach über 50 Jahren der Weiterentwicklung der MD-Simulation ist es heute möglich, komplizierte, große Systeme in einem Zeitbereich von einigen Nano- bis Millisekunden zu simulieren (Freddolino et al. 2006, Jayachandran et al. 2006, Klein und Shinoda 2008). Die rasante Entwicklung der Computertechnik, aber auch die Verbesserung der Kraftfelder sowie effizientere Simulationstechniken und die Parallelisierung dieser Techniken hat diesen Fortschritt ermöglicht. Die Dynamik und Funktion von Proteinen und das damit verbundene Verständnis von Zellprozessen ist somit auch computergestützten Untersuchungen zugänglich geworden (van Gunsteren et al. 2006, van der Kamp et al. 2008).



**Abb. 24:** Längen- und Zeitskala von MD-Simulationen (Bahar et al. 2010).

In Abb. 24 ist die Zeit gegen die Größenskala von biologischen Systemen aufgetragen. Auf der Zeitskala ist der Bereich hervorgehoben, der sich mittels MD-Simulationen abdecken lässt. Daraus folgt, dass die Trajektorie, die verfolgt werden kann, umso kürzer ist, je größer das zu simulierende System ist. Dies bedeutet, dass ab einer Größe von ca. 10 nm und 100 ns die Methode der

MD-Simulation an ihre Grenze stößt. Um trotzdem größere biologische Systeme bzw. längere Zeitskalen zu untersuchen, benutzt man die "Coarse-grained"-Methode. Bei dieser werden sogenannte Pseudo-Atome eingefügt, die typischerweise repräsentativ für drei bis fünf einzelne Atome stehen. Dadurch kann die Größe des zu simulierenden Systems deutlich reduziert und die Zeit- und Längenskala um einige Größenordnungen erweitert werden.

Die Dynamik eines Systems wird durch die zeitabhängige Schrödinger-Gleichung exakt beschrieben

$$\hat{H}\Psi = \frac{i\hbar}{2\pi} \frac{\partial \Psi}{\partial t}$$

wobei  $\hat{H}$  für den Hamilton-Operator,  $\Psi$  für die die Wellenfunktion des Systems und  $\hbar$  für das Plancksche Wirkungsquantum steht. Die Gleichung ist eine Funktion der Koordinaten und Impulse aller Kerne und Elektronen. Diese partielle Differentialgleichung ist ab zwei Atomen nicht mehr analytisch lösbar und führt bereits für wenige Atome auf eine nicht mehr zu berechnende Anzahl von Freiheitsgraden. Die Anzahl der Freiheitsgrade muss daher reduziert werden. Dazu eignen sich verschiedene Näherungsverfahren. Eines dieser Verfahren ist die Born-Oppenheimer-Näherung. Diese geht von der Tatsache aus, dass sich die Elektronen wesentlich schneller bewegen als die wegen ihrer höheren Masse langsameren Atomkerne. Dies erlaubt eine unabhängige Betrachtung der Bewegung von Atomkernen und Elektronen. Im Rahmen der Born-Oppenheimer-Näherung kann somit die Bewegung der Elektronen instantan zur Bewegung der Atomkerne angenommen werden. Dadurch ermöglicht die Born-Oppenheimer-Näherung es, die Atomkernbewegungen in Newtonschen Bewegungsgleichungen auszudrücken. Die Kräfte, die dabei auf die  $N$  Atome wirken, werden mittels eines Kraftfeldes beschrieben, das empirisch die verschiedensten intramolekularen Kräfte, die in der Realität auf die  $N$  Teilchen wirken, simuliert. Typische Kraftfelder zur Simulation von biologischen Systemen sind beispielsweise CHARMM (Brooks et al. 1983, Brooks et al. 2009), Amber (Case et al. 2005) und GROMOS (Hermans et al. 2001).

Aus der Potentialfunktion  $V(\vec{x}_1, \vec{x}_2, \dots, \vec{x}_N)$  aller  $N$  Atome mit Positionen  $\vec{x}_1, \vec{x}_2, \dots, \vec{x}_N$  lässt sich die Kraft  $\vec{F}_j$  für jedes Atom  $j$  nach folgender Gleichung berechnen

$$\vec{F}_j = -\nabla V(\vec{x}_1, \vec{x}_2, \dots, \vec{x}_N)$$

Klassisch lassen sich die Atombewegungen durch die Newtonschen Bewegungsgleichungen beschreiben.

$$m_j \frac{d^2 \vec{x}_j(t)}{dt^2} = \vec{F}_j(\vec{x}_1(t), \vec{x}_2(t), \dots, \vec{x}_N(t))$$

Zu beachten ist, dass die Kräfte, die auf das simulierte System wirken, sich sehr schnell ändern können. Deshalb müssen die Berechnungen in vielen kurzen, nur Femtosekunden dauernden Zeitschritten, wiederholt werden.

Die Integration der  $N$  Gleichungen liefert die Trajektorie der  $N$  Teilchenpositionen zur Zeit  $t + \Delta t$ . Dabei ist zu beachten, dass der Algorithmus, der die Integration numerisch durchführt, sowohl energie- als auch impulsenerhaltend ist. Ein für MD-Simulationen oft eingesetzter Algorithmus zur Integration der Bewegungsgleichungen ist der Verlet-Algorithmus oder Abwandlungen von diesem, wie z.B. der Velocity-Verlet-Algorithmus (Verlet 1967).

Die Taylorentwicklung der Atomkoordinaten nach der Zeit  $t + \Delta t$  und  $t - \Delta t$  ergibt

$$r(t + \Delta t) = r(t) + v(t)\Delta t + \frac{F(t)}{2m}\Delta t^2 + \frac{1}{3!}\frac{d^3r}{dt^3}\Delta t^3 + \dots$$

$$r(t - \Delta t) = r(t) - v(t)\Delta t + \frac{F(t)}{2m}\Delta t^2 - \frac{1}{3!}\frac{d^3r}{dt^3}\Delta t^3 + \dots$$

Die Kraft muss während der kleinen Integrationszeitschritte  $\Delta t$  konstant sein. Die Addition der beiden Formeln ergibt dann

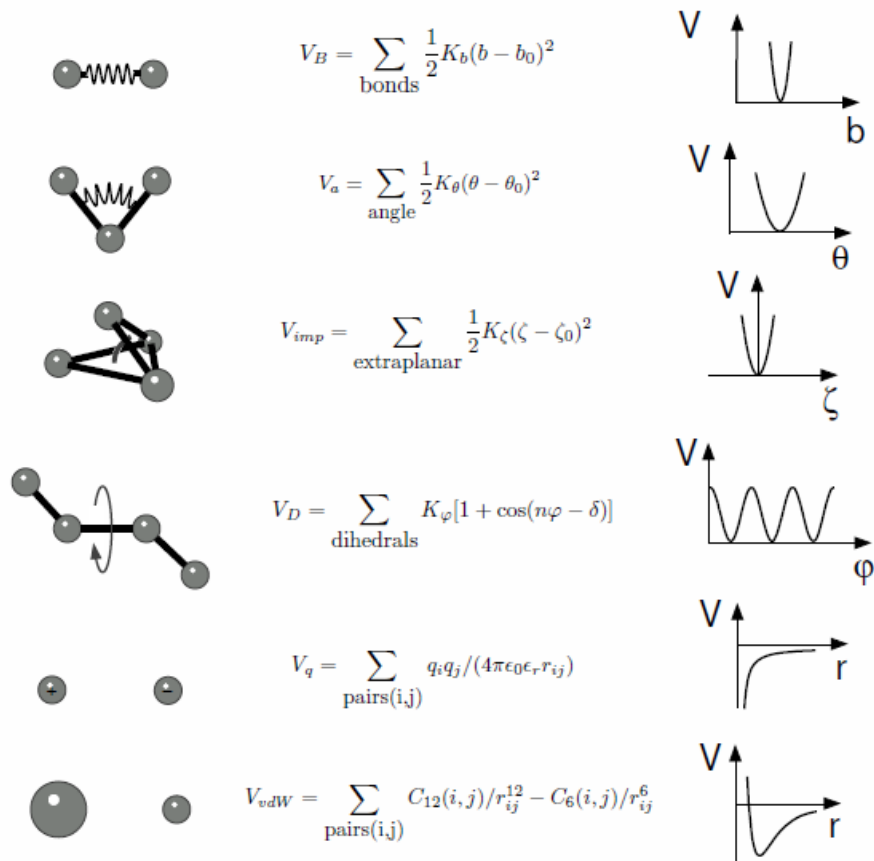
$$r(t + \Delta t) \approx 2r(t) - r(t - \Delta t) + \frac{F(t)}{m}\Delta t^2$$

Damit ist es möglich, die Position zur Zeit  $t + \Delta t$  durch die Position zur Zeit  $t - \Delta t$ , die Position  $r$  und die Beschleunigung zur Zeit  $t$  zu berechnen.

Ein typisches Potential  $V(\vec{x}_1, \vec{x}_2, \dots, \vec{x}_N)$  für ein Kraftfeld wird beschrieben durch folgende Terme

$$V(\vec{x}_1, \vec{x}_2, \dots, \vec{x}_N) = \sum_{\text{Bindungen}} \frac{1}{2} k_i^b (b_i - b_0)^2 + \sum_{\text{Winkel}} \frac{1}{2} k_i^\theta (\theta_i - \theta_0)^2 + \sum_{\text{Dihedral}} k_i^\varphi (1 + \cos(n_i \varphi_i - \delta_i)) + \sum_{\substack{j \neq i \\ \text{van-der-Waals}}} 4 \epsilon_{ij} \left[ \left( \frac{\sigma_{ij}}{x_{ij}} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma_{ij}}{x_{ij}} \right)^6 \right] + \sum_{\substack{j \neq i \\ \text{Coulomb}}} \frac{1}{4\pi\epsilon} \frac{q_i q_j}{x_{ij}}$$

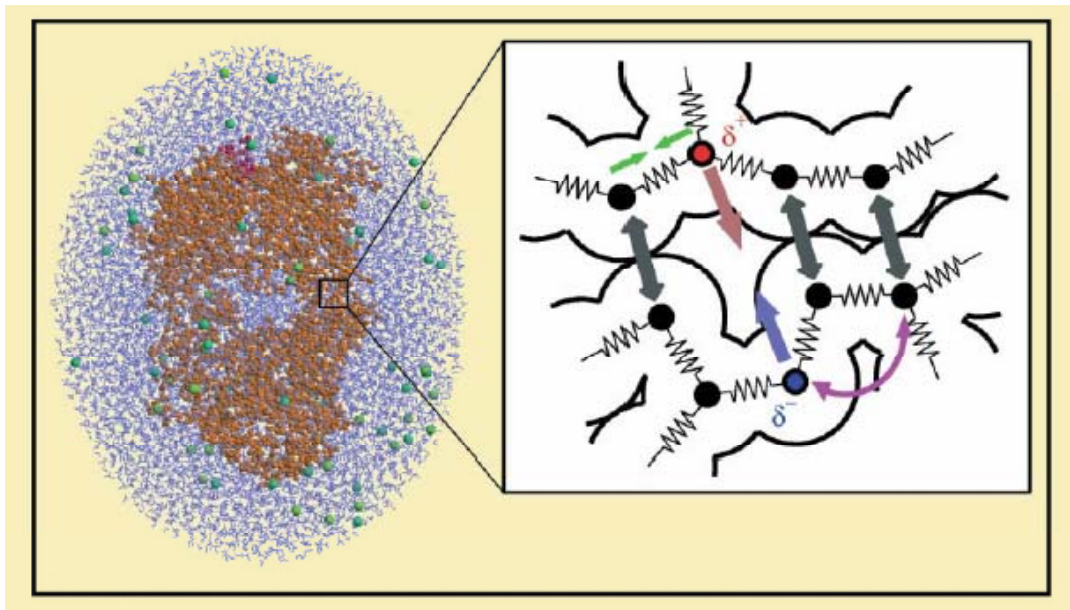
In dem oben dargestellten empirischen Kraftfeld sind die Kraftkonstanten ( $k_i^b, k_i^\theta, k_i^\varphi$ ) und die Referenzgrößen ( $b_0, \theta_0$ ) enthalten. Bei der Bindungswinkelwirkung handelt es sich um ein harmonisches Potential mit der Kraftkonstanten  $k_i^b$  mit der minimalen Bindungsenergie  $b_0$ .  $k_i^\theta$  ist die Kraftkonstante des Bindungswinkels mit der minimalen Biegeschwingungsenergie  $\theta_0$ .  $k_i^\varphi$  ist die Kraftkonstante des Dihedralwinkels.



**Abb. 25:** Schematisierte Kräfte in einem typischen Kraftfeld (Schröder 2004). Dargestellt sind die Änderungen der Bindungslängen und der Bindungswinkel. Diese können durch ein harmonisches Potential angenähert werden, wobei man die Bindungen als Federn mit einer Federkonstante  $K$  betrachten kann. Die Änderung der Dihedralwinkel wird durch eine trigonometrische Funktion angenähert. Die elektrostatischen und van-der-Waals-Wechselwirkungen werden typischerweise durch ein Coulomb-Potential bzw. durch das Lennard-Jones-Potential berücksichtigt.

In ein typisches Kraftfeld gehen sowohl gebundene als auch nicht gebundene Wechselwirkungen ein. Diese werden durch Kugel-Feder-Modelle beschrieben. Die gebundenen Wechselwirkungen sind in Abb. 26 durch grüne und violette Pfeile gekennzeichnet. Diese setzen sich zusammen aus den ersten drei Termen des empirischen Kraftfeldes, wobei in Abb. 26 nur die Bindungswechselwirkungen (grüne Pfeile) und die Wechselwirkungen der Winkel (violette Pfeile) dargestellt sind. Die Bindungswechselwirkungen beschreiben die Änderung des Abstandes zweier Atome. Die Winkel-Wechselwirkungen repräsentieren die Änderung des Winkels zwischen drei gebundenen Atomen. Die nicht dargestellten Torsionswechselwirkungen geben die Änderung des Torsionswinkels von vier aufeinanderfolgenden Atomen an. Die van-der-Waals- und die Coulomb-Wechselwirkungen werden als nicht gebundene Wechselwirkungen bezeichnet, wobei die van-der-Waals-Wechselwirkungen durch graue Pfeile und die Coulomb-Wechselwirkungen der partiell geladenen Atome durch blaue und rote Pfeile dargestellt werden.

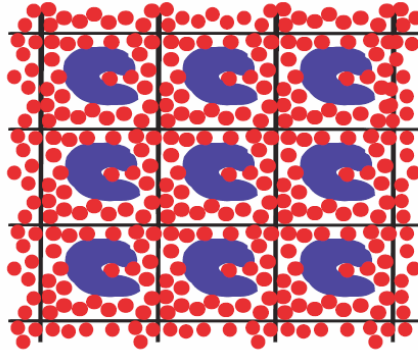




**Abb. 26:** Typisches MD-Simulationssystem (links) mit schematisierten Kräften (rechts) (de Groot et al. 2006). Das Protein (rot) befindet sich in einer Wasserhülle (blau), in der zusätzlich Gegenionen (grün) vorliegen. Die auf die Atome wirkenden Kräfte sind auf der rechten Seite durch Pfeile schematisiert dargestellt: Bindungswechselwirkungen (grün), Wechselwirkungen der Winkel (violett), van-der-Waals-Wechselwirkungen (grau) und Coulomb-Wechselwirkungen (rot und blau).

Zur genauen Beschreibung von biologischen Systemen sollten sich diese in einer möglichst detailgetreuen Umgebung befinden. Im Falle von Proteinen sollten daher explizite Wassermoleküle, Ionen und Kofaktoren berücksichtigt werden. Solch ein typisches Simulationssystem für lösliche Proteine ist in Abb. 26 auf der linken Seite dargestellt. Dabei ist gut zu erkennen, dass sich das zu simulierende Protein (rot) in einer Wasserhülle befindet, die aus explizit behandelten Wassermolekülen (blau) besteht. In diese explizit modellierte Proteinumgebung werden weiterhin noch Gegenionen (grün) eingefügt, die für die Ionenstärke des Solvens sorgen. Handelt es sich um Membranproteine, sollte weiterhin deren Lipiddoppelmembran berücksichtigt werden. Ist das Simulationssystem dementsprechend konstruiert, so kann es als physiologisch betrachtet werden. Anhand des in Abb. 26 schematisiert dargestellten Simulationssystems lassen sich die Dimensionen solcher Systeme veranschaulichen. Allein für die Wasserhülle muss eine große Anzahl von Wasserstoff- und Sauerstoffatomen in das Simulationssystem eingebracht werden. Die Atome des eigentlich zu simulierenden biologischen Systems und gegebenenfalls noch weitere Atome für eine biologische Membran, in die das Protein eingebettet ist, sind dabei noch gar nicht berücksichtigt. Somit erfordert die Modellierung der Umgebung oft den Großteil der zu simulierenden Atome. In Fällen von Wasser-Membran-Komplexen kann die Umgebung bis zu 90 % des zu simulierenden Gesamtsystems ausmachen.

Da man jedoch oft nicht an den Eigenschaften bzw. an dem zeitlichen Verhalten des Lösungsmittels (Wasser) interessiert ist, benutzt man häufig periodische Randbedingungen, um die Anzahl der Wassermoleküle und somit auch den Rechenaufwand zu reduzieren (Abb. 27).



**Abb. 27:** Schematische Darstellung eines Systems mit periodischen Randbedingungen (van Gunsteren et al. 2006).

Dazu wird ein System verwendet, das in alle Raumrichtungen unendlich oft kopiert wird (Abb. 27). Atome in benachbarten Zellen können nicht direkt miteinander wechselwirken. Diese Einschränkung ist wichtig, um in der Simulation nicht gewollte Wechselwirkungen zwischen den unendlich oft kopierten Zellen zu vermeiden.

#### 4.4.1 Fehlerbetrachtung der Simulationsmethoden

Bei der Betrachtung von Ergebnissen, die mittels computergestützter Methoden, wie z.B. MD-Simulation oder MC-Sampling gewonnen wurden, muss auch die Ungenauigkeit der Methoden berücksichtigt werden. Die verwendeten numerischen Verfahren bestimmen die Rechengenauigkeit der Ergebnisse. Vor allem für große und komplexe biologische Systeme können die computergestützten Verfahren aus Rechenzeitgründen nur einen Bruchteil der zu berücksichtigenden Atome simulieren. Daher entstehen für diese Methoden oft Abhängigkeiten der Resultate von den verwendeten Parametern, wie z.B. Teilchenzahl oder Randbedingungen. So ist der Integrationsschritt  $\Delta t$  bei den MD-Simulationen hinreichend klein zu wählen, um die numerischen Diskretisierungsfehler zu minimieren. Des Weiteren sind aufgrund dieser endlichen Zeitschritte die numerischen Fehler nicht systematisch, sodass die Ergebnisse um den korrekten Wert fluktuieren. Aus diesem Grund werden die Trajektorien, die aus den MD-Simulationen erhalten werden, oftmals mehrfach berechnet um so eine gemittelte Trajektorie zu erhalten. Aufgrund des vorliegenden großen Systems, die P-Typ-ATPasen, und des langen zu simulierenden Zeitraums, konnten die MD-Simulationen für die verschiedenen P-Typ-ATPasen und die jeweiligen Enzymzustände nicht mehrfach durchgeführt werden. Da diese MD-Simulationen aber als Startstrukturen für anschließende Elektrostatik-Rechnungen benutzt wurden, ist dies kein großer Nachteil, da in den Elektrostatik-Rechnungen die Seitenketten noch flexibel sind.

Bei der Berechnung der pK-Werte und der Seitenkettenorientierungen wird die Besetzungswahrscheinlichkeit der einzelnen Konformere mittels eines MC-Samplings berechnet. Da dies eine stochastische Methode ist, kann ausgeschlossen werden, dass exakt das gleiche Ergebnis für die Besetzungswahrscheinlichkeit zwischen zwei Elektrostatik-Rechnungen vorliegt. Da aber die am meistbesetzten Konformere bei der Untersuchung der Energietransduktion betrachtet und die pK-Werte bei dem Protonengegentransport untersucht werden, wurde der Einfluss des MC-Samplings auf das Ergebnis untersucht. Es kann festgehalten werden, dass im Normalfall immer die gleichen Konformere als meistbesetztes Konformer berechnet werden. Der Fehler in der Bestimmung der pK-Werte konnte auf ca. 0.5 pK-Einheiten zwischen zwei identischen Elektrostatik-Rechnungen bestimmt werden. Die Abweichung des berechneten zum experimentellen pK-Wert ist in Kapitel 5.2.2 erläutert.

Ein weiterer Parameter von dem die Genauigkeit der Ergebnisse der Elektrostatik-Rechnungen stark abhängt, ist die Wahl der zu erzeugenden Konformere. Dies kann sowohl die Rechendauer stark erhöhen als auch die dielektrische Grenze des Proteins beeinflussen. Die Bestimmung der zu erzeugenden Konformere ist im Kapitel 5.1.2 und Kapitel 5.2.2 erläutert.

## 4.5 Strukturdaten

Die Tabelle 3 und die Tabelle 4 geben einen Überblick über alle zur Zeit vorhandenen Strukturdaten der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase und der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase.

Zustand	PDB-CODE	Auflösung [ $\text{\AA}$ ]	Referenz
$\text{E1}\cdot 2\text{Ca}^{2+}$	2C9M	3,0	(Jensen et al. 2006)
$\text{E1}\cdot 2\text{Ca}^{2+}$	1SU4	2,4	(Toyoshima et al. 2000)
$\text{E1}\cdot \text{ATP}\cdot 2\text{Ca}^{2+}$	1VFP	2,9	(Toyoshima und Mizutani 2004)
$\text{E1}\cdot \text{ATP}\cdot 2\text{Ca}^{2+}$	1T5S	2,6	(Sorensen et al. 2004)
$\text{E1P}\cdot \text{ADP}\cdot 2\text{Ca}^{2+}$	1T5T	2,9	(Sorensen et al. 2004)
$\text{E1P}\cdot \text{ADP}\cdot 2\text{Ca}^{2+}$	2ZBD	2,4	(Toyoshima et al. 2004)
$\text{E1P}\cdot 2\text{Ca}^{2+}$	3BA6	2,8	(Olesen et al. 2007)
E2P	2ZBE	3,8	(Toyoshima et al. 2007)
E2P	2ZBF	2,4	(Toyoshima et al. 2007)
E2P	3B9B	2,6	(Olesen et al. 2007)
E2P	2O9J	2,7	(Moncoq et al. 2007)
E2P	2OAO	3,4	(Moncoq et al. 2007)
E2P	1WPG	2,3	(Toyoshima et al. 2004)
E2-P	1XP5	3,0	(Olesen et al. 2004)
E2-P	2ZBG	2,5	(Toyoshima et al. 2007)
E2-P	3B9R	3	(Olesen et al. 2007)
E2-P	3FPB	2,55	(Laursen et al. 2009)
E2-P	3FGO	2,5	(Laursen et al. 2009)
E2-P	3FPS	3,2	(Laursen et al. 2009)
E2	1IWO	3,1	(Toyoshima und Nomura 2002)
E2	2AGV	2,4	(Obara et al. 2005)
E2	2BY4	3,1	(Schoel et al. 2006)

E2	2C88	3,1	(Jensen et al. 2006)
E2	2DQS	2,5	(Toyoshima et al. 2004)
E2	2EAR	3,1	(Takahashi et al. 2007)
E2	2EAS	3,4	(Takahashi et al. 2007)
E2	2EAU	2,8	(Takahashi et al. 2007)
E2	2EAT	2,9	(Takahashi et al. 2007)
E2	2C8L	3,1	(Jensen et al. 2006)
E2	3NAL	2,65	(Winther et al. 2010)
E2	3NAM	3,1	(Winther et al. 2010)
E2	3NAN	3,1	(Winther et al. 2010)
E2	1KJU	Elektronenmikroskopie	(Xu et al. 2002)

**Tabelle 3:** Verfügbare Kristallstrukturen der Ca<sup>2+</sup>-ATPase aus der pdb-Datenbank (Stand Oktober 2010).

Zustand	PDB-CODE	Auflösung [Å]	Referenz
E2-P	3B8E	3,5	(Morth et al. 2007)
E2-P	3KDP	3,5	(Morth et al. 2007)
E2-P	3A3Y	2,8	(Ogawa et al. 2009)
E2-P	2XZE	2,4	(Shinoda et al. 2009)

**Tabelle 4:** Vorhandene Kristallstrukturen der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase aus der pdb-Datenbank (Stand Oktober 2010).

### 4.5.1 Energietransduktion

Die für die Simulationen verwendeten Strukturdaten zur Untersuchung der Energietransduktion in P-Typ-ATPasen werden nachfolgend genauer beschrieben.

#### **Ca<sup>2+</sup>-ATPase (pdb-Datei: 1SU4)**

Kristallstruktur der Ca<sup>2+</sup>-ATPase mit zwei gebundenen Calciumionen. Diese Struktur entspricht dem E1-Zustand des Proteins und wurde mittels Röntgenstreuung mit einer Auflösung von 2,6 Å ermittelt (Toyoshima et al. 2000). In den Strukturdaten befinden sich außer den zwei Calciumionen noch ein Natriumion. So wie die genannten Ionen wurden auch die Wassermoleküle, die sich in der Kristallstruktur befanden, entfernt.

#### **Ca<sup>2+</sup>-ATPase (pdb-Datei: 2AGV)**

Kristallstruktur des Calcium-freien E2-Zustandes (Obara et al. 2005). Diese Struktur wurde mit den Inhibitoren BHQ (2,5-di-*tert*-butyl-1,4-dihydroxybenzol) und TG (Thapsigargin) mittels Röntgenstreuung bei einer Auflösung von 2,4 Å ermittelt. Da in der Kristallstrukturdatei zwei Ketten des Proteins vorliegen, wurde für die Berechnung nur die Kette A benutzt. Die vorhandenen Inhibitoren BHQ und TG wurden, wie auch das vorhandene Natriumion, aus der Strukturdatei gelöscht. Auch die 124 vorhandenen Wassermoleküle wurden entfernt.

#### **Ca<sup>2+</sup>-ATPase (pdb-Datei: 1T5S)**

Diese Kristallstruktur ist eine Analogstruktur zum E1-ATP·2Ca<sup>2+</sup>-Zustand (Sorensen et al. 2004). Die Struktur wurde mittels Röntgenstreuung bei einer Auflösung von 2,6 Å ermittelt. Der vorhandene Ligand AMPPCP (ein nicht hydrolysierbares ATP-Analog [Adenosin-5'-[Beta, Gamma-Methylen]Triphosphat]) wurde ebenso wie die Calciumionen, das Magnesiumion und das Kaliumion aus der pdb-Datei entfernt. Ebenso wurden auch hier die 40 vorhandenen Wassermoleküle entfernt.

Für die drei verwendeten Kristallstrukturen der Ca<sup>2+</sup>-ATPase wurde der Transmembranbereich mittels der Datenbank SCOP (*Structural Classification of Proteins*) bestimmt (Murzin et al. 1995). Dieser erstreckt sich über drei Teilbereiche der Polypeptidkette. Der erste Bereich reicht von der Aminosäure 48 bis zur Aminosäure 124, der zweite von der Aminosäure 240 bis zur Aminosäure 343 und der dritte von der Aminosäure 751 bis zur Aminosäure 994.

**Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (pdb-Datei: 3B8E)**

Die Kristallstruktur der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase gibt den E2-P-Zustand wieder (Morth et al. 2007). Die Struktur wurde mittels Röntgenstreuung mit einer Auflösung von 3,5 Å ermittelt. In dieser Struktur sind anstatt der Kaliumionen Rubidiumionen enthalten, da diese aufgrund ihrer Eigenschaften ebenfalls an die Kaliumbindestellen gebunden werden, sich aber bei Röntgenstreuung an Kristallen besser darstellen lassen. Des Weiteren ist noch ein Magnesiumion sowie MgF<sub>4</sub><sup>2+</sup> (Magnesiumtetrafluorid) und PC1 (1,2-Diacyl-sn-glycero-3-phosphocholin) enthalten. Diese wurden ebenso wie die Wassermoleküle, die sich in der Strukturdatei befinden, für die Rechnungen entfernt.

Auch der Transmembranbereich der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase wurde mittels der Datenbank SCOP (Murzin et al. 1995) bestimmt. Dieser erstreckt sich ebenfalls über drei Teilbereiche der Polypeptidkette. Der erste Bereich reicht von der Aminosäure 70 bis zur Aminosäure 150, der zweite von der Aminosäure 250 bis zur Aminosäure 360 und der dritte von der Aminosäure 740 bis zur Aminosäure 1014. Die Helices M1 - M10 und die dazugehörige *stalk*-Region S2 - S5 wurden mittels der Swiss-Prot Datenbank (Boeckmann et al. 2003) ermittelt.

## 4.5.2 Protonengegentransport in der $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase

In alle Strukturen wurden explizite Wassermoleküle mittels des Programm Dowser in die unterschiedlichen Enzymzustände der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase eingefügt (siehe Kapitel 5.2.1). Sowohl die vorhandenen Wassermoleküle aus der Strukturdatei als auch die von dem Programm Dowser eingefügten Wassermolekülen wurden nur im Transmembranbereich für die Elektrostatik-Rechnungen berücksichtigt. Die expliziten Wassermoleküle im cytoplasmatischen Bereich wurden entfernt.

Bei den Simulationen mit beibehaltenen Calciumionen wurden die Calciumliganden beim MC-Sampling festgesetzt, d.h. das Kristallrotamer (Rotamer, das durch die Kristallstruktur vorgegeben wird) ist fixiert. Allerdings wurde der Ionisierungszustand dieser Liganden freigelassen, sodass eine De- oder Protonierung möglich bleibt. Auch bei den Simulationen mit nur einem Calciumion wurden alle vier Liganden festgehalten.

Die für die Elektrostatik-Rechnungen verwendeten Strukturdaten zur Untersuchung des Protonengegentransports in der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase werden im Folgenden genauer beschrieben.

### E1-Zustand

#### **1SU4 :**

Kristallstruktur der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase mit zwei gebundenen Calciumionen (Toyoshima et al. 2000). Die Simulationen des Protonentransportweges an dieser Kristallstruktur erfolgten sowohl mit als auch ohne Calciumionen. Die in der Kristallstruktur enthaltenen 117 Wassermoleküle wurden für die verschiedenen Simulationen entweder vollständig entfernt oder teilweise beibehalten. Da beim Protonentransport nur der Transmembranbereich von Interesse ist, wurden auch nur die Wassermoleküle der Kristallstruktur in die Simulation einbezogen, die sich in diesem Bereich befinden.

### E1P-Zustand

#### **1T5T :**

Diese Kristallstruktur liegt als Analogstruktur zum E1P- $2\text{Ca}^{2+}$ -Zustand vor (Sorensen et al. 2004). Der vorhandene Ligand  $\text{AlF}_4$  (Tetrafluoroaluminat-Ion) und das ADP wurden aus der Struktur entfernt, so wie auch das Magnesium- und Kaliumion. Auch hier wurden die vorhandenen Wassermoleküle der Kristallstruktur entfernt und wie beim E1-Zustand wurden die Simulationen sowohl mit als auch ohne Calciumionen durchgeführt.



**2ZBD:**

Diese Kristallstruktur ist ebenfalls eine Analogstruktur zum E1P-2Ca<sup>2+</sup>-Zustand (Toyoshima et al. 2004). Der vorhandene Ligand AlF<sub>4</sub> und das ADP wurden auch hier aus der Struktur entfernt. Ebenso wie das Magnesium-, das Kaliumion und die vorhandenen Wassermoleküle. Wie auch bei dem E1-Zustand wurden die Simulationen sowohl mit als auch ohne Calciumionen durchgeführt. Die Struktur wurde ergänzend zu der vorhergehenden Struktur 1T5T ausgewählt, da diese eine bessere Auflösung (2,4 Å) besitzt.

**E2P-Zustand****1WPG:**

Diese Struktur ist eine Analogstruktur zum E2P-Zustand (Toyoshima et al. 2004). Die vorhandenen Liganden MgF<sub>4</sub><sup>2-</sup> (Magnesiumtetrafluorid), TG und ADP wurden für die Simulationen entfernt. Ebenso die vorhandenen Wassermoleküle. Es liegen vier Ketten der Struktur in der Strukturdatei vor. Von diesen wurde nur die Kette A für die Simulationen ausgewählt. Der Calciumkanal zum Lumen ist in dieser Struktur geschlossen.

**3B9B:**

Diese Struktur entspricht dem gleichen Zustand, in dem sich die vorstehende Struktur 1WPG befindet (Olesen et al. 2007). Allerdings ist in dieser Struktur der Calciumkanal zum Lumen hin geöffnet. Der in dieser Struktur vorhandene Ligand BeF<sub>3</sub> (Trifluoroberyllat), das Magnesium- und Natriumion wurden entfernt.

**E2-P-Zustand****1XP5:**

Diese Struktur entspricht dem E2-P-Zustandes (Olesen et al. 2004). Die Liganden AlF<sub>4</sub> und TG sowie das Kalium- und Magnesiumion wurden erneut aus der Strukturdatei entfernt.

**E2-Zustand****2AGV:**

Diese Struktur entspricht dem Calcium-freien E2-Zustand (Obara et al. 2005). Die Inhibitoren BHQ und TG wie auch das vorhandene Natriumion wurden für die Simulation entfernt. Weiterhin wurden die 124 vorhandenen Wassermoleküle entfernt. Da in dieser Strukturdatei zwei Ketten des Proteins vorliegen, wurde für die Berechnung nur die Kette A benutzt.

**MD-Schnappschuss der 2AGV-Struktur nach 25 ns:**

Des Weiteren wurde auch ein Schnappschuss aus den durchgeführten MD-Simulationen verwendet. Hierfür wurden Atomkoordinaten nach 25 Nanosekunden ausgewählt. Dieser Schnappschuss besitzt die größte konformelle Änderung zur Ausgangskonformation.

## 4.6 Simulationsparameter

### 4.6.1 Simulationsparameter für MCCE

Für die Rechnungen mit MCCE wurden folgende Parameter festgesetzt, die für alle Rechnungen gelten (siehe Anhang A):

- Dielektrische Konstante des Solvens :  $\epsilon_s = 80$
- Dielektrische Konstante des Proteins :  $\epsilon_p = 4$
- Radius der Testkugel : 1.4 Å
- Ionenradius : 2.0 Å
- Ionenkonzentration : 0,15 mol/Liter
- Gittergröße von DelPhi : 65

Mit der Testkugel wurde die solvenszugängliche Oberfläche (SAS) bestimmt. Dieser Wert von 1.4 Å entspricht ungefähr einer typischen Bindungslänge zwischen zwei Atomen und ist somit gut geeignet, den SAS-Wert zu bestimmen. Der Radius der umgebenden Gegenionen wurde mit 2.0 Å berücksichtigt.

Für die Erzeugung der Konformere wurden folgende Parameter gewählt:

Drei Rotamere für den Transmembranbereich (49 - 124 ; 240 - 343 ; 740 - 994) und für die eingefügten Wassermoleküle. Für den cytoplasmatischen Bereich der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase wurde nur ein Rotamer verwendet. Für Aminosäuren, die eine solvenszugängliche Oberfläche von mehr als 25 % besitzen, wurden keine Rotamere erzeugt.

#### **Programmversion :**

mcce 2.4 (Song et al. 2009) für die Elektrostatik-Rechnungen am Protonengegentransport in der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase.

mcce 1.0 (Alexov und Gunner 1997, Georgescu et al. 2002) für alle Elektrostatik-Rechnungen zum Energietransduktionsmechanismus in P-Typ-ATPasen.

## 4.6.2 Simulationsparameter für MD-Simulationen

### 4.6.2.1 Simulationsparameter für NAMD

Nachdem die verschiedenen Enzymzustände in eine POPC-(1-Palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylcholin)-Modellmembran, durch Überlagerung des Proteins mit der Modellmembran in VMD, eingefügt waren, wurde der dadurch entstehende Freiraum zwischen Protein und Membran mittels des Molekulardynamik-Pakets NAMD und dem CHARMM27-Kraftfeld geschlossen. Zur Anpassung der Membran an das Protein wurde die Laufzeit der MD-Simulationen auf drei Nanosekunden gesetzt.

Das Simulationssystem besteht aus der Modellmembran, die ein Ausmaß von ca. 50 Å x 50 Å hat und aus 128 einzelnen Lipiden besteht. Dieser Protein-Membran-Komplex wird von 35035 Wassermolekülen umgeben. Das ganze System wurde an ein Wärmebad von 310 K angekoppelt und die Integration alle zwei Femtosekunden durchgeführt.

### 4.6.2.2 Simulationsparameter für GROMACS

Für die Molekulardynamik-Simulationen wurden die Wassermoleküle der Kristallstruktur aus den verwendeten pdb-Dateien 1SU4 und 2AGV übernommen. Diese vorgegebenen Wassermoleküle wurden durch die 57804 Wassermoleküle, die durch die Solvatisierung des Protein-Membran-Komplexes hinzugefügt wurden, ergänzt. Die Inhibitoren TG und BHQ wurden aus der E2-Struktur der Ca<sup>2+</sup>-ATPase entfernt. Damit die gleiche Ionenkonzentration wie in den Elektrostatik-Rechnungen gegeben war, wurden 180 Natrium- und 158 Chloridionen dem Simulationssystem hinzugefügt und so eine Ionenstärke von 150 mM generiert.

Das gesamte Simulationssystem bestand aus fast 100.000 Atomen, deren Trajektorie mit dem Programm GROMACS 3.3.1 simuliert wurde (Berendsen et al. 1995, Lindahl et al. 2001). Die Simulationen erfolgten unter periodischen Randbedingungen und das System war an ein Wärmebad (310 K) angeschlossen. Das Protein, die DOPC (Dioleoyl-Phosphatidylcholin)-Modellmembran, die Wassermoleküle und die eingefügten Ionen waren separat mit einer Kopplungskonstante von 0,1 ps<sup>-1</sup> versehen. Für den Druck wurde eine semi-isotropische Kopplung mit einer coupling time von 1 ps verwendet. Die isotherme Kompressibilität wurde auf  $4,5 \cdot 10^{-5} \text{ bar}^{-1}$  gesetzt und die Integration in Schritten von zwei Femtosekunden durchgeführt. Die Behandlung der elektrostatischen Wechselwirkungen erfolgte nach der Particle-Mesh-Ewald-(PME)-Methode. Für die van-der-Waals-Wechselwirkungen wurde ein Abbruchkriterium von 1,0 nm ausgewählt.

Die Gesamtlaufzeit der MD-Simulationen betrug für jeden der zu simulierenden Enzymzustände 25 ns.

## 4.7 Hard- und Softwareressourcen

### Hardwareressourcen

Die Simulationen zur Energietransduktion in P-Typ-ATPasen wurden am „Center for Scientific Computing (CSC)“ an der Johann-Wolfgang-Goethe Universität durchgeführt.

Die elektrostatischen Rechnungen erfolgten auf dem „xeon“-Cluster, ausgestattet mit 70 Knoten mit Pentium IV Xeon, 2,4 GHz Prozessoren, 2 GByte RAM pro Knoten.

Die MD-Simulationen erfolgten auf dem „opteron“-cluster, ausgestattet mit 282 Knoten mit AMD Opteron, 1,8 GHz Prozessoren.

Die Simulationen des Protonentransports erfolgten auf einem CompactCluster Tyan PSC4000 (MEGWARE, Chemnitz), ausgestattet mit fünf Knoten mit je vier Intel Xeon Quad-Core 2,0 GHz Prozessoren und 8 GByte RAM pro Knoten.

### Softwareressourcen

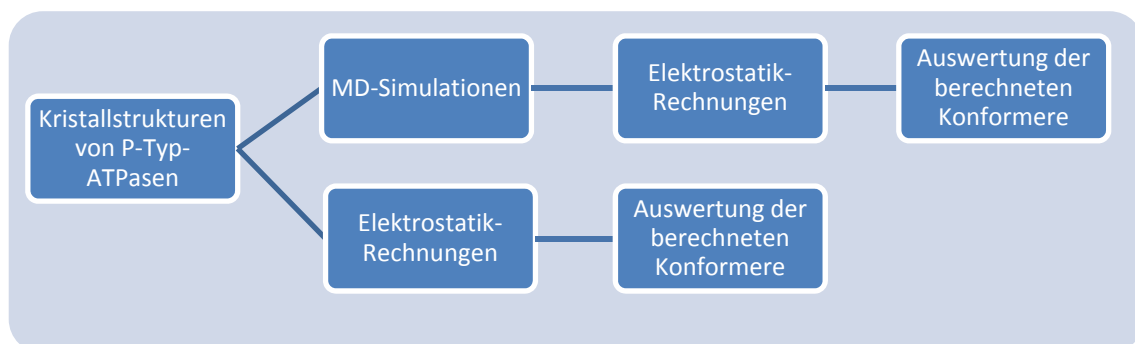
- **MCCE - Multiconformation continuum electrostatics** (Alexov und Gunner 1997, Georgescu et al. 2002, Song et al. 2009) <http://134.74.90.158/>
- **PyMol** Für die Erstellung von Abbildungen der Proteine in dieser Arbeit  
<http://www.pymol.org>
- **Swiss-pbd-viewer** (Guex und Peitsch 1997)  
<http://spdbv.vital-it.ch/>
- **VMD Visual Molecular Dynamics** (Humphrey et al. 1996)  
<http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>
- **NAMD** (Phillips et al. 2005)  
<http://www.ks.uiuc.edu/Research/namd/>
- **GROMACS - Groningen Machine for Chemical Simulations** (Berendsen et al. 1995, Lindahl et al. 2001) <http://www.gromacs.org/>
- **Dowser** (Zhang und Hermans 1996)  
<http://hekto.med.unc.edu:8080/HERMANS/software/DOWSER/Dowman.htm>

## 5 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

### 5.1 Energietransduktion in P-Typ-ATPasen

Bei der Energietransduktion in P-Typ-ATPasen muss die Energie, die an der Phosphorylierungsstelle bereitgestellt wird, zu den Ionenbindestellen transferiert werden. Ungeklärt ist bisher die Kommunikation der Phosphorylierungsstelle mit den ca. 50 Å entfernten Ionenbindestellen bzw. wie die Energie zwischen diesen beiden Stellen transferiert wird. Um diesen Mechanismus zu untersuchen, werden in der vorliegenden Arbeit die MCCE-Methode und Molekulardynamik(MD)-Simulationen eingesetzt (siehe Kapitel 4.3 und Kapitel 4.4). In Spannungsklemmen-Fluorometrie-Experimenten konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, den Start des Reaktionszyklus durch Anlegen eines elektrischen Feldes auszulösen, anstelle der physiologischen Bindung von ATP (Geibel et al. 2003). Ausgehend von diesen Experimenten wurde zur Simulation dieses elektrischen Feldes das Modell eines molekularen Kondensators entwickelt (siehe Kapitel 5.1.1). Der Einfluss dieses simulierten elektrischen Feldes auf die Transmembranhelices wurde mittels des MCCE-Programmes analysiert (siehe Kapitel 3.4). Um die Beteiligung der einzelnen Transmembranhelices M1 - M10 an der Energietransduktion zu verstehen, wurden die durch das elektrische Feld angeregten Konformeränderungen untersucht. Des Weiteren wurden die beiden verwendeten Simulationsmethoden (MCCE und MD-Simulation) kombiniert.

Der Ablauf der theoretischen Untersuchungen ist schematisch in Abb. 28 dargestellt.



**Abb. 28:** Schematische Darstellung der Untersuchung zur Energietransduktion in P-Typ-ATPasen.

Wie die Abb. 28 zeigt, wurden nicht nur Elektrostatik-Rechnungen an Kristallstrukturen der P-Typ-ATPasen, sondern auch MD-Simulationen an den P-Typ-ATPasen durchgeführt. Als Modellsystem der P-Typ-ATPasen wurde die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase und die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase ausgewählt. Zu diesen beiden biologischen Systemen liegen mehrere hochaufgelöste Kristallstrukturen vor. Sie lassen sich daher mittels computergestützter Methoden untersuchen (siehe Kapitel 4.5).

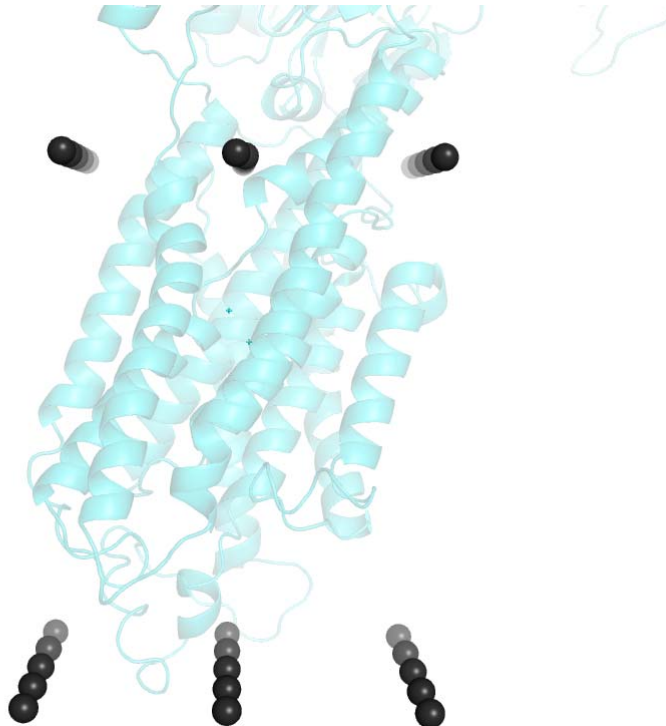
Der Einsatz von Elektrostatik-Rechnungen und MD-Simulationen erfolgte aber nicht nur separat, sondern beiden Methoden wurden miteinander kombiniert. Damit ist es möglich, trotz der festgelegten Ionisierungszustände während der MD-Simulationen, für jeden beliebig ausgewählten Zustand die Ionisierungen der titrierbaren Aminosäuren zu bestimmen.

Diese Arbeit beruht auf den Vorarbeiten, die in der Diplomarbeit "Elektrostatik-Rechnungen zur Untersuchung der Energietransduktion in ionentransportierenden Membranproteinen" (Weidemüller 2006) erbracht wurden. In dieser konnte an einigen Enzymzuständen der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase der geometrische Aufbau eines molekularen Kondensators und die anzulegende elektrische Feldstärke bestimmt werden.

In der vorliegenden Arbeit wird der Elektrostatik-Ansatz methodisch erweitert und in dieser erweiterten Form auf weitere biologische Systeme übertragen. Methodisch werden die Elektrostatik-Rechnungen um MD-Simulationen ergänzt. Mit der Kombination dieser beiden Methoden konnte die bisher erforderliche hohe elektrische Feldstärke reduziert, d.h. den physiologischen Werten angenähert werden.

### 5.1.1 Molekularer Kondensator

Das elektrische Feld, welches über den Transmembranbereich der P-Typ-ATPasen angelegt werden soll, wurde mittels einer Nachbildung eines Kondensators auf molekularer Ebene realisiert (Weidemüller und Hauser 2008). Zur Modellierung dieses molekularen Kondensators wurden Ionen oberhalb und unterhalb des Transmembranbereiches so eingefügt, dass annähernd zwei planare Platten mit homogener Ladungsverteilung entstehen, zwischen denen sich ein homogenes elektrisches Feld ausbildet (Abb. 29). Um diese Ionen in das Programm MCCE zu implementieren, wurden Parameterdaten (tpl-Dateien) erstellt. Die Stärke des elektrischen Feldes kann entweder durch die Anzahl der eingefügten Ionen oder durch den Abstand der Kondensatorplatten zueinander variiert werden. Eine detaillierte Beschreibung der Realisierung dieses molekularen Kondensators wird in der Diplomarbeit "Elektrostatik-Rechnungen zur Untersuchung der Energietransduktion in ionentransportierenden Membranproteinen" gegeben (Weidemüller 2006). In dieser Arbeit befinden sich ausführliche Angaben zur Wahl der Stärke des anzulegenden elektrischen Feldes und zur Geometrie der Kondensatorplatten. Auf die Einzelheiten dieser Untersuchungen soll hier nicht näher eingegangen werden.



**Abb. 29:** Realisierung eines molekularen Kondensators durch Einfügen von Ionen (schwarz) oberhalb und unterhalb des Transmembranbereiches des Proteins (hellblau). Das Protein selbst wird nicht von den Ionen geschnitten.

Für die vorliegende Arbeit wurde die Geometrie und die elektrische Feldstärke eines molekularen Kondensators aus der vorstehend genannten Diplomarbeit übernommen. In dieser wurde



festgestellt, dass in Simulationen die elektrische Feldstärke auf  $E \approx 2.4 \cdot 10^{11} \frac{\text{V}}{\text{m}}$  erhöht werden muss, um Ionisierungs- oder Rotameränderungen der Aminosäuren der Transmembranhelices M1 - M10 zu beobachten. Auch andere Studien an Protein-Membran-Komplexen *in silico* bestätigen die Beobachtung, dass in Simulationen die elektrische Feldstärke auf etwa das 10- bis 100-fache gegenüber den physiologischen Feldern erhöht werden muss (Wells et al. 2007, Roux 2008). Aus diesem Grund konnte für die Simulationen nicht dieselbe elektrische Feldstärke verwendet werden, die bei Spannungsklemmen-Fluorometrie-Versuchen angelegt wurde bzw. die unter physiologischen Bedingungen an Membranen herrscht ( $E \approx 4.0 \cdot 10^7 \frac{\text{V}}{\text{m}}$ ). Bei der Bewertung dieser unterschiedlichen Feldstärken ist zu beachten, dass die physiologischen Felder nicht homogen über die Membran verteilt sind, sondern lokal stark variieren können (Clarke 2001, Roux 2008). Des Weiteren ist zu beachten, dass in den Elektrostatik-Rechnungen das Rückgrat der Aminosäuren rigide behandelt wird und somit nur flexible Seitenketten berücksichtigt werden können. Dadurch sind die potentiell beobachtbaren Einflüsse des elektrischen Feldes auf die Transmembranhelices, auf Positionsänderungen (Rotameränderungen) und auf den Ionisierungszustand der Seitenketten beschränkt. Dies rechtfertigt die deutliche Anhebung der elektrischen Feldstärke in den Elektrostatik-Rechnungen.

### 5.1.2 Auswertung der Elektrostatik-Rechnungen

Um die an der Energietransduktion beteiligten Helices zu ermitteln, wurde ein Auswertungsverfahren entwickelt, das den Einfluss eines angelegten elektrischen Feldes auf die Transmembranhelices ermitteln kann. Dazu wurde wie folgt vorgegangen:

1. Einfügen eines molekularen Kondensators in das Simulationssystem
2. Anlegen eines homogenen elektrischen Feldes über den Transmembranbereich des zu untersuchenden Proteins
3. Ermittlung des meistbesetzten Konformers für jede Aminosäure mit angelegtem elektrischen Feld und ohne elektrisches Feld
4. Vergleich der Konformerbesetzung mit und ohne Feld
5. Bestimmung der Anzahl von Konformeränderungen zwischen dem ungeladenen und dem geladenen Zustand pro Transmembranhelix

Als erstes wurde ein molekularer Kondensator in das Simulationssystem eingebracht, um mit diesem ein homogenes elektrisches Feld über den Transmembranbereich simulieren zu können (siehe Kapitel 5.1.1). Um den Einfluss dieses elektrischen Feldes auf die Transmembranhelices zu untersuchen, wurden Elektrostatik-Rechnungen für zwei Simulationszustände des Systems durchgeführt:

1. Zustand: Einfügen von Atomen ohne Ladung (ungeladener Kondensator)
2. Zustand: Einfügen von Ionen (geladener Kondensator)

Aus den Elektrostatik-Rechnungen beider Zustände ergibt sich das meistbesetzte Konformer für jede Aminosäure, sowohl für den ungeladenen als auch für den geladenen Zustand des Kondensators. Dieses meistbesetzte Konformer wurde mittels eines selbst geschriebenen Skriptes ermittelt, extrahiert und für beide Simulationszustände miteinander verglichen. Der Vergleich der Konformerbesetzung des einen Simulationszustandes mit dem anderen ermöglicht es, die Zahl der Änderungen pro Transmembranhelix, die auf das elektrische Feld zurückzuführen sind, zu bestimmen. Der Vorteil dieses Auswertungsverfahrens ist, dass nur die vom elektrischen Feld bewirkten Änderungen erfasst werden. Änderungen, die auf das Einfügen der Ionen zurückzuführen sind, werden durch diesen Vergleich eliminiert. Die durch das elektrische Feld induzierten Konformeränderungen wurden für die Transmembranhelices M1 - M10 und für den *stalk*-Bereich S2 - S5 ausgewertet.

Die so ermittelten Konformeränderungen lassen sich zusätzlich in drei verschiedene Gruppen einteilen:

1. Ionisierungsänderung
2. Rotameränderungen (Änderung der Konformation)
3. Geringe Konformationsänderungen (Bindungswinkel, die im Vergleich zur Ausgangsstruktur um weniger als  $5^\circ$  verändert sind)

Der Vorteil dieser Differenzierung von Konformeränderungen ist die Möglichkeit, kleine konformelle Änderungen getrennt von den Rotamerwechseln darzustellen. Diese kleinen Änderungen werden bei der Ermittlung der Konformeränderungen ebenfalls erfasst, wenn auch nicht davon ausgegangen werden kann, dass diese Änderungen von Bedeutung für die Energietransduktion sind. Die Differenzierung erlaubt es, diese nicht signifikanten Rotameränderungen von der Auswertung der Ergebnisse auszuschließen.

Alle folgenden Tabellen beziehen sich auf den Vergleich der Konformere, die sich aus der Simulation des geladenen und des ungeladenen Kondensators ergeben. Dabei stehen die Werte in den Tabellen für die Anzahl der Konformere, die sich aufgrund des angelegten elektrischen Feldes ändern. Für einige Simulationen sind die Änderungen auch in Prozent, bezogen auf die Anzahl der Residuen pro Transmembranhelix, angegeben. Dies dient zur besseren Vergleichbarkeit der unterschiedlich langen Transmembranhelices.

### 5.1.3 Zusammensetzung der Transmembranhelices der Ca<sup>2+</sup>-ATPase

Die Ca<sup>2+</sup>-ATPase besteht aus 994 Aminosäuren, von denen 229 (ca. 23 % aller Aminosäuren) geladen sind. Zu diesen geladenen Aminosäuren gehören Lysin (Lys) und Arginin (Arg) (beide positiv geladen) sowie die Glutaminsäure (Glu) und die Asparaginsäure (Asp) (beide negativ geladen). Die Aminosäure Histidin (His) wird nicht betrachtet, da diese bei einem pH-Wert von 7 neutral vorliegt. Bei der Berechnung der Gesamtladung, wird davon ausgegangen, dass die pK-Werte der geladenen Aminosäuren nicht verschoben sind. Insgesamt überwiegen die negativen Ladungen geringfügig, sodass die Gesamtladung der Ca<sup>2+</sup>-ATPase Q = -27 ist. 157 Ladungen (69 % der gesamten Ladungen) der Ca<sup>2+</sup>-ATPase befinden sich allerdings an der Oberfläche des cytoplasmatischen Bereiches und nicht im Transmembranbereich bzw. auf den Transmembranhelices.

Die Transmembranhelices M1 - M10 setzen sich, wie in Tabelle 5 beschrieben, zusammen. Der *stalk*-Bereich wird mit S2 - S5 bezeichnet und verbindet die Transmembranhelices M2 - M5 mit dem cytoplasmatischen Kopfbereich. Dieser *stalk*-Bereich besteht aus zwei kürzeren Verbindungen S2 und S3, die aus zwölf bzw. sechs Residuen bestehen, und zwei längeren Verbindungen S4 und S5. Diese bestehen aus 21 bzw. 18 Residuen (Tabelle 5).

Helix	Anzahl der Residuen	Anzahl der geladenen Aminosäuren	Residuennummer
M1	21	5	49 - 69
M2 [+S2]	21 [33]	3+3	90 - 110 [90 - 122]
M3 [+S3]	20 [26]	4+1	254 - 273 [248 - 273]
M4 [+S4]	18 [39]	2+3	296 - 313 [290 - 328]
M5 [+S5]	20 [38]	3+3	758 - 777 [740 - 777]
M6	21	1	788 - 808
M7	23	1	829 - 851
M8	20	1	898 - 917
M9	19	0	931 - 949
M10	21	4	965 - 985

**Tabelle 5:** Zusammensetzung der Transmembranhelices der Ca<sup>2+</sup>-ATPase.

### 5.1.4 Zusammensetzung der Transmembranhelices der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase

Die α-Untereinheit der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase besteht insgesamt aus 1016 Aminosäuren. Davon sind 215 geladen. Dies entspricht einem Anteil von ca. 21 % aller Aminosäuren und ist vergleichbar mit dem Anteil der geladenen Aminosäuren in der Ca<sup>2+</sup>-ATPase. Ebenso wie bei der Ca<sup>2+</sup>-ATPase überwiegen die negativ geladenen Aminosäuren leicht, sodass eine Gesamtladung von Q= -25 vorliegt. Bei der Berechnung der Gesamtladung, wird davon ausgegangen, dass die pK-Werte der geladenen Aminosäuren nicht verschoben sind.

Helix	Anzahl der Residuen	Anzahl der geladenen Aminosäuren	Residuenummer
M1	21	1	86 - 106
M2 [+S2]	21 [33]	3+1	130 - 150 [118 - 150]
M3 [+S3]	20 [26]	0+1	287 - 306 [281 - 306]
M4 [+S4]	18 [39]	1+3	319 - 336 [319 - 357]
M5 [+S5]	20 [38]	1+6	771 - 790 [753 - 790]
M6	21	4	801 - 821
M7	23	0	842 - 864
M8	20	4	917 - 936
M9	19	2	950 - 968
M10	21	6	984 - 1004

**Tabelle 6:** Zusammensetzung des Transmembranbereiches der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase.

Vergleicht man den Aufbau und die Zusammensetzung der Transmembranhelices der Ca<sup>2+</sup>-ATPase mit denen der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, so ist erkennbar, dass die Anzahl der Aminosäuren der einzelnen Transmembranhelices M1 - M10 identisch ist (Tabelle 6). Allerdings besteht ein deutlicher Unterschied in der Anzahl der Ladungen pro Transmembranhelix. Liegen bei der Ca<sup>2+</sup>-ATPase auf den Helices M1 - M5 mit den *stalk*-Bereichen S2 - S5 jeweils fünf bis sechs geladene Aminosäuren vor, so sind diese in der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase deutlich diverser verteilt. Die Anzahl der Ladungen in den *stalk*-Bereichen reicht von einer geladenen Aminosäure auf der Transmembranhelix M3+S3 bis zu sieben geladenen Aminosäuren auf der Transmembranhelix M5+S5. Auf den Helices M2+S2 und M4+S4 befinden sich vier geladene Aminosäuren sowie auch auf den Helices M6 und M8. Wie in Kapitel 5.1.7 ausführlich dargestellt wird, deutet die Verteilung der geladenen Aminosäuren auf eine funktionell wichtige Eigenschaft einiger spezifischer Transmembranhelices für die Energietransduktion hin.

### 5.1.5 Berechnung des SAS-Wertes der Transmembranhelices M1 - M10

Um den Einfluss der solvenszugänglichen Oberfläche (SAS - *Solvent Accessible Surface*) auf die berechneten Konformeränderungen zu bestimmen, wurde der SAS-Wert für jede einzelne Transmembranhelices M1 - M10 berechnet.

Helices	M1	M2	M2+S2	M3	M3+S3	M4	M4+S4	M5	M5+S5	M6	M7	M8	M9	M10
SAS	12,3	12,2	26,2	9,8	19,6	6,2	17,2	5,6	8,5	3,6	5,1	4,7	4,7	9,6

**Tabelle 7:** Berechnete SAS-Werte in Å<sup>2</sup> der Transmembranhelices M1 - M10.

Diese Werte erlauben es, den Einfluss der wässrigen Umgebung auf die Elektrostatik-Wechselwirkungen der Transmembranhelices M1 - M10 mit dem Solvens (einem stark polaren Medium) zu untersuchen. Ebenso wurden die SAS-Werte für den *stalk*-Bereich S2 - S5 zusammen mit dem Transmembranhelices M1 - M10 ausgewertet. Für die Helix M2+S2 ist im Vergleich zu den anderen Transmembranhelices die solvenszugängliche Oberfläche am größten. Die Helix M5+S5 besitzt zwar einen höheren SAS-Wert als die Transmembranhelix M1, dieser ist aber geringer, wenn man den SAS-Wert pro Residuum berechnet. Insbesondere ist der SAS-Wert für den Transmembranbereich der Helix M5 nur halb so groß wie der für die Helix M1. Dieses Ergebnis entspricht den Erwartungen, denn die Helix M5 liegt tief im Inneren des Proteins, wohingegen die Helix M1 an der Oberfläche des Proteins lokalisiert ist. Die Tabelle 7 zeigt, dass die *stalk*-Bereiche wasserzugänglicher sind als die Transmembranhelices und sich somit der SAS-Wert der jeweiligen Helix verdoppelt bzw. bei der Helix M5+S5 sogar fast verdreifacht.

### 5.1.6 MCCE-Simulationen an der Ca<sup>2+</sup>-ATPase

Während des Übergangs der Ca<sup>2+</sup>-ATPase aus dem E1-Zustand in den E2-Zustand unterliegt der cytoplasmatische Kopfteil einer ausgeprägten konformellen Änderung. Während dieser Änderung ereignet sich auch die zu untersuchende Energietransduktion. Diese experimentell beobachtete konformelle Veränderung der Ca<sup>2+</sup>-ATPase kann in den verwendeten Elektrostatik-Rechnungen nicht vollständig reproduziert werden. Um trotzdem die konformellen Änderungen berücksichtigen zu können, wurden verschiedene Zustände der Ca<sup>2+</sup>-ATPase (siehe Kapitel 4.5) berücksichtigt. Für diese wurde der Einfluss eines elektrischen Feldes auf die Transmembranhelices M1 - M10 und des dazugehörenden *stalk*-Bereichs untersucht. Die Einbeziehung des *stalk*-Bereichs der Ca<sup>2+</sup>-ATPase erfolgt aufgrund von Ergebnissen aus Experimenten, nach denen dieser Bereich eine wichtige Funktion bei der Energietransduktion ausübt. Für diese Annahme spricht insbesondere die Lage dieses Bereiches als Verbindung der Phosphorylierungsstelle mit den Calciumbindestellen der Ca<sup>2+</sup>-ATPase.

Die für die Elektrostatik-Rechnungen verwendeten Kristallstrukturdaten entsprechen drei verschiedenen Enzymzuständen:

1. E1-Zustand (Calcium-gebundener Zustand: pdb-Datei 1SU4)
2. E1-ATP·2Ca<sup>2+</sup>-Zustand (Calcium- und ATP-gebundener Zustand: pdb-Datei 1T5S)
3. E2-Zustand (Calcium-freier Zustand: pdb-Datei 2AGV)

Diese drei Zustände decken einen Großteil der verschiedenen Konformationen der Ca<sup>2+</sup>-ATPase während des Reaktionszyklus ab (siehe Kapitel 3.3).

Zustand	M1	M2+S2	M3+S3	M4+S4	M5+S5	M6	M7	M8	M9	M10
Anzahl der Residuen	21	33	26	39	39	21	23	20	19	21
E1	4	9	9	9	13	2	5	5	2	6
E1-ATP	6	8	6	11	15	3	6	4	4	2
E2	7	9	9	12	19	3	5	3	4	6

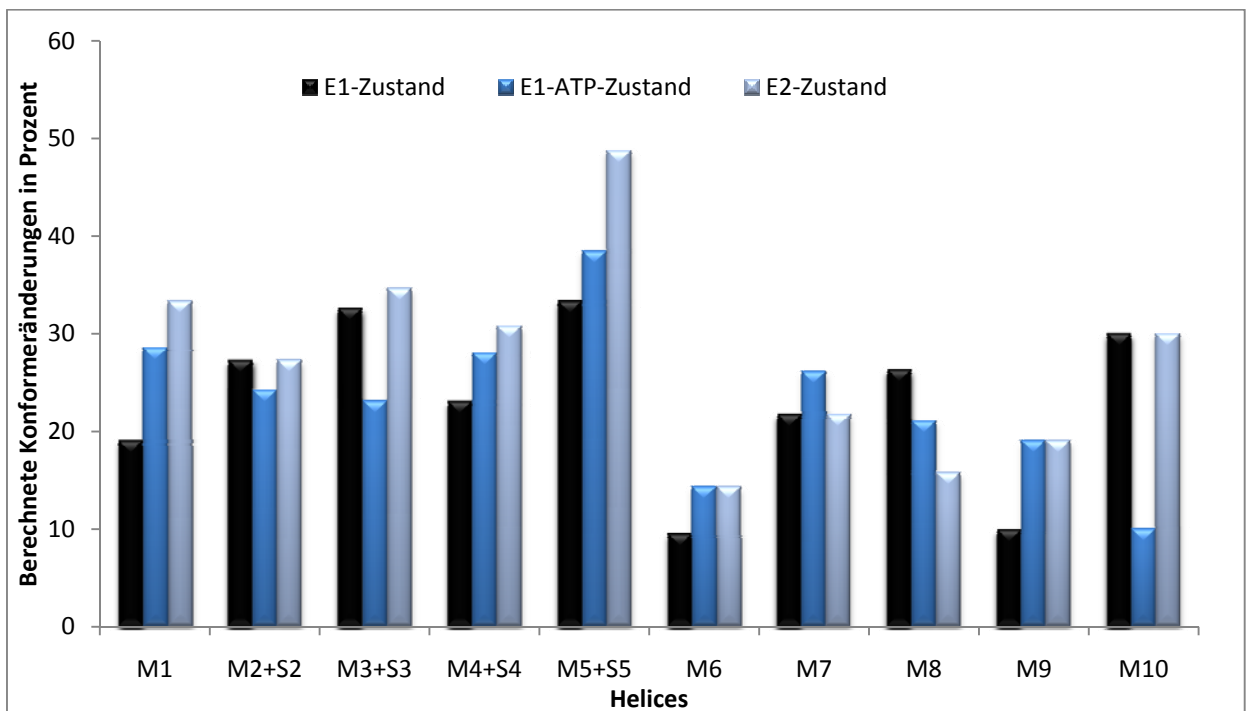
**Tabelle 8:** Anzahl der berechneten Konformeränderungen für verschiedene Enzymzustände der Ca<sup>2+</sup>-ATPase. Die Konformeränderungen wurden für die Transmembranhelices M1 - M10 inklusive des *stalk*-Bereichs S2+S5 ausgewertet. Die Simulationen wurden am Calcium-gebundenen Zustand E1, am phosphorylierten Zustand E1-ATP und am Calcium-freien Zustand E2 durchgeführt.

Wie die Tabelle 8 zeigt, sind vor allem die Helices mit *stalk* (M2+S2 bis M5+S5) wichtig für die Energietransduktion. Über 30 % der berechneten Konformere unterliegen dieser Veränderung.

Vergleichbar damit sind die Helices M1 und M10, die ebenfalls Konformeränderungen von ca. 30 % aufweisen. Im Gegensatz zu den Helices M2 - M5 und dem dazugehörigen *stalk*-Bereich, weisen die Helices M1 und M10 eine wesentlich größere solvenszugängliche Oberfläche auf. Eine solche hat aber für diese Transmembranhelices zur Folge, dass sie eine größere Wechselwirkung mit dem umgebenden Solvens eingehen und somit die Änderungen nicht alleine dem elektrischen Feld zugeschrieben werden können.

Die Transmembranhelices, die mit dem cytoplasmatischen Bereich direkt verbunden sind, zeigen eine stärkere Reaktion auf das Anlegen eines elektrischen Feldes. Speziell für die Helix M5+S5 zeigt sich, dass diese die meisten Konformeränderungen aufweist.

Vergleicht man die Konformeränderungen der Transmembranhelices nicht nur untereinander, sondern bezieht auch die Konformeränderungen in den verschiedenen Enzymzuständen mit in den Vergleich ein, so zeigen sich einige Unterschiede bei der Anzahl der Konformeränderungen während des Reaktionszyklus (Abb. 30).



**Abb. 30:** Konformeränderungen der Transmembranhelices M1 - M10 für verschiedene Enzymzustände. Die berechneten Konformeränderungen sind in Prozent, bezogen auf die Anzahl der Aminosäuren der jeweiligen Helix, angegeben.

Dies trifft vor allem auf die Helices M1, M3+S3, M5+S5, M8 und M10 zu. Ein Vergleich der Anzahl der Konformeränderungen zwischen allen Enzymzuständen zeigt allerdings auch, dass es zwar Verschiebungen bei den Konformeränderungen gibt, dass aber nur ein geringer Unterschied bei der relativen Verteilung besteht. So ist in allen Enzymzuständen die Helix M5+S5, die Helix mit den



meisten Änderungen, auch wenn sich die Konformeränderungen für die drei verschiedenen Enzymzustände von 30 % für den E1-Zustand bis hin zu fast 50 % für den E2-Zustand erstrecken. Es lassen sich noch weitere Transmembranhelices identifizieren, auf denen sich die Anzahl der Konformeränderungen während des Reaktionszyklus in den verschiedenen Enzymzuständen ändert. Dies betrifft vor allem die Helices M1, M3, M4+S4, M8 und M10. Im Vergleich zur Helix M5+S5 zeigen die Helices M3 und M4+S4 aber eine viel geringere Variation in der Anzahl der Konformeränderungen. Betrachtet man dagegen die Helix M2+S2, M6 oder die Helix M7, so verändern diese nur minimal die Anzahl der Konformeränderungen. Die Helices M1 und M10 weisen zwar auch einen größeren Unterschied der Konformeränderungen zwischen den einzelnen Enzymzuständen auf, dies lässt sich aber durch die großen SAS-Werte erklären, die diese beiden Helices aufweisen (siehe Kapitel 5.1.5). Die Helix M8 ist die einzige Helix, die im E2-Zustand weniger Konformeränderungen aufweist als im E1-Zustand. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Helix M8 auch an der Energietransduktion beteiligt ist, ihr Einfluss im E1-Zustand aber größer ist als im E2-Zustand.

Um den Einfluss des elektrischen Feldes auf die Transmembranhelices in den Simulationen spezifizieren zu können, wurden die Konformeränderungen unterteilt in Rotameränderungen (Änderungen der Position) und Ionisierungsänderungen (Tabelle 9 und Abb. 31). Rotamere, die von der Ausgangsstruktur nur gering abweichen, wurden für die Auswertung ausgeschlossen (siehe Kapitel 5.1.2).

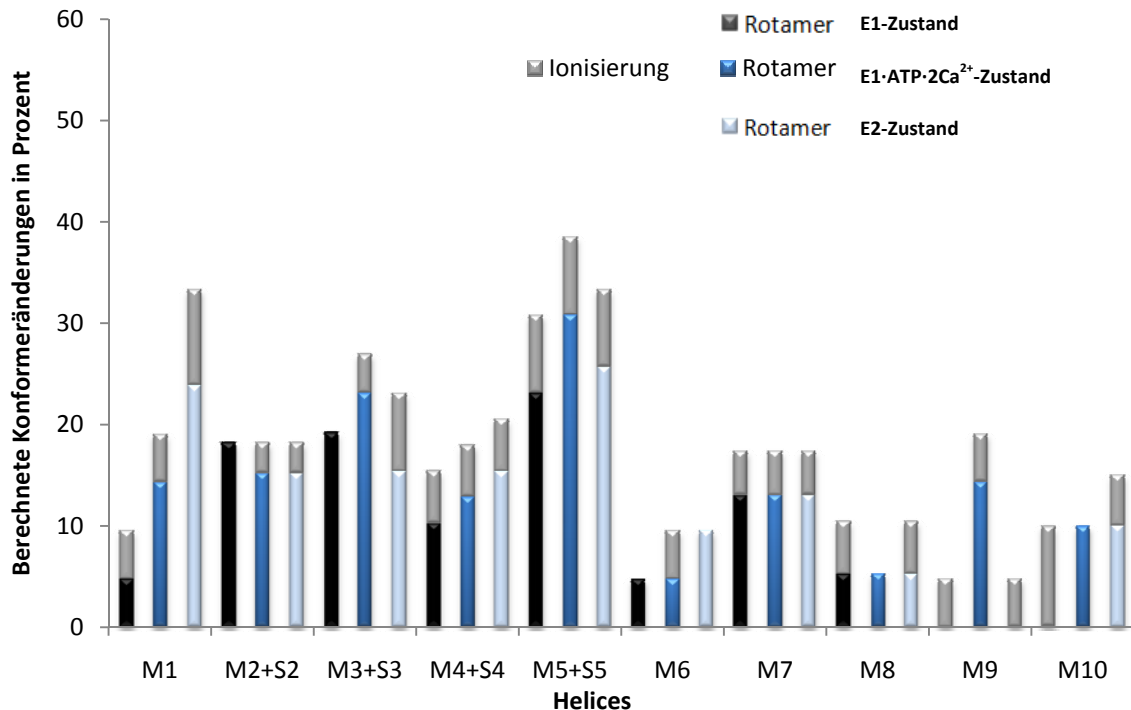
Helix	M1			M2+S2			M3+S3			M4+S4		
Zustand	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Rotamer [%]	1	3	5	6	5	5	5	6	4	4	5	6
Ionisierung [%]	1	1	2	0	1	1	0	1	2	2	2	2

Helix	M5+S5			M6			M7			M8			M9			M10		
Zustand	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Rotamer [%]	9	12	10	1	1	2	3	3	3	1	1	1	0	3	0	0	2	2
Ionisierung [%]	3	3	3	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	2	0	1

**Tabelle 9:** Aufteilung der Konformeränderungen in Rotameränderungen und Ionisierungsänderungen für die unterschiedlichen Enzymzustände der Ca<sup>2+</sup>-ATPase. **(1)** E1-Zustand, **(2)** E1·ATP·2Ca<sup>2+</sup>-Zustand und **(3)** E2-Zustand.

Die obige Auswertung der Konformeränderungen soll Aufschluss über den Mechanismus geben, der für die Energietransduktion in P-Typ-ATPasen verantwortlich ist. Bisher wird vermutet, dass es sich bei der Energietransduktion in P-Typ-ATPasen um einen rein mechanistischen Vorgang handelt, bei dem die Energie durch die konformellen Änderungen während des Übergangs aus dem E1- in den E2-Zustand transferiert wird. Spekuliert wird aber auch, dass für die Energietransduktion die

Ionisierungsänderungen der einzelnen Transmembranhelices verantwortlich sein könnten. Auch die Möglichkeit, dass es sich um eine Kombination beider Mechanismen handelt, ist nicht auszuschließen.



**Abb. 31:** Die Konformeränderungen jeder Transmembranhelix setzen sich zusammen aus den Rotameränderungen und den Ionisierungsänderungen (Angabe in Prozent). Für die jeweiligen Enzymzustände der Ca<sup>2+</sup>-ATPase sind die Rotameränderungen im E1-Zustand (schwarz), im E1-ATP·2Ca<sup>2+</sup>-Zustand (blau) und im E2-Zustand (hellblau) markiert. Die Ionisierungsänderungen sind zur Unterscheidung von den Rotameränderungen für alle Enzymzustände grau markiert.

Die Anzahl der signifikanten Rotameränderungen auf den Helices M3+S3 und M4+S4 (vier bis sechs signifikante Rotameränderungen) ist nur halb so groß wie die auf der Helix M5+S5 (neun bis zwölf signifikante Rotameränderungen) (Tabelle 9). Des Weiteren befinden sich die Rotameränderungen der Helix M3+S3 und M4+S4 hauptsächlich an den Enden der Transmembranhelices. Auf der Helix M5+S5 sind diese Änderungen dagegen über die ganze Transmembranhelix verteilt. Die Helix M2+S2 zeigt inklusive der *stalk*-Region fünf bis sechs signifikante Änderungen. Vergleicht man die Anzahl der ionisierbaren Residuen auf der Helix M2+S2 mit den anderen Transmembranhelices, so zeigt sich, dass die Helix M2+S2 die meisten ionisierbaren Aminosäuren aufweist, von denen sich drei im Transmembran- und vier im *stalk*-Bereich der Helix befinden. Unter der Einwirkung eines elektrischen Feldes liegen von den sieben möglichen ionisierbaren Aminosäuren auf der Helix M2+S2 auch sechs ionisiert vor. Ohne ein elektrisches Feld sind es noch fünf. Dies deutet darauf hin, dass auf der Helix M2+S2 die Ionisierungen nicht wesentlich durch das elektrische Feld hervorgerufen werden. Es kann angenommen werden, dass diese Transmembranhelix auch ohne die Einwirkung

eines elektrischen Feldes viele Ionisierungen aufweist, dass diese aber keine funktionelle Bedeutung für die Energietransduktion übernehmen.

Betrachtet man die Ladungsverteilung auf den Helices M1 - M10, so kann man davon ausgehen, dass eine Konformationsänderung aufgrund des angelegten Feldes nicht ausschließlich auf Wechselwirkungen der geladenen Residuen mit dem elektrischen Feld beruhen kann. Begründen lässt sich dies zum einen mit der insgesamt geringen Anzahl von geladenen Aminosäuren im Transmembranbereich und speziell auf den Transmembranhelices, zum anderen finden nicht nur Wechselwirkungen zwischen dem elektrischen Feld und geladenen Aminosäuren statt, sondern ebenso mit Transmembranhelices, die nur sehr wenige geladene Aminosäuren besitzen, wie z.B. die Helix M7.

Diese Vermutung lässt Rückschlüsse auf eine funktionelle Rolle der Helix M5+S5 bei der Energietransduktion zu, da die Reaktion dieser Helix auf ein elektrisches Feld stark ausgeprägt ist und in den verschiedenen Enzymzuständen variiert. Die Helices M3+S3, M4+S4, M8 und M9 zeigen zwar ebenfalls unterschiedlich viele Konformeränderungen, im Vergleich zur Helix M5+S5 sind diese jedoch für die Helices M3+S3, M4+S4 und M8 nicht so stark ausgeprägt. Die Transmembranhelices M1 und M10 weisen zwar auch einen starken Wechsel der Konformeränderungen zwischen den Enzymzuständen auf, im Vergleich zu den anderen sich ändernden Transmembranhelices besitzen diese beiden Helices aber eine wesentlich größere solvenszugängliche Oberfläche (SAS-Wert). Dadurch können Wechselwirkungen mit der Umgebung entstehen, die die Konformeränderungen beeinflussen. Die Helices M2+S2, M6, M7 und M9 zeigen keine bzw. nur minimale Variationen der Konformeränderungen zwischen den einzelnen Enzymzuständen. Auch wenn das Rückgrat in den Simulationen als starr angenommen wird, deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass bestimmte Transmembranhelices eine größere Polarisierbarkeit besitzen als die anderen Helices.

Insgesamt konnte aber eindeutig gezeigt werden, dass die meisten Konformeränderungen aufgrund eines angelegten elektrischen Feldes auf der Helix M5+S5 vorliegen. Somit übernimmt die Helix M5+S5 nicht nur im E1-Zustand eine entscheidende Funktion während der Energietransduktion, sondern auch in den beiden anderen simulierten Zuständen E1-ATP-2Ca<sup>2+</sup> und E2.

### 5.1.7 MCCE-Simulationen an der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase

Gegenstand der Spannungsklemmen-Fluorometrie-Experimente von Geibel et al., auf denen die theoretischen Arbeiten zur Energietransduktion beruhen, ist die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (Geibel et al. 2003). Im Gegensatz zur Ca<sup>2+</sup>-ATPase liegen für die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase erst seit 2008 hochaufgelöste Strukturen vor (Tabelle 4). Um den Mechanismus der Energietransduktion in P-Typ-ATPasen besser verstehen zu können, wurden die Elektrostatik-Rechnungen auf dieses Protein ausgeweitet. Die daraus resultierenden Ergebnisse bieten die Möglichkeit, die Genauigkeit der erhaltenen Simulationsergebnisse mit den experimentellen Daten zu vergleichen. Bevor die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase als hochaufgelöste Struktur vorlag, wurden im Rahmen dieser Arbeit bereits Rechnungen an Strukturmodellen der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase durchgeführt (Weidemüller und Hauser 2008). Diese basierten auf Daten zweier verschiedener Strukturen der Ca<sup>2+</sup>-ATPase. Dazu wurden die Enzymzustände E1 und E1P (pdb-Dateien: 1SU4 und 1WPG) ausgewählt. Zur Generierung der Strukturmodelle wurden die Programme ModWeb (Pieper et al. 2009) und 3D-Jigsaw (Bates et al. 2001) verwendet. Die Simulationen wurden an drei verschiedenen Modellen durchgeführt, die auf den folgenden Sequenzen der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase beruhen:

1. *Ovis aries* (Schaf/Swiss-prot Eintrag: P04074) (Shull et al. 1985)
2. *Rattus norvegicus* (Ratte/Swiss-prot Eintrag: Q64541) (Shamraj und Lingrel 1994)
3. *Torpedo californica* (Zitterrochen/Swiss-prot Eintrag: P05025) (Kawakami et al. 1985)

Die Auswahl der ersten Sequenz erfolgte aufgrund der durchgeführten Spannungsklemmen-Fluorometrie-Experimenten an dieser Spezies. Die Auswahl der zweiten Sequenz war motiviert durch weitere Experimente an der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (Koenderink et al. 2003). Die dritte Sequenz wurde ausgewählt, da diese eine möglichst große Diversität zu den beiden anderen Sequenzen aufweist. Diese Diversität wurde durch ein lineares Alignment mittels BLAST (Chenna et al. 2003) bestimmt.

Für die Simulationen an den Strukturmodellen der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase wurde das Simulationssystem der Ca<sup>2+</sup>-ATPase auf die Strukturmodelle der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase übertragen (Abb. 32). Die Ergebnisse der Elektrostatik-Rechnungen an den Strukturmodellen der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase sind in der Tabelle 10 und in der Tabelle 11 zusammengefasst.

Modell	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10
Anzahl der Residuen	21	21	20	18	20	21	23	20	19	21
P04074	5	4	2	0	8	7	6	4	4	5
Q64541	6	2	4	1	9	5	5	6	5	3
P05025	4	0	4	2	6	4	6	5	4	4

**Tabelle 10:** Konformeränderungen für verschiedene Strukturmodelle der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. Die Konformeränderungen wurden für die Transmembranhelices M1 - M10 ausgewertet. Die Elektrostatik-Rechnungen wurden an den folgenden Strukturmodellen durchgeführt. **P04074:** Basierend auf der Aminosäuresequenz der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase des Schafes. **Q64541:** Basierend auf der Aminosäuresequenz der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase der Ratte. **P05025:** Basierend auf der Aminosäuresequenz der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase des Zitterrochens.

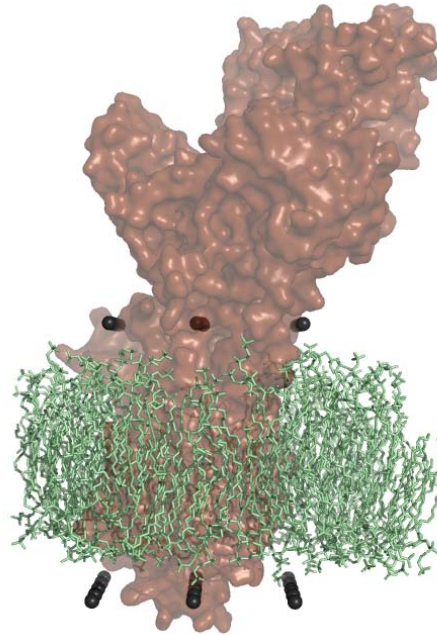
Modell	M1	M2+S2	M3+S3	M4+S4	M5+S5	M6	M7	M8	M9	M10
Anzahl der Residuen	21	33	26	39	39	21	23	20	19	21
P04074	5	6	3	2	17	7	6	4	4	5
Q64541	6	4	6	5	18	5	5	6	5	3
P05025	4	1	5	13	15	4	6	5	4	4

**Tabelle 11:** Konformeränderungen für verschiedene Strukturmodelle der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase inklusive *stalk*-Bereich S2 - S5. Die Elektrostatik-Rechnungen wurden an den folgenden Strukturmodellen durchgeführt. **P04074:** Basierend auf der Aminosäuresequenz der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase des Schafes. **Q64541:** Basierend auf der Aminosäuresequenz der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase der Ratte. **P05025:** Basierend auf der Aminosäuresequenz der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase des Zitterrochens.

Bei allen untersuchten Modellen der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase liegen die meisten Konformeränderungen eindeutig auf der Helix M5 vor. Insbesondere dann, wenn der *stalk*-Bereich in die Auswertung einbezogen wird, zeigt sich ein deutlich stärkeres Auftreten der Konformeränderungen auf der Helix M5+S5. Eine genauere Beschreibung dieser Modelle und Ergebnisse findet sich in (Weidemueller und Hauser 2008).

Auch wenn die Auswertung der Elektrostatik-Rechnungen an Strukturmodellen der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase nur qualitative Aussagen zulässt, konnte die Annahme, dass der Helix M5 offensichtlich eine wesentliche Funktion bei der Energietransduktion zukommt, sogar eindeutiger als bei der Ca<sup>2+</sup>-ATPase bestätigt werden.

Die wenigen verfügbaren, hochaufgelösten Strukturen der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase liegen alle im selben Enzymzustand vor, sodass die Simulationen an der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase nur am E2-P-Zustand durchgeführt werden konnten. Das Simulationssystem der Ca<sup>2+</sup>-ATPase wurde ebenfalls auf die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase übertragen (Abb. 32). Dafür wurde die Strukturdatei 3B8E ausgewählt.



**Abb. 32:** Simulationssystem der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. Die Oberfläche der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (pdb-Datei: 3B8E) ist dunkelrot, die umgebende Membran grün und der eingefügte molekulare Kondensator als schwarze Ionen dargestellt.

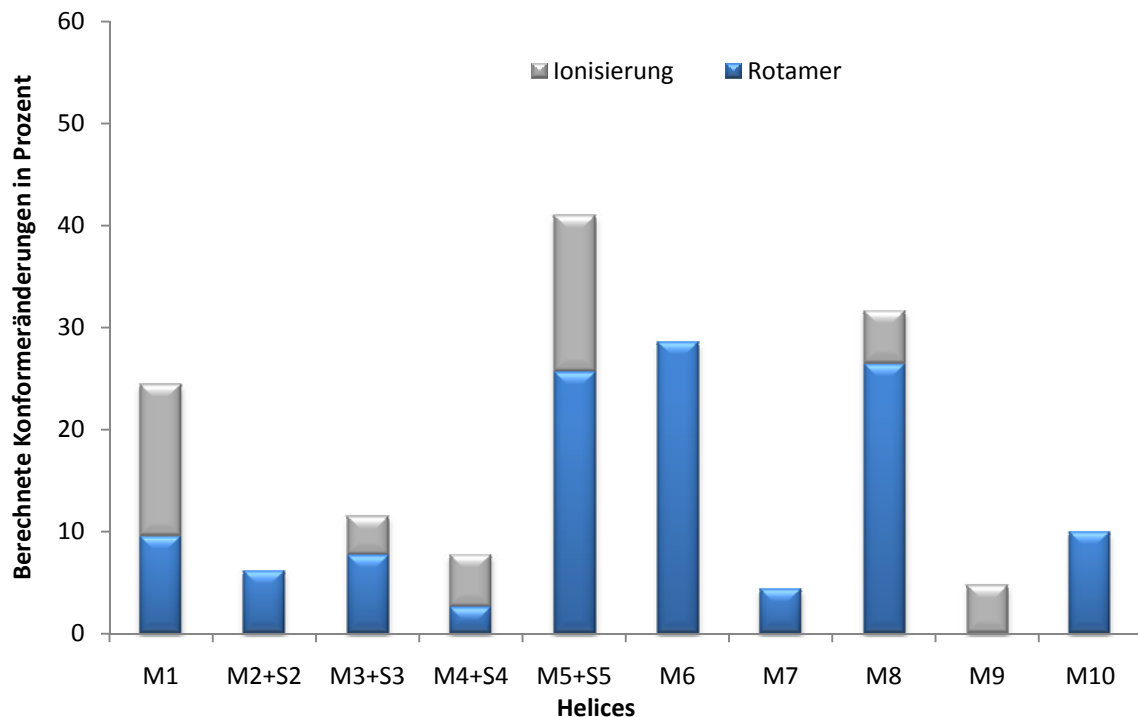
Die Ergebnisse der Simulation am E2-P-Zustand sind in der Tabelle 12 und Tabelle 13 zusammengefasst. In Abb. 33 sind die Konformeränderungen der Transmembranhelices M1 - M10 und des *stalk*-Bereichs S2 - S5 der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, unterteilt in Rotamer- und Ionisierungsänderungen, grafisch dargestellt. Zur besseren Vergleichbarkeit der unterschiedlich langen Helices sind die Änderungen in der Abbildung in Prozent aufgetragen.

Änderungen	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10
<b>Anzahl der Residuen</b>	21	21	20	18	20	21	23	20	19	21
<b>Konformer</b>	5	4	0	3	6	8	2	8	3	5
<b>Rotamer</b>	2	2	0	1	3	6	1	5	0	2
<b>Ionisierung</b>	3	0	0	2	2	0	0	1	1	0

**Tabelle 12:** Konformeränderungen der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase auf den Transmembranhelices M1 - M10. Die Konformeränderungen sind aufgeteilt in Rotamer- und Ionisierungsänderungen. Die nicht signifikanten Rotameränderungen sind nicht in der Tabelle enthalten, daher entspricht die Anzahl der Konformeränderungen nicht zwangsläufig der Summe aus Rotamer- und Ionisierungsänderungen.

Änderungen	M1	M2+S2	M3+S3	M4+S4	M5+S5	M6	M7	M8	M9	M10
Anzahl der Residuen	21	33	26	39	39	21	23	20	19	21
Konformer	5	5	4	5	17	8	2	8	3	5
Rotamer	2	2	2	1	10	6	1	5	0	2
Ionisierungs	3	0	1	2	6	0	0	1	1	0

**Tabelle 13:** Konformeränderungen der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase zuzüglich des *stalk*-Bereichs. Die Konformeränderungen sind aufgeteilt in Rotamer- und Ionisierungsänderungen. Die nicht signifikanten Rotameränderungen sind nicht in der Tabelle enthalten, daher entspricht die Anzahl der Konformeränderungen nicht zwangsläufig der Summe aus Rotamer- und Ionisierungsänderungen.

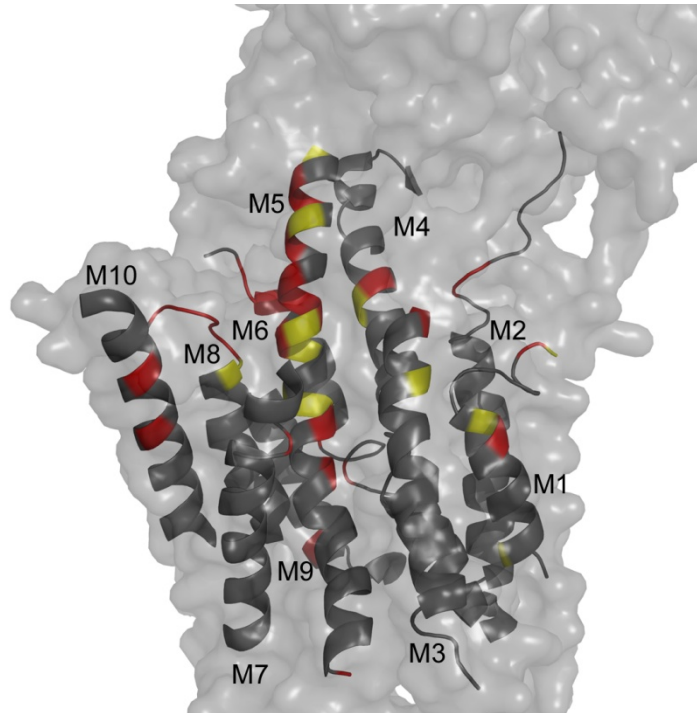


**Abb. 33:** Konformeränderungen der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase auf den Transmembranhelices in Prozent, unterteilt in Rotameränderungen (blau) und Ionisierungsänderungen (grau).

Bei den Simulationen des E2-P-Zustands der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase ist die Helix M5+S5 diejenige, die am stärksten auf ein elektrisches Feld reagiert, und zwar mit Konformeränderungen von mehr als 40 %. Davon entfallen 25 % auf Rotamer- und 15 % auf Ionisierungsänderungen. Unter Einbeziehung des *stalk*-Bereichs zeigt auch die Helix M3+S3 eine Erhöhung der Konformeränderungen. Die Wirkung des elektrischen Feldes auf die Konformeränderungen ist allerdings nicht so ausgeprägt wie bei der Helix M5+S5. Die Helices M6 und M8 zeigen eine ähnlich hohe Anzahl von Konformeränderungen wie die Helix M5. Im Vergleich zur Helix M5+S5, weisen diese beiden Helices allerdings nur halb so viele Rotameränderungen auf. Die Helix M6 zeigt weiterhin keine Ionisierungswechsel. Die Helix M1 zeigt im Vergleich zur M5+S5 die gleiche Anzahl von Ionisierungsänderungen, aber nur weniger als 10 %

Rotameränderungen. Aus diesem Grund ändern sich deutlich weniger Konformere auf der Helix M1 als auf der Helix M5+S5.

Zur besseren Veranschaulichung der Simulationsergebnisse sind die Rotameränderungen (rot) und die Ionisierungswechsel (gelb) der Transmembranhelices M1 - M10 und des *stalk*-Bereichs in Abb. 34 dargestellt.



**Abb. 34:** Darstellung der Konformeränderungen der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase induziert durch das elektrische Feld. Die Konformeränderungen sind unterteilt in Rotameränderungen (rot) und Ionisierungsänderungen (gelb). Dabei sind nur die Konformeränderungen auf der Helix M5+S5 über die ganze Helix verteilt (Weidemüller und Hauser 2009).

In Abb. 34 ist ersichtlich, dass die Länge der Helices keinen Einfluss auf die Anzahl der Änderungen pro Helix hat. Die Helix M4+S4 unterscheidet sich von der Länge her nur um drei Aminosäuren von der Helix M5+S5. Die Konformeränderungen unterscheiden sich dagegen deutlich voneinander. Weniger als 10 % auf der Helix M4+S4 im Vergleich zu mehr als 40 % auf der Helix M5+S5. Deutlich sichtbar ist, dass nur auf der Helix M5+S5 die Rotamer- und Ionisierungsänderungen über die komplette Helix verteilt sind. Bei den anderen Helices sind die Konformeränderungen überwiegend an den Enden der Helix konzentriert oder sie gruppieren sich in bestimmten Regionen auf der jeweiligen Helix.

Experimentelle Daten zeigen, dass bei der Mutation der Aminosäure Asn 776 zu Asp 776 (N776D) die Spannungsabhängigkeit der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase reduziert wird (Koenderink et al. 2003). Die Reduzierung der Spannungsabhängigkeit geht mit einer reduzierten Affinität der Bindestellen für die Kaliumionen

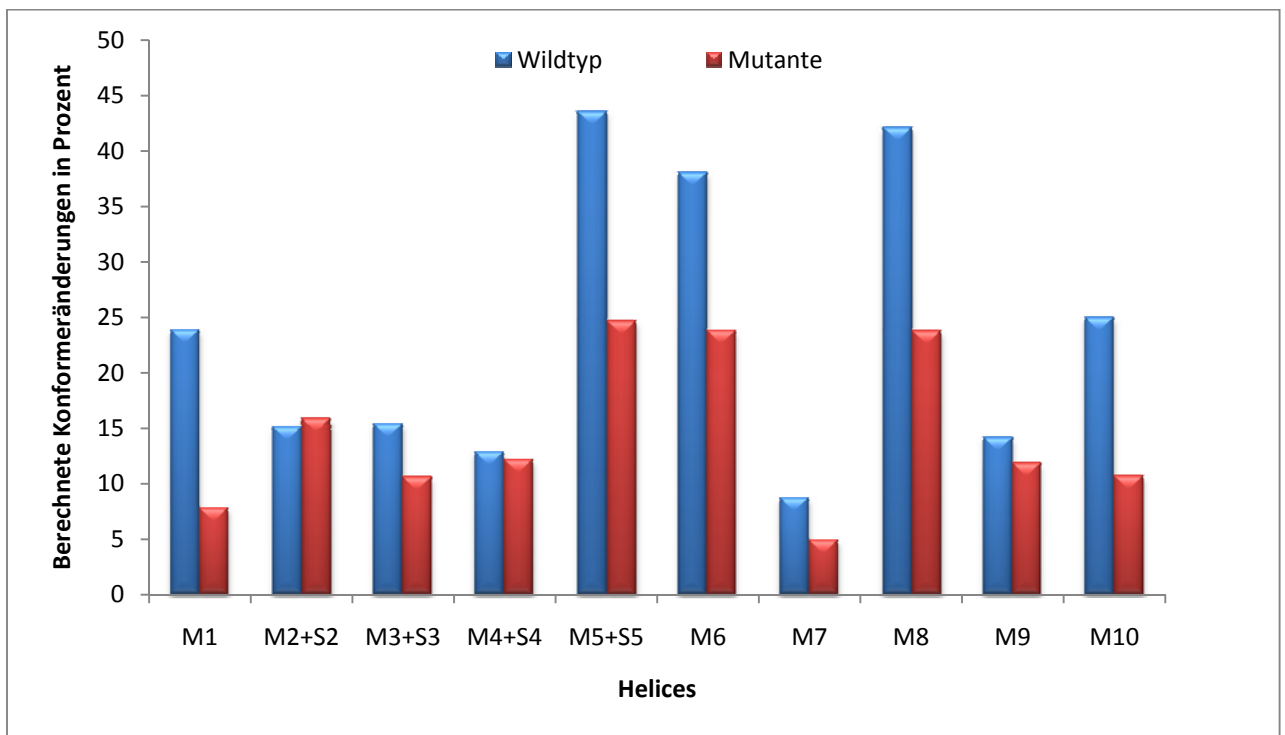


einher. Sollte die Helix M5+S5 an der Energietransduktion beteiligt sein, so sollte auch bei einer Änderung der Aminosäure Asn 776 zu Asp 776 in den Simulationen eine Reduzierung der Spannungsabhängigkeit zu beobachten sein. Diese Mutation und Energieminimierung der neuen Struktur wurde mit dem Programm "swiss-pdb-viewer" durchgeführt. Die so erhaltene Strukturdatei wurde dann wieder mittels der Elektrostatik-Rechnungen ausgewertet. Die Ergebnisse für die einzelnen Transmembranhelices sind in Tabelle 14 aufgeführt.

Konformer-änderungen [%]	M1	M2+S2	M3+S3	M4+S4	M5+S5	M6	M7	M8	M9	M10
<b>Mutante</b>	7,7	15,9	10,6	12,2	24,7	23,8	4,9	23,8	11,8	10,7
<b>Wildtyp</b>	23,8	15,2	15,4	12,8	43,6	38,1	8,7	42,1	14,3	25

**Tabelle 14:** Prozentuale Konformeränderungen der mutierten N<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (N776D) im Vergleich zum Wildtyp (pdb-Datei: 3B8E).

Vergleicht man die berechneten Konformeränderungen die, ausgelöst durch ein simuliertes elektrisches Feld, auf der Mutante N776D und dem Wildtyp der N<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase auftreten, so ist deutlich zu erkennen, dass sich der Verlust der Spannungsabhängigkeit auch in den Elektrostatik-Rechnungen zeigt (Abb. 35).



**Abb. 35:** Vergleich des Wildtyps mit einer spannungsunabhängigen Mutante der N<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. Die berechneten Konformeränderungen sind in Prozent, bezogen auf die Anzahl der Aminosäuren der jeweiligen Helix, angegeben.

Von der Reduzierung der Konformeränderungen sind weitgehend alle Helices betroffen, vor allem aber die Helices M1, M5+S5, M6 und M8. Bei den restlichen Helices ändert sich die Anzahl der Konformeränderungen dagegen nur minimal. Diese Reduzierung der Konformeränderungen findet statt, obwohl nur eine Aminosäure geändert wird und für die Asn 776 sogar eine geladene Aminosäure (Asparaginsäure) eingefügt wird.

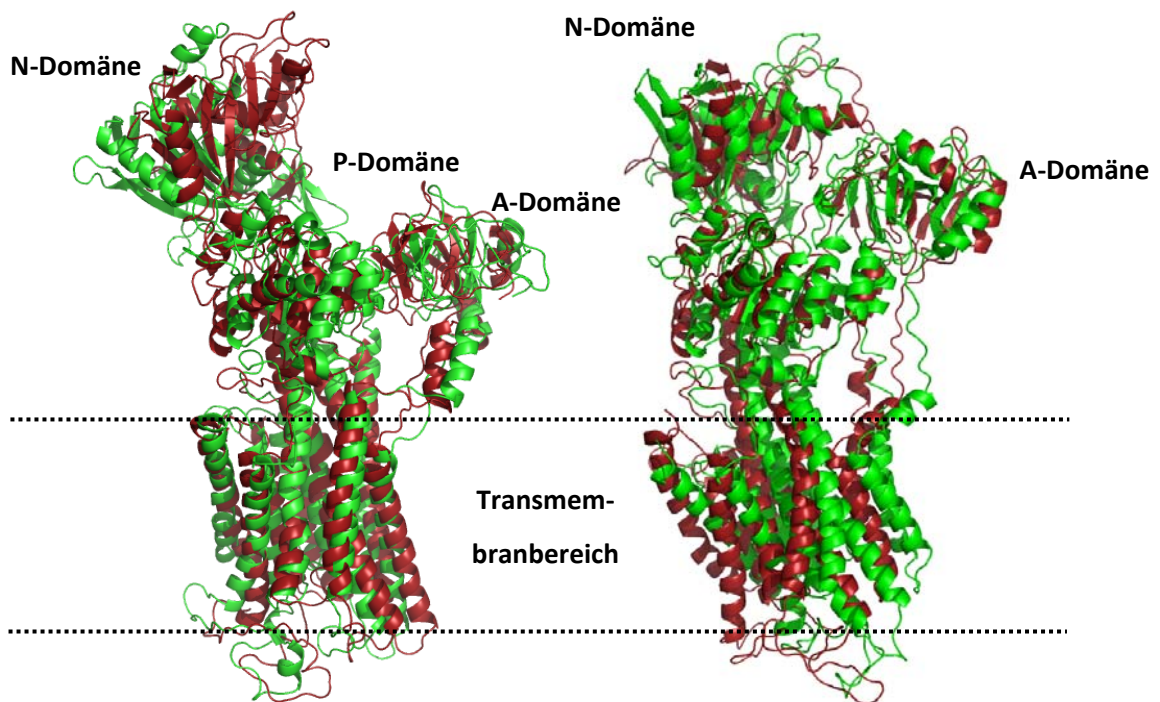
Dieses Resultat befindet sich in guter Übereinstimmung mit den bisher durch Elektrostatik-Rechnungen gewonnenen Daten und bestätigt erneut die Annahme, dass die Helices M5+S5, M6 und M8 eine wichtige Funktion bei der Energietransduktion übernehmen. Des Weiteren befinden sich diese Simulationen in guter Übereinstimmung mit den experimentell gefundenen Ergebnissen (Koenderink et al. 2003). So wie in den Experimenten gezeigt, ist die Spannungsabhängigkeit auch in den Simulationen die der mutierten  $\text{N}^+/\text{K}^+$ -ATPase reduziert.

Die Elektrostatik-Rechnungen an der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase zur Bestimmung spezifischer Transmembranhelices als Energietransduktionselemente, führen zu den gleichen Resultaten, die sich schon in den Elektrostatik-Rechnungen an der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase ergaben. Hervorzuheben ist, dass diese Resultate sich bei den Simulationen an der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase noch viel eindeutiger darstellen als bei der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. Auch die Verteilung der Konformeränderungen auf den Transmembranhelices weist auf eine wichtige Rolle der Helix M5+S5 bei der Energietransduktion hin, so wie es sich bereits bei der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase zeigte (siehe Kapitel 5.1.6).

### 5.1.8 Molekulardynamik-Simulationen der $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase

Die Energietransduktion in P-Typ-ATPasen ist ein dynamischer Prozess. Die P-Typ-ATPasen unterliegen während des Übergangs aus dem E1- in den E2-Zustand großen konformellen Änderungen (Abb. 36). MCCE erfasst aber nicht die konformellen Änderungen des Proteinrückgrates, sondern nur die Ionisierungs- und Seitenkettenänderungen. Die vorausgegangenen Rechnungen deuten aber darauf hin, dass für den Energietransduktionsmechanismus sowohl die Konformer- als auch die Ionisierungsänderungen der Aminosäuren wichtig sind. Um größere konformelle Änderungen des Proteins zu erfassen, bietet sich die Methode der MD-Simulation an.

Aufgrund der Größe der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase lagen bisher noch keine MD-Simulationen der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase vor, die über einen längeren Zeitraum die Konformation des Proteins untersuchen. Daher wurde in dieser Arbeit mittels MD-Simulationen der konformelle Raum der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase erweitert. Da aber auch die MD-Simulationen nicht den kompletten Reaktionszyklus erfassen können, wurden die Simulationen von den beiden Hauptenzymzuständen aus gestartet. Von den verfügbaren Kristallstrukturdaten weisen diese beiden Enzymzustände den größten konformellen Unterschied auf. Somit lässt sich der konformelle Raum, der nicht durch die MD-Simulationen erreichbar ist, minimieren.



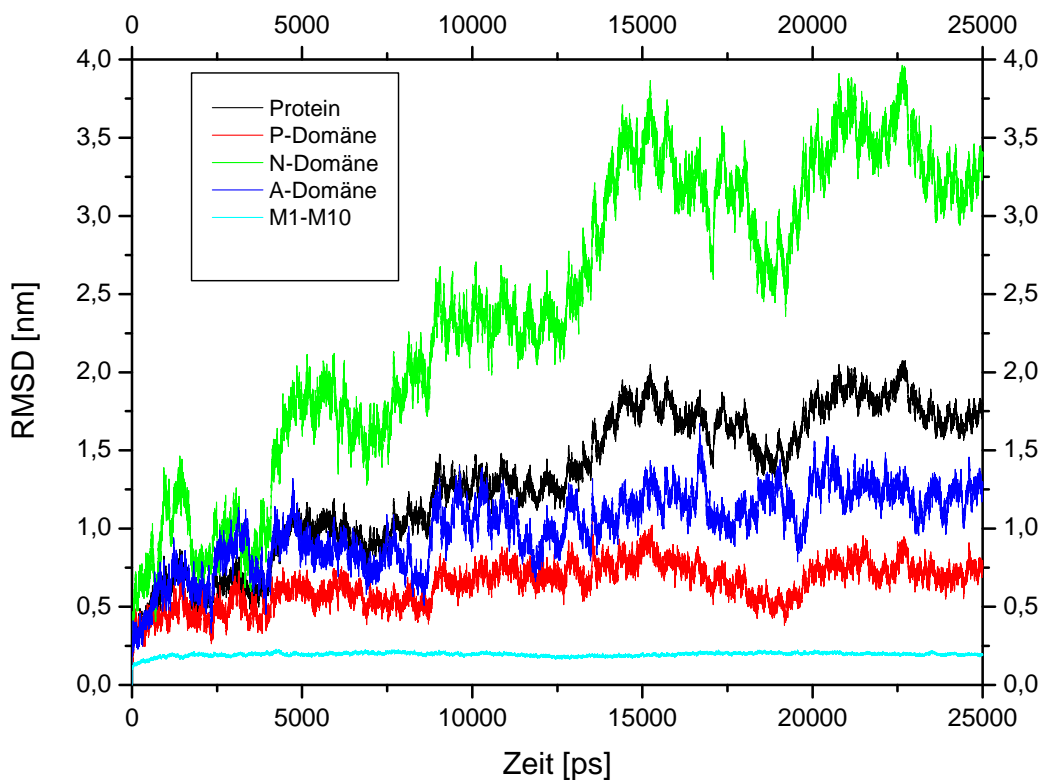
**Abb. 36:** Überlagerung des E1- und des E2-Zustandes mit simulierten Strukturen. **Links:** Überlagerung des Calcium-gebundenen Zustandes E1 mit dem simulierten E1-Zustand nach 25 ns. Die Calcium-gebundene Kristallstruktur (pdb-Datei: 1SU4; grün) ist überlagert mit der simulierten Struktur (pdb-Datei: 1SU4; rot). **Rechts:** Überlagerung des Calcium-freien Zustandes E2 mit dem simulierten E2-Zustand nach 25 ns. Die Calcium-freie Kristallstruktur (pdb-Datei: 2AGV; grün) ist überlagert mit der simulierten Struktur (pdb-Datei: 2AGV; rot).

Die Simulationen wurden unter den in Kapitel 4.6.2.2 beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Zur Analyse der MD-Simulationen wurden die Bereiche des Proteins, wie in Kapitel 3.1 beschrieben, in die N-, P- und A-Domäne sowie in einen Transmembranbereich eingeteilt. Zur Bestimmung der konformellen Änderungen der einzelnen Proteinbereiche wurden die Standardabweichungen (RMSD - *Root mean square deviation*) der drei cytoplasmatischen Bereiche, des Transmembranbereiches und des ganzen Proteins berechnet.

$$RMSD(t_1, t_2) = \sqrt{\frac{1}{M} \sum_{i=1}^N m_i \|r_i(t_1) - r_i(t_2)\|^2}$$

wobei  $M = \sum_{i=1}^N m_i$  und  $r_i(t)$  die Position des Atoms  $i$  zur Zeit  $t$  ist.

Die Berechnung des RMSD-Wertes wurde für alle Atome des Systems zur Referenzstruktur ( $t_2=0$ ) durchgeführt.

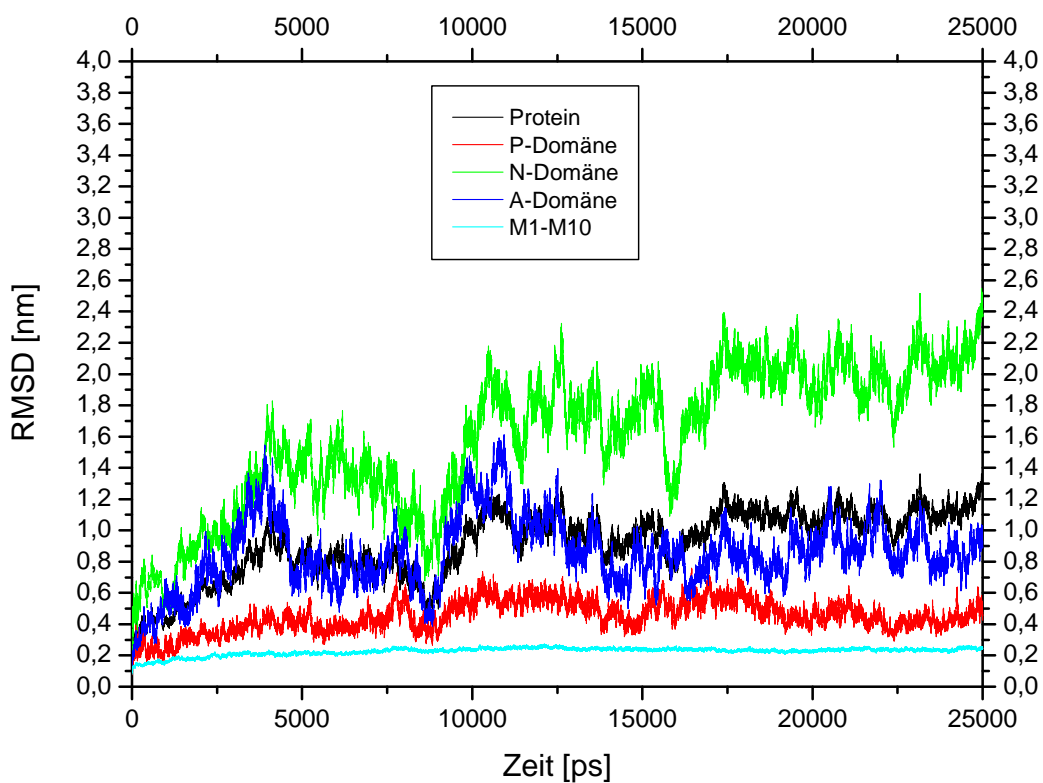


**Abb. 37:** Standardabweichung der Atompositionen der Calcium-freien E1-Struktur nach 25 ns Simulationszeit (pdb-Datei: 1SU4 **mit Calciumionen**). In der Abbildung sind die RMSD-Werte für 5 Proteinbereiche angegeben. In Schwarz ist die Gesamtabweichung des Proteins von der Referenzstruktur dargestellt. Der RMSD der P-Domäne ist rot, der N-Domäne grün, der A-Domäne blau und des Transmembranbereiches (M1 - M10) hellblau dargestellt.

In Abb. 36 ist ein konformeller Unterschied der Kristallstrukturen der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase im cytoplasmatischen Bereich zwischen dem E1- und dem E2-Zustand sichtbar. Dieser Unterschied wird

auch in den MD-Simulationen deutlich (Abb. 37). Die konformellen Änderungen finden hauptsächlich im cytoplasmatischen Kopfbereich statt. Die größte Abweichung der Struktur nach 25 ns Simulationszeit besteht für die N-Domäne (Abb. 36 und Abb. 37). Dabei ist festzuhalten, dass sich alle cytoplasmatischen Bereiche relativ zum Transmembranbereich stärker bewegen. Im Vergleich dazu verändert sich der Transmembranbereich während der ersten 25 ns nur minimal, auch wenn sich die einzelnen Helices anders anordnen.

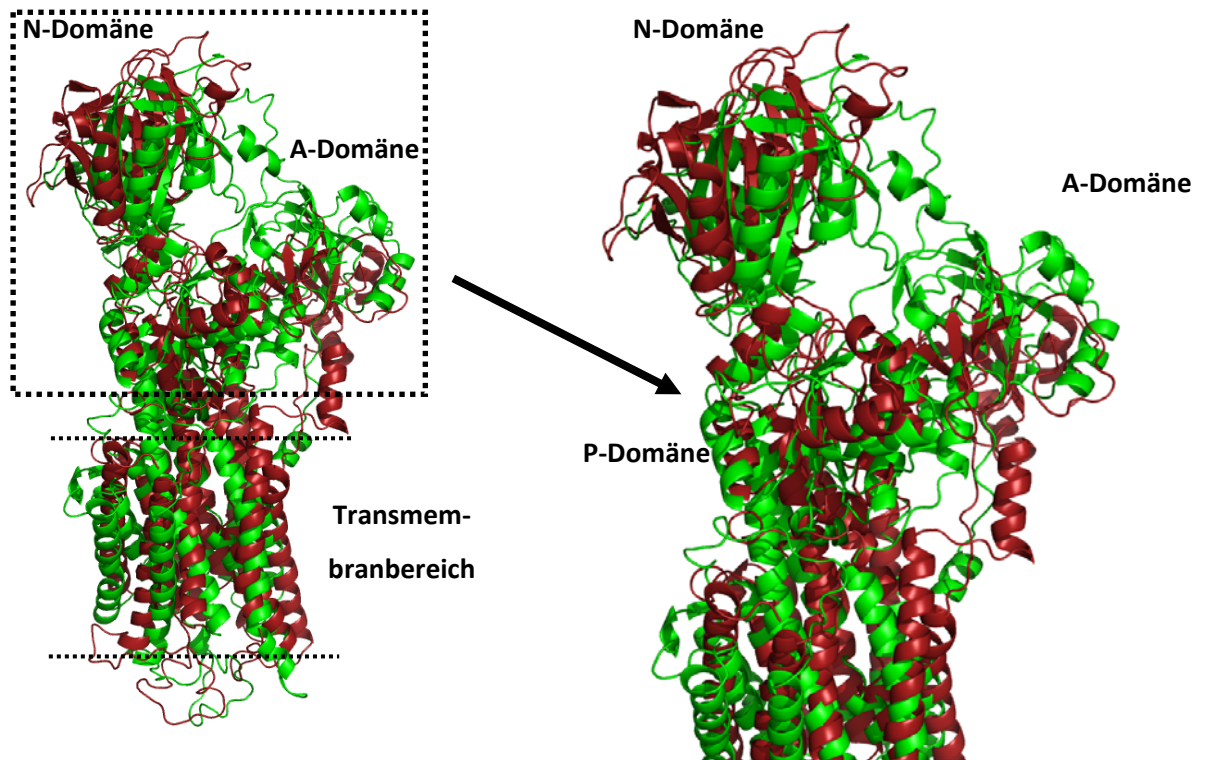
Führt man dieselben Simulationen an der gleichen Struktur durch, entfernt aber vorher die Calciumionen aus den Bindestellen, so erhält man für die Standardabweichung den Graphen in Abb. 38.



**Abb. 38:** Standardabweichung der Atompositionen der Calcium-freien E1-Struktur nach 25 ns Simulationszeit (pdb-Datei: 1SU4 **ohne Calciumionen**). In der Abbildung sind die RMSD-Werte für 5 Proteinbereiche angegeben. In Schwarz ist die Gesamtabweichung des Proteins von der Referenzstruktur dargestellt. Der RMSD der P-Domäne ist rot, der N-Domäne grün, der A-Domäne blau und des Transmembranbereiches (M1 - M10) hellblau dargestellt.

Wieder ist zu erkennen, dass sich die cytoplasmatischen Bereiche stärker bewegen als der Transmembranbereich. Ebenso ist die N-Domäne wieder die Domäne, die sich am stärksten verändert. Vergleicht man die Bewegung der beiden N-Domänen in den Simulationen mit und ohne Calciumionen untereinander, so zeigt sich, dass sich die N-Domäne ohne Calciumionen konformell nur halb so viel verändert wie die mit beiden Calciumionen. Dies spricht dafür, dass die Bindung der

Calciumionen eine wichtige Funktion für den Reaktionsmechanismus bzw. für den Start der Reaktion übernimmt.



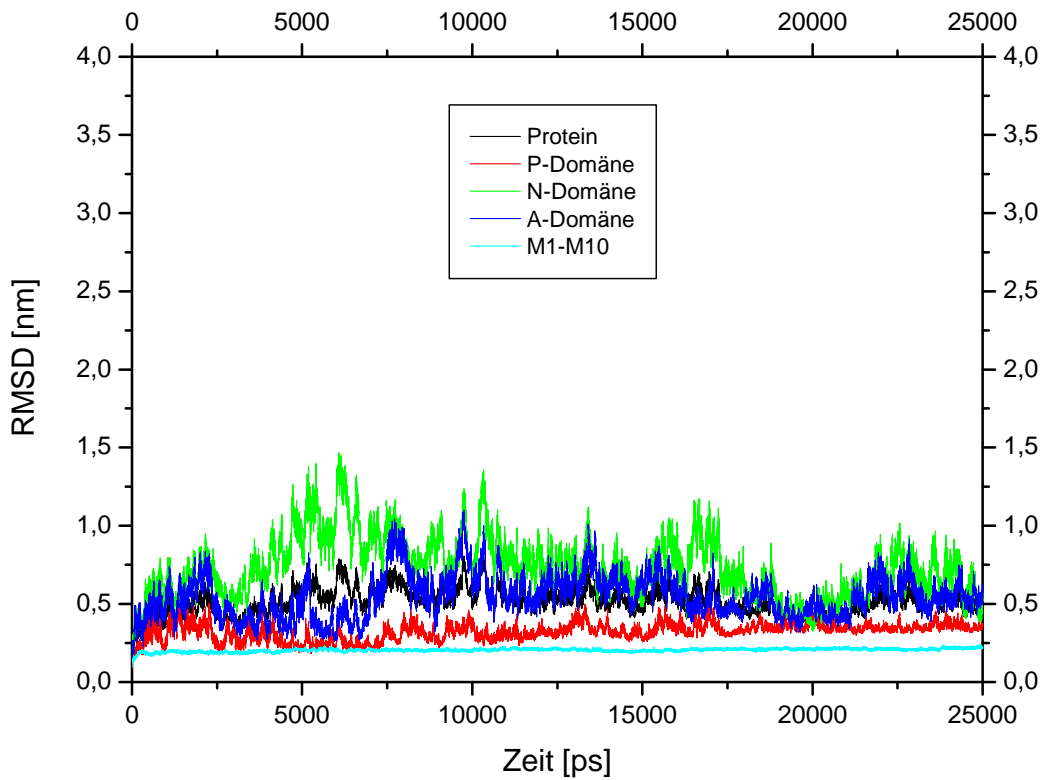
**Abb. 39:** Überlagerung der Calcium-freien Kristallstruktur (pdb-Datei: 2AGV) mit der Calcium-gebundenen (pdb-Datei: 1SU4) nach 25 ns Simulationszeit. **Rechts:** Ausschnitt des cytoplasmatischen Bereiches.

Vergleicht man die Kristallstruktur des E1-Zustandes mit der simulierten Struktur dieses Zustandes nach 25 ns, so erkennt man auch deutlich die Bewegung der N-Domäne, die sich sowohl der A- als auch der P-Domäne annähert. Somit bewegt sie sich in den Simulationen auf die Konformation zu, welche die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase im E2-Zustand annimmt (Abb. 39).

Da bei der MD-Simulation keine Bindung und Hydrolyse von ATP an die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase simuliert wird und somit der eigentlich Startmechanismus des Reaktionszyklus fehlt, ist nicht zu erwarten, dass sich der cytoplasmatische Bereich während der Simulationen so stark bewegt wie in Abb. 37 und Abb. 39 dargestellt. Die konformelle Veränderung des cytoplasmatischen Bereiches kann auf die bereits vorhandenen Calciumionen zurückgeführt werden, die ein wichtiger Faktor für den konformellen Übergang aus dem E1- in den E2-Zustand sind (siehe Kapitel 3.3). Weiterhin ist nicht sicher erforscht, in welchem Abstand sich die N-Domäne von den anderen Domänen im E1-Zustand in ihrer physiologischen Umgebung befindet. Es ist daher nicht auszuschließen, dass in der physiologischen Umgebung der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase die Domänen während des Reaktionszyklus sich nicht so weit voneinander entfernen, wie sie in der Kristallstruktur des E1-Zustandes (pdb-Datei: 1SU4) vorliegen. Daher lässt es sich ebenfalls nicht ausschließen, dass der große Abstand zwischen der N- und der

A-Domäne auch auf ein Artefakt der Kristallstruktur bzw. der hohen Calciumkonzentration, die während der Kristallisation vorliegt, zurückzuführen ist (Winters et al. 2008).

Des Weiteren wurden die Simulationen auch an der Calcium-freien E2-Struktur der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase durchgeführt (Abb. 40).



**Abb. 40:** Standardabweichung der Atompositionen der Calcium-freien E2-Struktur nach 25 ns Simulationszeit (pdb-Datei: 2AGV). In der Abbildung sind die RMSD-Werte für 5 Proteinbereiche angegeben. In Schwarz ist die Gesamtabweichung des Proteins von der Referenzstruktur dargestellt. Der RMSD der P-Domäne ist rot, der N-Domäne grün, der A-Domäne in blau und des Transmembranbereiches (M1 - M10) in hellblau dargestellt.

Wie es für diesen Zustand zu erwarten ist, liegt eine wesentlich geringere konformelle Änderung der einzelnen Domänen nach 25 ns vor.

### 5.1.9 Kombination von MD-Simulation und MCCE an der Ca<sup>2+</sup>-ATPase

Die Erweiterung der Elektrostatik-Rechnungen um die MD-Simulation wurde auf die Ca<sup>2+</sup>-ATPase übertragen. Die MD-Simulation erfordert, vor dem Start die Ionisierungszustände der einzelnen Aminosäuren festzulegen, d.h., dass während der Simulation eine festgelegte Ionisierung der einzelnen Aminosäuren vorliegt, die nicht durch die konformellen Änderungen beeinflusst wird. Daher ist es nicht möglich, in MD-Simulationen den Einfluss der Umgebung auf verschiedene Ionisierungszustände zu berechnen. Dieser Einfluss kann durch Elektrostatik-Rechnungen an Schnappschüssen der MD-Simulation erfasst werden. Um die Vorteile beider Simulationsmethoden zu nutzen, wurden zuerst, wie in Kapitel 5.1.8 beschrieben, die MD-Simulationen an der Ca<sup>2+</sup>-ATPase durchgeführt. An der durch die MD-Simulation erhaltenen Trajektorie des Proteins wurden Schnappschüsse ausgewählt, an denen die Elektrostatik-Rechnungen durchgeführt wurden.

Um die Atomkoordinaten des Protein-Membran-Komplexes der MD-Simulation in MCCE benutzen zu können, wurden die Wasserstoffatome, die für die MD-Simulation der Aminosäuren und der Wassermoleküle erforderlich waren, entfernt. Ebenso wurden alle expliziten Wassermoleküle, in denen sich der Protein-Membran-Komplex befindet, wieder entfernt. Die in den MD-Simulationen verwendete DOPC-Membran wurde für die Elektrostatik-Rechnungen beibehalten. Allerdings wurde sie im Gegensatz zu den MD-Simulationen als neutral betrachtet, um einerseits den Rechenaufwand nicht noch weiter zu erhöhen und um andererseits eine bessere Vergleichbarkeit mit den bisher durchgeführten Elektrostatik-Rechnungen herzustellen. Die Atome für den molekularen Kondensator wurden oberhalb und unterhalb des Proteins eingefügt, um ein homogenes elektrisches Feld über der Membran zu erzeugen. Die Elektrostatik-Rechnungen wurden an Schnappschüssen der MD-Simulationen des E1- und des E2-Zustand durchgeführt (siehe Kapitel 5.1.8).

Ein wesentlicher Vorteil dieser kombinierten Simulationsmethode ist die Flexibilisierung der starren Kristallstrukturen. Dadurch ist es nicht nur möglich, die beiden wichtigen Faktoren der Energietransduktion in P-Typ-ATPasen gleichzeitig zu betrachten (konformelle Änderungen und Ionisierungszustände), sondern auch noch das elektrische Feld, das in den Elektrostatik-Rechnungen angelegt wird, zu reduzieren. Durch die Kombination der beiden Methoden möglich gewordene Reduktion nähert sich die verwendete elektrische Feldstärke der physiologisch bestehenden bzw. der experimentell angelegten an. Durch diese Kombination kann die elektrische Feldstärke um eine Größenordnung im Vergleich zu den Elektrostatik-Rechnungen von  $E \approx 2.4 \cdot 10^{11} \frac{\text{V}}{\text{m}}$  auf  $E \approx 10^{10} \frac{\text{V}}{\text{m}}$  reduziert werden. Die Gesamtzahl der eingefügten Ionen konnte daher von 50 auf 30 gesenkt werden. Diese 30 Ionen wurden so aufgeteilt, dass sich 15 oberhalb und 15 unterhalb des Transmembranbereiches befinden. Die Anordnung der Atome im Simulationssystem erfolgte so, dass



sie einer idealisierten Kondensatorplatte entsprechen und somit ein homogenes elektrisches Feld erzeugen.

Eine noch weitergehende Reduktion der elektrischen Feldstärke ist auch durch die Kombination der beiden Simulationsmethoden nicht möglich. Wie sich gezeigt hat, benötigen viele Untersuchungen *in silico* elektrische Feldstärken, die um das 10- bis 100-fache gegenüber den physiologischen Feldern erhöht sein können (siehe Kapitel 5.1.1). In den MD-Simulationen kann das Proteinrückgrat zwar verschiedene Orientierungen annehmen, diese werden aber weiterhin in den Elektrostatik-Rechnungen als starr behandelt. Außerdem werden die Rotamere nur in diskreten, vorher festgelegten Abständen generiert. Ein Wechsel der Besetzungswahrscheinlichkeit von einem zum anderen Rotamer muss immer eine bestimmte, vorher festgelegte Grenze überschreiten, bis diese in den Elektrostatik-Rechnungen nachgewiesen werden kann. Diese Grenze ist aber nicht infinitesimal klein wählbar, da die Anzahl der Rotamere drastisch steigen und nicht mehr zu berechnen wäre. Simulationen erfordern stets einen Kompromiss zwischen Schnelligkeit und Genauigkeit der Rechnungen, mit der Folge, dass kleine Änderungen der Rotamere nicht nachgewiesen werden können. Dabei stellt sich allerdings die Frage, ob sich solche minimalen Änderungen überhaupt auf die Energietransduktion auswirken oder ob es sich dabei nur um nicht signifikante Fluktuationen dieser Seitenketten handelt.

Um den Einfluss des angelegten elektrischen Feldes auf die Transmembranhelices auszuwerten, wurde als erstes der E2-Zustand betrachtet, dessen verschiedene Proteinbereiche im Vergleich zu den MD-Simulationen am Enzymzustand E1 wesentlich kleineren konformellen Änderungen unterliegen (siehe Kapitel 5.1.8). Die berechneten Konformeränderungen sind in der Tabelle 15 aufgeführt. In der vorletzten Zeilen sind die Konformeränderungen über die verschiedenen Simulationszeiten gemittelt und in der letzten Zeile sind die gemittelten Konformeränderungen zusätzlich pro Anzahl der Aminosäuren der jeweiligen Helix aufgetragen.

Schnappschuss zur Zeit	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10
0 ns	5	3	4	2	6	1	1	5	0	5
1 ns	4	4	5	1	6	1	4	3	2	3
2 ns	4	3	3	1	5	4	3	4	1	2
3 ns	5	2	4	0	5	3	4	3	2	4
4 ns	4	3	5	1	5	3	5	3	1	2
5 ns	4	4	5	1	4	3	3	1	0	3
6 ns	4	2	4	1	5	2	4	6	0	3
7 ns	5	3	5	1	6	3	2	6	1	2
8 ns	5	4	4	3	6	4	3	6	1	2
9 ns	4	2	5	1	7	4	2	2	0	4
10 ns	4	4	4	1	5	4	2	3	0	4
13 ns	5	4	3	1	3	3	3	2	0	4
16 ns	5	3	5	0	4	4	3	2	0	2
19 ns	5	3	5	1	5	2	1	4	1	4
22 ns	8	4	5	1	6	4	4	5	0	4
25 ns	6	3	5	1	4	1	4	6	2	3
gemittelt	5	3	4	1	5	3	3	4	1	3
Anzahl der Residuen	21	21	20	18	20	21	23	20	19	21
pro Helix [%]	25	17,8	24	11,1	25,4	12,8	12,4	15,8	5,7	13,7

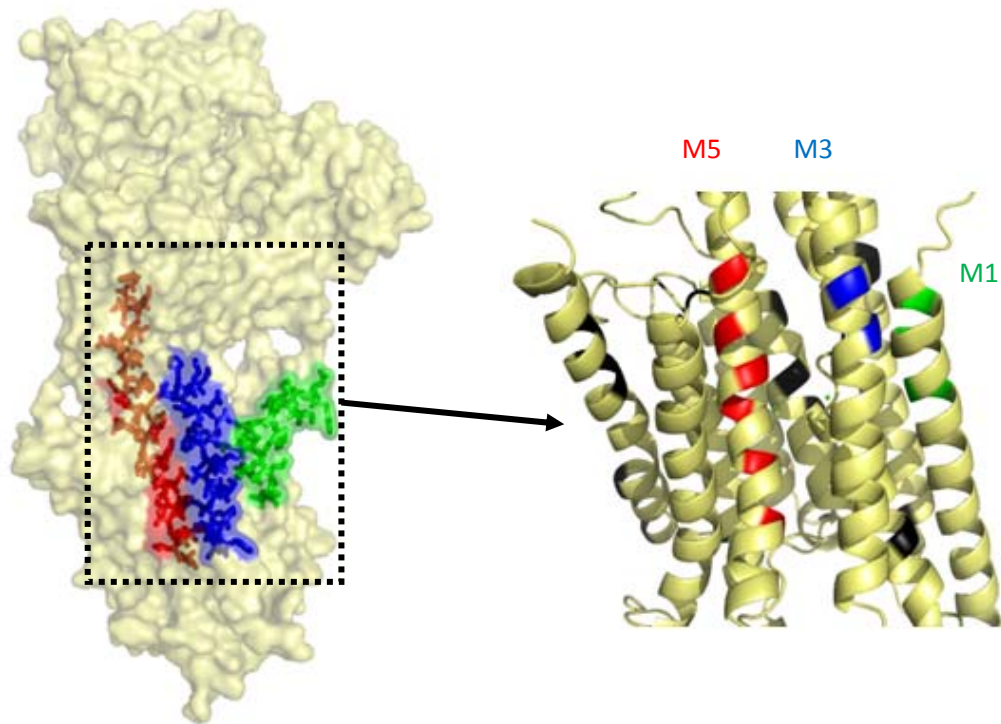
**Tabelle 15:** Konformeränderungen zu verschiedenen Simulationszeiten des Calcium-freien Zustandes E2 (pdb-Datei 2AGV). **gemittelt:** Anzahl der Konformeränderungen pro Transmembranhelix gemittelt über die gesamte Simulationszeit (25ns). **pro Helix:** prozentuale Konformeränderungen bezogen auf die jeweilige Transmembranhelix.

Die Tabelle 15 zeigt, dass die Helices M1, M3 und M5 die einzigen Helices sind, auf die mehr als 20 % der Konformeränderungen entfallen. Die gleiche Auswertung wurde ebenfalls für die Transmembranhelices mit dem *stalk*-Bereich durchgeführt (Tabelle 16).

Schnappschuss zur Zeit	M1	M2+S2	M3+S3	M4+S4	M5+S5	M6	M7	M8	M9	M10
0 ns	5	6	6	7	11	1	1	5	0	5
1 ns	5	5	9	6	12	1	4	3	2	3
2 ns	5	5	6	8	13	4	3	4	1	2
3 ns	7	3	5	5	11	3	4	3	2	4
4 ns	5	5	7	8	10	3	5	3	1	2
5 ns	4	6	8	6	11	3	3	1	0	3
6 ns	4	3	6	5	11	2	4	6	0	3
7 ns	6	5	7	6	13	3	2	6	1	2
8 ns	6	5	8	7	12	4	3	6	1	2
9 ns	4	4	7	7	14	4	2	2	0	4
10 ns	5	6	6	7	11	4	2	3	0	4
13 ns	7	6	5	7	9	3	3	2	0	4
16 ns	6	3	8	7	7	4	3	2	0	2
19 ns	6	5	8	8	10	2	1	4	1	4
22 ns	9	7	7	8	10	4	4	5	0	4
25 ns	6	6	6	9	8	1	4	6	2	3
gemittelt	6	5	7	7	11	3	3	4	1	3
Anzahl der Residuen	21	33	26	39	39	21	23	20	19	21
pro Helix [%]	25	14	24,8	16,7	26	12,8	12,4	15,8	5,7	13,7

**Tabelle 16:** Konformeränderungen zu verschiedenen Simulationszeiten des E2-Zustandes inklusive *stalk*-Bereich (pdb-Datei 2AGV). **gemittelt:** Anzahl der Konformeränderungen pro Transmembranhelix gemittelt über die gesamte Simulationszeit (25 ns). **pro Helix:** prozentuale Konformeränderungen bezogen auf die jeweilige Transmembranhelix.

Die meisten Änderungen, die das elektrische Feld verursacht, liegen auf den Helices M1, M3 und M5. Differenziert man die Konformeränderungen wieder in Rotameränderungen und in Ionisierungsänderungen, so zeigt sich, dass auf der Helix M1 nur eine Ionisierungsänderung vorliegt, obwohl in dieser Helix fünf ionisierbare Aminosäuren enthalten sind. Weiterhin lässt sich feststellen, dass die Rotameränderungen nur minimal von der Kristallstruktur abweichen und somit nicht signifikant sind. Vergleicht man die Ionisierungsänderungen der Helices M3 und M5 mit den Ionisierungsänderungen auf denselben Helices im E1-Zustand, so ist die Anzahl dieser Ionisierungsänderungen stark reduziert. Es lassen sich jedoch viele signifikante Rotameränderungen feststellen.



**Abb. 41:** Lokalisation der Helices mit den meisten Konformeränderungen in der Calcium-freien E2-Struktur. Die Helix M1 ist grün, die Helix M3 ist blau, die Helices M5 ist rot markiert. **Rechts:** Zur besseren Übersicht sind nur die Transmembranhelices abgebildet. Die Konformeränderungen sind für die Helix M1 grün, die Helix M3 blau und die Helix M5 rot markiert. Alle anderen Konformeränderungen sind schwarz dargestellt.

Auch beim kombinierten Simulationsansatz bestätigt sich wieder, dass die Helix M5+S5, obwohl sie den geringsten SAS-Wert besitzt (siehe Kapitel 5.1.5), die meisten Konformeränderungen zeigt. Dabei setzen sich diese Änderungen sowohl aus Ionisierungsänderungen als auch aus signifikanten Rotameränderungen zusammen. Auch bei der Reduzierung der elektrischen Feldstärke verändert sich das Ergebnis nicht und belegt damit, dass die Helix M5+S5 eine wichtige Rolle als Energietransduktionselement übernimmt. Somit konnte gezeigt werden, dass die Kombination aus MD-Simulationen und Elektrostatik-Rechnungen die erforderliche elektrische Feldstärke reduzieren kann, ohne von den Ergebnissen der vorhergehenden Simulationen abzuweichen. Die erweiterte Simulationsmethode erlaubt es, elektrische Feldstärken einzusetzen, die sich nur noch um einen Faktor 100 von den physiologischen bzw. von den in Experimenten verwendeten Feldstärken unterscheidet.

Dieselbe Auswertung des Einflusses eines angelegten elektrischen Feldes auf die Transmembranhelices M1 - M10, wie sie für den E2-Zustand durchgeführt wurde, wurde auch für den E1-Zustand der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase an der pdb-Datei 1SU4 durchgeführt (Tabelle 17 und Tabelle 18). Auch hier sind in der vorletzten Zeile die Konformeränderungen über die gesamte Simulationszeit von 25 ns gemittelt und in der letzten Zeile sind die gemittelten Konformeränderungen pro Gesamtzahl der Aminosäuren der jeweiligen Helix aufgetragen.

Schnappschuss zur Zeit	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10
0 ns	4	4	6	2	5	1	5	4	0	4
1 ns	5	4	4	2	5	2	3	3	0	4
2 ns	6	5	6	1	5	3	3	4	2	6
3 ns	6	4	3	2	3	1	5	4	1	5
4 ns	5	3	5	2	4	4	1	2	4	6
5 ns	6	3	7	2	6	1	5	3	1	4
6 ns	6	4	5	2	4	2	1	2	1	4
7 ns	5	3	5	2	5	3	3	3	2	5
8 ns	5	3	5	2	7	3	2	5	1	5
9 ns	5	6	5	2	4	4	3	2	0	4
10 ns	4	4	2	2	5	3	1	3	0	5
11 ns	5	3	4	2	5	2	3	3	0	5
12 ns	4	4	3	2	6	2	1	2	0	4
13 ns	6	4	3	2	4	3	2	3	2	6
14 ns	6	3	7	3	6	4	2	5	1	6
15 ns	4	3	5	3	5	3	1	2	2	5
16 ns	5	3	4	2	5	2	3	3	0	5
17 ns	7	3	6	2	6	1	4	2	0	6
18 ns	5	4	5	4	6	5	4	4	1	6
19 ns	4	4	5	1	7	3	3	2	0	4
20 ns	6	5	3	2	5	3	2	2	1	4
21 ns	4	4	5	2	6	4	3	4	0	5
22 ns	4	3	4	1	6	3	4	3	3	5
23 ns	4	5	6	1	5	2	3	4	2	6
24 ns	4	2	5	1	4	2	3	5	2	5
25 ns	5	4	7	3	3	4	4	3	2	4
gemittelt	5	4	5	2	5	3	3	3	1	5
Anzahl der Residuen	21	21	20	18	20	21	23	20	19	21
pro helix [%]	23,81	17,77	24,04	11,11	25,38	12,82	12,37	15,77	5,67	23,44

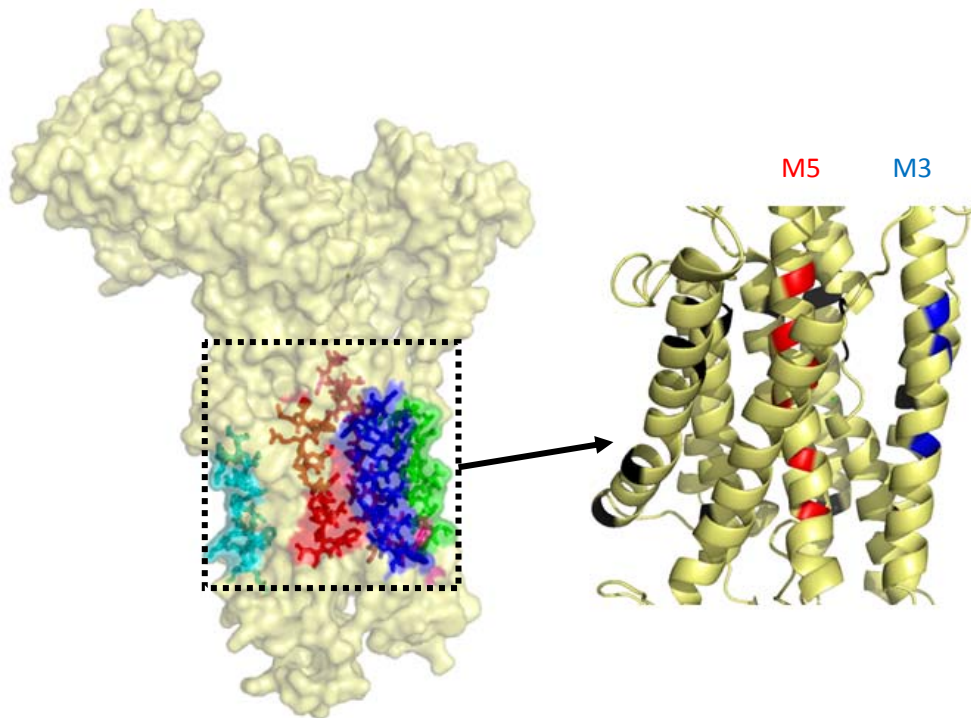
**Tabelle 17:** Konformeränderungen zu verschiedenen Simulationszeiten des Calcium-gebundenen Zustandes E1 (pdb-Datei 1SU4). **gemittelt:** Anzahl der Konformeränderungen pro Transmembranhelix gemittelt über die gesamte Simulationszeit (25 ns). **pro Helix:** prozentuale Konformeränderungen bezogen auf die jeweilige Transmembranhelix.

Die gleiche Auswertung wurde ebenfalls für die Transmembranhelices und den *stalk*-Bereich durchgeführt (Tabelle 18).

Schnappschuss zur Zeit	M1	M2+S2	M3+S3	M4+S4	M5+S5	M6	M7	M8	M9	M10
0 ns	4	7	8	11	12	1	5	4	0	4
1 ns	5	9	5	9	11	2	3	3	0	4
2 ns	8	8	10	9	10	3	3	4	2	6
3 ns	7	10	5	11	10	1	5	4	1	5
4 ns	6	8	7	10	11	4	1	2	4	6
5 ns	7	7	10	9	11	1	5	3	1	4
6 ns	7	9	7	11	11	2	1	2	1	4
7 ns	6	8	8	9	13	3	3	3	2	5
8 ns	6	7	6	10	14	3	2	5	1	5
9 ns	6	9	10	9	8	4	3	2	0	4
10 ns	6	10	4	9	10	3	1	3	0	5
11 ns	6	7	7	10	12	2	3	3	0	5
12 ns	4	8	6	11	12	2	1	2	0	4
13 ns	6	8	7	10	9	3	2	3	2	6
14 ns	8	9	11	10	13	4	2	5	1	6
15 ns	5	6	7	11	12	3	1	2	2	5
16 ns	6	7	7	10	12	2	3	3	0	5
17 ns	8	8	10	10	11	1	4	2	0	6
18 ns	5	8	8	12	13	5	4	4	1	6
19 ns	5	8	8	10	13	3	3	2	0	4
20 ns	7	10	6	8	14	3	2	2	1	4
21 ns	6	10	8	11	11	4	3	4	0	5
22 ns	5	6	7	10	11	3	4	3	3	5
23 ns	5	11	8	9	9	2	3	4	2	6
24 ns	5	6	7	8	10	2	3	5	2	5
25 ns	8	10	10	11	9	4	4	3	2	4
gemittelt	6	8	8	10	11	3	3	3	1	5
Anzahl der Residuen	21	33	26	39	39	21	23	20	19	21
pro helix [%]	28,75	24,94	29,14	25,44	28,80	12,82	12,37	15,77	5,67	23,44

**Tabelle 18:** Konformeränderungen zu verschiedenen Simulationszeiten des E1-Zustandes inklusive *stalk*-Bereich (pdb-Datei 1SU4). **gemittelt:** Anzahl der Konformeränderungen pro Transmembranhelix gemittelt über die gesamte Simulationszeit (25 ns). **pro Helix:** prozentuale Konformeränderungen bezogen auf die jeweilige Transmembranhelix.

Im Gegensatz zum E2-Zustand zeigen im E1-Zustand mehrere Helices eine ähnliche Änderung der Konformere aufgrund eines elektrischen Feldes. In diesem Zustand sind die meisten Änderungen auf den Transmembranhelices zu finden, die auch mit den *stalk*-Bereich verbunden sind (Helix M2, M3, M4 und M5). Weiterhin reagiert, wie im E2-Zustand auch, die Helix M1 mit vielen Änderungen auf ein elektrisches Feld. Auch die Helix M10, die an der Oberfläche des Protein liegt und somit auch stärker zum Solvens hin exponiert ist, zeigt ähnlich viele Konformeränderungen. Auf jeder der genannten Transmembranhelices liegen ca. 25 % Konformeränderungen vor. Zur genaueren Analyse der Konformeränderungen wurden diese nach Ionisierungs- und Rotameränderungen unterschieden.



**Abb. 42:** Lokalisation der Helices mit den meisten Konformeränderungen in der Calcium-gebunden E1-Struktur. Die Helix M1 ist grün, die Helix M3 ist blau, die Helix M4 ist pink, die Helices M5 ist rot und die Helix M10 ist türkis markiert. **Rechts:** Zur besseren Übersicht sind nur die Transmembranhelices abgebildet. Die Konformeränderungen sind für die Helix M3 blau und die Helix M5 rot markiert. Alle anderen Konformeränderungen sind schwarz dargestellt.

Auf der Helix M3 und M5 liegen die meisten Rotameränderungen und je zwei bis drei Ionisierungsänderungen vor. Dieses Unterscheidungsmerkmal lässt, wie im E2-Zustand auch, wieder den Schluss zu, dass vor allem die Helices M3 und M5 auf ein elektrisches Feld reagieren. Die Änderungen auf der Helix M5 unterscheiden sich prozentual nur wenig von denen der Helix M1 und M10. Im Gegensatz zu diesen beiden Helices weist die Helix M5 aber nur einen geringen SAS-Wert auf. Dieser ist auf der Helix M5 im Vergleich zu den beiden anderen um die Hälfte bzw. zwei Drittel kleiner. Obwohl die Helix M5 somit wesentlich weniger mit dem Solvens in Kontakt steht, weist sie trotzdem eine gleich hohe Anzahl von Konformeränderungen auf. Die Helix M5 hebt sich somit deutlich von den anderen beiden Helices M1 und M10 ab.

### 5.1.10 Vergleich der simulierten $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen-Zustände E1 und E2

Die auf der Helix M5+S5 durch Simulation nachgewiesenen Konformeränderungen reichen von 8 bis 14 Änderungen für den E1-Zustand und von 7 bis 14 für den E2-Zustand. Für die anderen Transmembranhelices sind die Konformeränderungen in ihrer zeitlichen Entwicklung weitestgehend konstant. Die Zahl der Konformeränderungen für die Helix M1 variiert zwischen 5 und 8 und für die Helix M10 zwischen 4 und 6. Nur für die Helix M3 und M5 verändert sich die Anzahl der Konformeränderungen stark mit der Zeit, und zwar von 5 bis 11 Änderungen auf der Helix M3 und von 8 bis 14 auf der Helix M5.



**Abb. 43:** Vergleich der Konformeränderungen der beiden Enzymzustände E1 und E2 (pdb-Dateien: 1SU4 und 2AGV). Zum Vergleich wurden die gemittelten Konformeränderungen über die gesamte MD-Simulationszeit beider Enzymzustände gewählt.

Das Verhalten der einzelnen Transmembranhelices unter Einwirkung eines elektrischen Feldes ist zwischen den beiden Enzymhauptzuständen nicht gleich. Auffällig ist, dass die Anzahl der Konformeränderungen der jeweiligen Transmembranhelix über die Zeit im Enzymzustand E2 sich nicht so stark verändert wie die Anzahl der Konformeränderungen im E1-Zustand (Tabelle 16 und Tabelle 18). Die konformelle Veränderung des cytoplasmatischen Bereiches der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen ist bei der MD-Simulation der E1-Struktur wesentlich stärker als im E2-Zustand, da sich bei der Simulation des E1-Zustandes die beiden cytoplasmatischen Domänen (N- und P-Domäne), die weit auseinander liegen, näher kommen. Im E2-Zustand liegt dieser cytoplasmatische Bereich schon kompakt vor. Auch wenn bei der Untersuchung der Transmembranhelices diese Bewegung des cytoplasmatischen Bereiches nicht so einen großen Einfluss auf die Transmembranhelices nehmen sollte, muss doch



berücksichtigt werden, dass die Bewegung des cytoplasmatischen Bereiches über den *stalk*-Bereich Einfluss auf die Orientierung der Transmembranhelices ausübt. Dieser Einfluss ist bei der MD-Simulation des E2-Zustandes weniger gegeben (siehe Kapitel 5.1.8).

Des Weiteren findet die Energietransduktion während des Überganges aus dem E1- in den E2- Zustand statt. Somit befindet sich die Simulation des E1-Zustandes zeitlich näher an dem Prozess der Energieübertragung als die Simulation des E2-Zustandes.

Obwohl die Konformeränderungen mit der Zeit variieren, lässt sich keine eindeutige Ab- oder Zunahme der Konformeränderungen innerhalb von 25 ns feststellen (Tabelle 15, Tabelle 16, Tabelle 17 und Tabelle 18). Berücksichtigt werden muss dabei, dass die 25 ns Simulationszeit nicht den kompletten Reaktionszyklus abdecken und somit eine eindeutige Ab- oder Zunahme der Konformeränderungen über diese Zeitspanne nicht nachzuweisen ist. Allein für den E2-Zustand lassen die Simulationsergebnisse die Feststellung zu, dass die Konformeränderungen auf der Helix M5+S5 mit der Zeit abnehmen. Bis zu 10 ns ergeben sich gemittelt ca. 12 Konformeränderungen, nach 10 ns nehmen diese auf ca. 9 ab (siehe Tabelle 16).

### 5.1.11 Kombination von MD-Simulationen und MCCE an der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase

Von der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase liegen nur wenige hochaufgelöste Strukturen vor. Es sind nur Strukturdaten für den E2-P-Zustand und nicht für weitere Enzymzustände vorhanden. Daher sollten die Elektrostatik-Rechnungen am E2-P-Zustand noch durch MD-Simulationen ergänzt werden. Die MD-Simulationen ermöglichen es, verschiedene Zustände des Rückgrates wie auch der Seitenketten in die Elektrostatik-Rechnungen einzubeziehen. Das Ziel der um MD-Simulationen erweiterten Rechnungen war es, zu ermitteln, welchen Einfluss die Flexibilität des Rückgrates auf die Ergebnisse der Elektrostatik-Rechnungen zur Energietransduktion ausübt. Des Weiteren konnte auch hier das angelegte elektrische Feld durch die Hinzunahme der Strukturen aus MD-Simulationen reduziert werden.

Als erster Schritt zur MD-Simulation wurde die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in eine POPC-Membran eingebracht und die Energie des Protein-Membran-Komplexes wurde minimiert. Der Freiraum, der durch das Einfügen des Proteins in das Membranmodell entsteht, wurde geschlossen, sodass die Membran direkt am Protein anliegt. Zum Erzeugen und Einbringen der Membran wurde das Programm VMD benutzt (Humphrey et al. 1996). Für die MD-Simulationen wurde das Programmpaket NAMD verwendet (Phillips et al. 2005). Für die Simulationen wurde der Protein-Membran-Komplex mit einer expliziten Wasserbox umgeben und für die Simulationszeit wurden drei Nanosekunden gewählt. Die Laufzeit der MD-Simulation wurde auf die ersten drei Nanosekunden beschränkt, da eine Simulation des kompletten Enzymzyklus außerhalb der zeitlichen Möglichkeiten von MD-Simulationen liegt.

Um die konformelle Dynamik des Protein-Membran-Komplexes in den Elektrostatik-Rechnungen zu nutzen, wurden alle 125 ps Schnappschüsse des gesamten Simulationssystems zu verschiedenen Simulationszeiten extrahiert und so aufbereitet, dass die Strukturdaten in das MCCE-Programm eingelesen werden konnten. Dazu wurde die explizite Wasserbox um den Protein-Membran-Komplex wieder entfernt. Die Modellmembran wurde für die Elektrostatik-Rechnungen beibehalten. Um das Anlegen eines elektrischen Feldes zu simulieren, wurde der molekulare Kondensator in das System eingefügt (siehe Kapitel 5.1.1). Die Änderungen der Konformere wurden, wie in Kapitel 5.1.2 beschrieben, berechnet, ausgewertet und sind in der Tabelle 19 und in der Tabelle 20 dargestellt.

Schnappschuss zur Zeit	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10
125 ps	2	9	1	3	2	6	2	8	1	4
250 ps	1	5	1	3	4	6	4	7	1	5
375 ps	1	8	1	4	4	8	1	6	2	5
500 ps	1	5	1	4	2	6	2	6	3	5
750 ps	1	5	0	4	4	7	2	7	1	5
1 ns	3	5	1	3	3	6	2	6	2	5
1,25 ns	1	5	2	5	3	7	2	8	3	5
1,5 ns	1	5	1	4	2	7	2	7	1	4
2 ns	3	6	1	3	4	5	1	5	1	4
2,25 ns	2	3	0	2	2	7	2	6	0	5
2,5 ns	1	4	0	3	2	7	0	5	2	3
gemittelt	2	6	1	3	3	7	2	6	2	5
Anzahl der Residuen	21	21	20	18	20	21	23	20	19	21
pro Helix [%]	7,4	26	4,1	20,2	14,5	31,2	7,9	32,3	8,1	27,9

**Tabelle 19:** Konformeränderungen der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (pdb-Datei 3B8E) zu verschiedenen Simulationszeiten. **gemittelt:** Anzahl der Konformeränderungen pro Transmembranhelix gemittelt über die gesamte Simulationszeit (3 ns). **pro Helix:** Die Zahl der Konformeränderungen in Prozent bezogen auf die jeweilige Transmembranhelix.

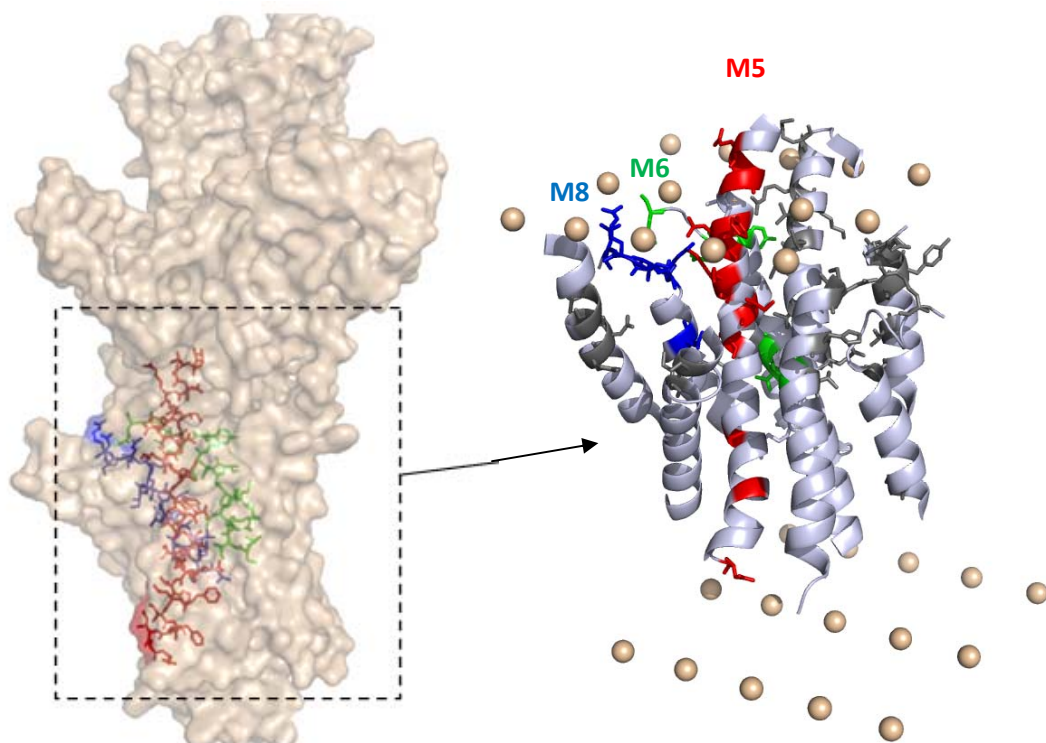
Schnappschuss zur Zeit	M1	M2+S2	M3+S3	M4+S4	M5+S5	M6	M7	M8	M9	M10
125 ps	2	10	5	8	11	6	2	8	1	4
250 ps	1	5	3	8	13	6	4	7	1	5
375 ps	1	10	3	10	11	8	1	6	2	5
500 ps	1	7	4	12	12	6	2	6	3	5
750 ps	1	6	2	8	11	7	2	7	1	5
1 ns	3	7	4	8	12	6	2	6	2	5
1,25 ns	1	6	5	9	13	7	2	8	3	5
1,5 ns	1	6	5	9	10	7	2	7	1	4
2 ns	3	8	4	7	12	5	1	5	1	4
2,25 ns	2	3	3	6	11	7	2	6	0	5
2,5 ns	1	4	4	7	10	7	0	5	2	3
gemittelt	2	7	4	8	12	7	2	6	2	5
Anzahl der Residuen	21	33	26	39	39	21	23	20	19	21
pro Helix [%]	7,4	19,8	14,7	21,5	29,4	31,2	7,9	32,3	8,1	21,7

**Tabelle 20:** Konformeränderungen der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase inklusive *stalk*-Bereich zu verschiedenen Simulationszeiten (pdb-Datei 3B8E). **gemittelt:** Anzahl der Konformeränderungen pro Transmembranhelix gemittelt über die gesamte Simulationszeit (3 ns). **pro Helix:** Die Zahl der Konformeränderungen in Prozent bezogen auf die jeweilige Transmembranhelix.

In Tabelle 19 und Tabelle 20 sind in der ersten Spalte die Zeiten aufgetragen, zur denen ein Schnappschuss aus der MD-Trajektorie extrahiert wurde. Für diese Momentaufnahme des Proteins wurden dann die Konformeränderungen aufgrund des angelegten elektrischen Feldes für die einzelnen Transmembranhelices M1 - M10 ausgewertet. In der vorletzten Zeile ist die Anzahl der Konformeränderungen pro Transmembranhelix, gemittelt über die gesamte Simulationszeit,

angegeben. Die letzte Zeile enthält die prozentualen Konformeränderungen bezogen auf die jeweilige Transmembranhelix.

In beiden Tabellen betragen die prozentualen Konformeränderungen für die Transmembranhelices M2, M4, M5, M6, M8 und M10 20 % und mehr. Dabei ändern die Helices M5, M6 und M8 ca. ein Drittel ihrer Konformere. Deutlich zu erkennen ist, dass bei der gewählten Simulationszeit die Anzahl der Konformeränderungen zwischen den verschiedenen Simulationszeiten wenig oder gar nicht variiert. Das bedeutet, dass die Konformeränderungen auf den Helices M5, M6 und M8 annähernd konstant sind. Vergleicht man die Konformeränderungen auf der Transmembranhelix M5 ohne und mit dem *stalk*-Bereich, so ist ein deutlicher Anstieg der Konformeränderungen auf dem *stalk*-Bereich erkennbar. Liegen ohne den *stalk*-Bereich fünf Konformeränderungen vor, so erhöht sich die Zahl der Konformeränderungen auf mehr als das doppelte inklusive des *stalk*-Bereichs. Dies ist ein wichtiger Hinweis auf eine funktionelle Rolle des *stalk*-Bereichs in der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. Analysiert man die Lokalisation dieser Konformeränderungen, wird auch bei dieser Simulation deutlich, dass die Änderungen nur auf der Helix M5+S5 über die komplette Helix verteilt sind. Sie sind weder an bestimmten Stellen der Helix lokalisiert noch befinden sie sich nahe an den Kondensatorplatten wie es bei den Helices M2+S2, M4+S4 und M10 der Fall ist (Abb. 44).



**Abb. 44:** Lokalisation der Helices mit den meisten Konformeränderungen in der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (linke Seite). Die Helix M5 ist rot, die Helix M6 grün und die Helix M8 blau markiert. Auf der rechten Seite sind zur besseren Übersicht nur die Transmembranhelices abgebildet. Die Konformeränderungen sind für die Helix M5 rot, die Helix M6 grün und die Helix M8 blau markiert. Alle anderen Konformeränderungen sind schwarz dargestellt. Der modellierte Kondensator zur Erzeugung des elektrischen Feldes ist ebenfalls abgebildet.

Auch diese Beobachtung spricht wieder für eine Beteiligung dieser Helix an der Energietransduktion bzw. für eine selektive Aktivierung der Helix M5+S5 während der Energietransduktion, die bereits aufgrund experimenteller Daten vermutet wurde.

Vergleicht man die berechneten Konformeränderungen der Elektrostatik-Rechnungen an der Kristallstruktur mit den gemittelten Konformeränderungen der Elektrostatik-Rechnungen an MD-Schnappschüssen, ergibt sich folgende Tabelle.

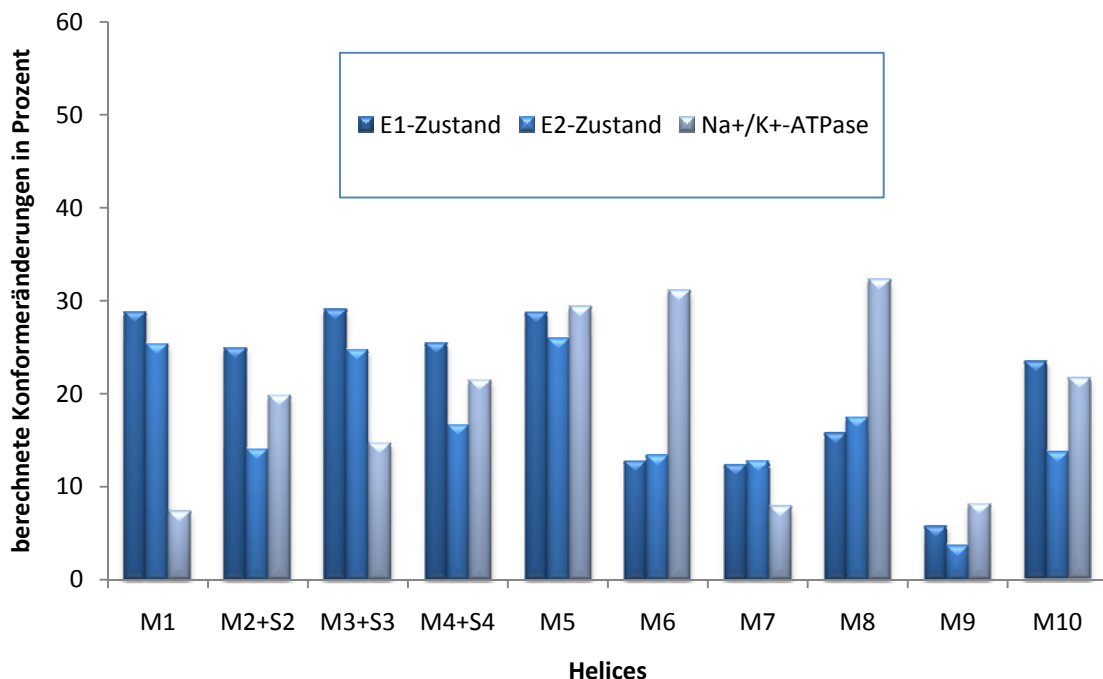
Konformeränderungen	M1	M2+S2	M3+S3	M4+S4	M5+S5	M6	M7	M8	M9	M10
<b>Kristallstruktur</b>	5	5	4	5	17	8	2	8	3	5
<b>MD-Simulation</b>	2	7	4	8	11	7	2	6	2	5

**Tabelle 21:** Konformeränderungsvergleich zwischen der Kristallstruktur und den gemittelten MD-Schnappschüssen. Verglichen werden die Konformeränderungen aus den Elektrostatik-Rechnungen an der Kristallstruktur aus Tabelle 13 mit den über die gesamte Simulationszeit gemittelten Konformeränderungen aus Tabelle 20.

Auch gegenüber der Ausgangsstruktur der MD-Simulation ändert sich die Anzahl der Konformeränderungen für die meisten Transmembranhelices nur minimal (Tabelle 21). Besonders deutlich ist ein Unterschied auf der Transmembranhelix M5+S5 erkennbar. Vergleicht man die Rotamer- und Ionisierungsänderungen dieser Transmembranhelix, so ist festzustellen, dass die Ionisierungsänderungen für beide Elektrostatik-Rechnungen gleich bleiben, jedoch die Rotameränderungen abnehmen. Da zwischen den Elektrostatik-Rechnungen an der Kristallstruktur und den Elektrostatik-Rechnungen an den MD-Schnappschüssen die elektrische Feldstärke deutlich reduziert wurde (ca. eine Größenordnung), kann dieser Unterschied auf die unterschiedlichen elektrischen Feldstärken zurückgeführt werden. Gut zu erkennen ist, dass trotz der Reduktion des elektrischen Feldes, die Transmembranhelix M5+S5 weiterhin die meisten Konformeränderungen aufgrund eines elektrischen Feldes aufweist. Auch ist zu erwähnen, dass, obwohl das elektrische Feld reduziert wurde, eine fast identische Verteilung der Konformeränderungen reproduziert werden konnte.

### 5.1.12 Zusammenfassung der Energietransduktion in P-Typ-ATPasen

Das Ziel der Simulationen war es, an zwei prominenten Vertretern der P-Typ-ATPasen ( $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase und  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase) den Mechanismus der Energietransduktion in P-Typ-ATPasen computergestützt zu untersuchen. Das Zielsetzung dieser Simulationen war es, die Helices zu identifizieren, die an der Energietransduktion zwischen der cytoplasmatischen Phosphorylierungsstelle Asp 351 und den Bindungsstellen im Transmembranbereich beteiligt sind. Entsprechend dem Simulationsansatz dieser Arbeit wurde ein Computermodell eines Kondensators auf molekularer Ebene eingeführt. Dieser simulierte molekulare Kondensator sollte den Einfluss eines elektrischen Feldes auf P-Typ-ATPasen simulieren und die dadurch induzierten Konformeränderungen ausgewertet werden. Bei der Auswertung von Simulationsergebnissen sind stets die für die verwendete Methode typischen Einschränkungen zu beachten. Im Falle der eingesetzten Elektrostatik-Rechnungen ist dies das starre Proteinrückgrat. Trotz dieser Einschränkung konnte qualitativ ein stärkeres Ansprechen auf ein elektrisches Feld von einzelnen Transmembranhelices gegenüber anderen Transmembranhelices gezeigt werden. Das selektive Ansprechen spezifischer Transmembranhelices konnte durch die Berücksichtigung des *stalk*-Bereichs noch deutlicher hervorgehoben werden.



**Abb. 45:** Prozentualer Vergleich der Konformeränderungen der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase und der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (pdb-Datei: E1-Zustand: 1SU4, E2-Zustand: 2AGV,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase: 3B9B). Zum Vergleich wurden die gemittelten Konformeränderungen über die MD-Simulationszeit der Proteine gewählt.

Dabei zeigte sich, dass besonders die Helix M5+S5 selektiv durch ein elektrisches Feld angeregt werden kann (Abb. 45). Diese ist die einzige Transmembranhelix, die in allen simulierten

Enzymzuständen der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, für den E2-P-Zustand der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase und für verschiedene Strukturmodelle der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase eine gleich hohe Anzahl von Konformeränderungen aufweist.

Die Transmembranhelix M8 könnte ebenfalls an der Energietransduktion beteiligt sein. Vor allem in der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase konnten viele Konformationsänderungen der Transmembranhelix M8 aufgrund eines elektrischen Feldes festgestellt werden. Vergleicht man die Transmembranhelix M6 in der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase mit der in der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, so wird deutlich, dass in der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase die Helix M6 deutlich mehr Konformeränderungen aufweist als in der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. Dies steht in Übereinstimmung mit den Experimenten von Geibel. Bei diesen Experimenten wurde die Schleife zwischen den beiden Transmembranhelices M5 und M6 in der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase markiert und Aussagen über die Energietransduktion getroffen.

Weiterhin war es möglich, eine spannungsunabhängige Mutation (N776D) der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase zu simulieren. Ebenso wie bei den Experimenten konnte auch bei den Simulationen gezeigt werden, dass diese Mutante der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase ihre Spannungsabhängigkeit verliert. Somit stimmten die Resultate der Simulationen mit den Experimenten überein.

Zur Reduzierung der anzulegenden elektrischen Feldstärke wurden Elektrostatik-Rechnungen an Schnappschüssen aus MD-Simulationen der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase und der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase durchgeführt. Mit diesen ließ sich die elektrische Feldstärke um eine Größenordnung reduzieren, wobei die Ergebnisse der Elektrostatik-Rechnungen reproduziert werden konnten.

Ebenso konnte gezeigt werden, dass eindeutige selektive Ergebnisse durch die Elektrostatik-Rechnungen erhalten werden konnten. Im Vergleich zu anderen Simulationsmethoden, wie z.B. die MD-Simulationen, konnten diese Ergebnisse bei einem wesentlich geringeren Rechenaufwand und geringeren Computerressourcen durchgeführt werden.

Diese Simulationsergebnisse bestätigen die bisherigen Vermutungen und experimentellen Untersuchungen zur Energietransduktion in P-Typ-ATPasen. Es konnte gezeigt werden, dass die Helix M5+S5 bei allen Simulationen ein stärkeres Ansprechen auf ein elektrisches Feld gegenüber den anderen Transmembranhelices aufweist. Die besondere Funktion, die der Helix offensichtlich zukommt, erklärt deren hochkonservierte Sequenzabfolge (Sweadner und Donnet 2001). Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Helix M5+S5 als wichtiges Energietransduktionselement während des Transports von Ionen in P-Typ-ATPasen fungiert.

## 5.2 Protonentransportweg in der $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase

Der Transport von Calciumionen aus dem Cytoplasma in das Lumen ist an einen Gegentransport von Protonen gekoppelt. Dieser Gegentransport ist experimentell bestätigt (siehe Kapitel 3.5). Ungeklärt ist allerdings noch der Protonentransportweg durch die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. Ein Ziel dieser Arbeit ist es daher, mit Elektrostatik-Rechnungen den Transport von Protonen durch die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase theoretisch zu untersuchen. Es wird vermutet, dass die Protonen entlang von Aminosäuren und vor allem durch Wassermoleküle innerhalb des Transmembranbereiches der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase transportiert werden. Wie auch schon in anderen Arbeiten gezeigt werden konnte, sind Wassernetzwerke wichtig beim Transport von Protonen (Karjalainen et al. 2007, Buch-Pedersen et al. 2009, Gu und Helms 2009). In der vorliegenden Arbeit sollten daher die Protonierungszustände von intramolekularen Wassermolekülen untersucht werden. Da aber in den meisten Kristallstrukturen keine Wassermoleküle vorhanden sind, mussten diese zuerst mittels des Programms Dowser in den Transmembranbereich der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase eingefügt werden (siehe Kapitel 5.2.1). Der Protonentransport erstreckt sich über mehrere Enzymzustände des Reaktionszyklus und ist somit an konformelle Änderungen der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase gebunden. Aus diesem Grund wurden explizite Wassermoleküle in die Strukturdaten der Enzymzustände E1, E1P, E2P, E2-P und E2 eingefügt, sodass auch konformelle Änderungen des Proteins während des Reaktionszyklus erfasst werden können. Dadurch ist es möglich, evtl. Protonierungen von Wassermolekülen entlang des kompletten Reaktionszyklus festzustellen. Um einen möglichen Protonentransportweg zu identifizieren, wurden die pK-Werte bzw. die unterschiedlichen Protonierungszustände sowohl der eingefügten Wassermoleküle als auch der Aminosäuren berechnet.

Zur Untersuchung des Protonentransportweges durch die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase wurden auch mehrere Elektrostatik-Rechnungen am selben Enzymzustand durchgeführt. In der ersten Rechnung wurden die Wassermoleküle identifiziert, die protoniert in diesem Enzymzustand vorliegen. In einer weiteren Elektrostatik-Rechnung wurden diese berechneten Ionisierungen festgesetzt und die Auswirkung auf den Protonierungszustand weiterer umgebender Wassermoleküle und Aminosäuren untersucht. Dieses Vorgehen basiert auf der Annahme, dass Protonen von Wassermolekül zu Wassermolekül weitergegeben werden können. Das Festsetzen von Protonierungen lässt sich folgendermaßen realisieren. Die Besetzungswahrscheinlichkeit des protonierten Zustands im Monte-Carlo-Sampling wird auf eins gesetzt, d.h. die Protonierungszustände der ausgewählten Wassermoleküle werden nicht berechnet, sondern als vorgegeben behandelt. Diese Herangehensweise sollte Aufschluss geben, ob sich die Protonierung eines Wassermoleküls auf ein weiteres übertragen lässt bzw. ob der Einfluss der Protonierung auf andere Wassermoleküle mit der angewandten Methode untersucht werden kann.



Weiterhin sollte der Einfluss der Calciumbindestelle auf die Protonierungen der Wassermoleküle innerhalb der Bindestelle bzw. auf den Transport der Protonen untersucht werden. Dazu wurden ebenfalls wieder mehrere Elektrostatik-Rechnungen am selben Enzymzustand durchgeführt. In der ersten Rechnung wurden wieder die Protonierungen der Wassermoleküle innerhalb der Calciumbindestelle identifiziert. In weiteren Elektrostatik-Rechnungen wurden diese ausgewählten Wassermoleküle als neutral festgesetzt, indem die Besetzungswahrscheinlichkeit des unprotonierten Zustandes auf eins gesetzt wurde. Dadurch wird im MC-Sampling verhindert, dass diese Wassermoleküle protoniert werden. Durch dieses Vorgehen lässt sich feststellen, ob weitere Protonierungen induziert und so Rückschlüsse auf die elektrostatischen Eigenschaften der Calciumbindestelle gezogen werden können. Dadurch lässt sich untersuchen, ob die strukturelle Konformation der Aminosäureseitenketten der Calciumbindestelle eine Protonierung von Wassermolekülen begünstigt.

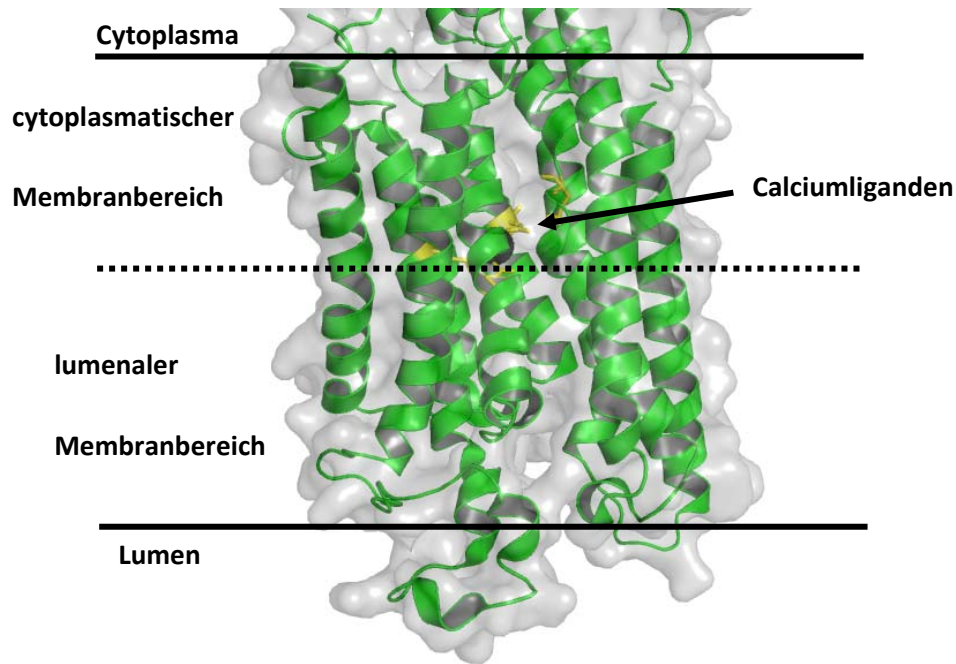
In weiteren Untersuchungen wurden nicht nur die Wassermoleküle innerhalb des Transmembranbereiches erfasst, sondern auch die Wassermoleküle an der Oberfläche des Proteins. Da die Protonen vom Lumen ins Cytoplasma transportiert werden sollen, ist es sehr wahrscheinlich, dass sich am Calciumkanal, der sich zum Lumen hin öffnet, Protonen ansammeln. Diese können dann während des E1P-Zustandes in den Calciumkanal eintreten und durch das Protein transportiert werden. Die Wassermoleküle, die sich auf der Oberfläche der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase befinden, wurden mittels VMD eingefügt.

So wie die Wassermoleküle außerhalb des Transmembranbereiches entscheidend für den Protonentransport sein können, so können die bisher nicht berücksichtigten Calciumionen ebenfalls den Protonengegentransport beeinflussen. Aus diesem Grund wurden auch Elektrostatik-Rechnungen mit Calciumionen durchgeführt. Durch die Berücksichtigung in bzw. der Entfernung der Calciumionen aus den Enzymzuständen, in denen Calciumionen gebunden sind, lassen sich weitere transiente Enzymzustände erzeugen. Durch die Simulation dieser Zustände lässt sich der dynamische Prozess des Protonentransportes mit statischen Strukturen annähern. Die Bindung der Calciumionen findet sequentiell statt, deshalb wurden die Calciumionen schrittweise in die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase eingebracht. Um dies zu realisieren, wurde entweder ein Calciumion in die 1. oder die 2. Bindestelle eingefügt oder es wurden beide Calciumionen in die Bindestellen eingefügt. Dieses Vorgehen wurde auf die Calcium-gebundenen Enzymzustände E1 und E1P mit den pdb-Daten 1T5T, 2ZBD und 1SU4 angewendet. Für die Elektrostatik-Rechnungen wurde daher zuerst jeweils ein Calciumion in eine der beiden Calciumbindestellen eingefügt und als letzter Schritt wurden dann beide Calciumionen in den Calciumbindestellen berücksichtigt. Dieses Vorgehen wurde gewählt, um so auch den Einfluss der sequentiellen Bindung der Calciumionen in den Calciumbindestellen zu berücksichtigen und um die

daraus folgenden Unterschiede in der Protonierung der Wassermoleküle feststellen zu können. Für die Simulationen wurden die Calciumliganden während des MC-Samplings festgesetzt, d.h. das Kristallrotamer (jenes Rotamer, das durch die Kristallstruktur vorgegeben ist) wurde auf den Wert eins gesetzt. Diese Fixierung des Kristallrotamers ist deshalb erforderlich, weil die Entfernung zwischen den Calciumionen und den Liganden so gering ist, dass sich bei einer Energieberechnung die Liganden vom Calciumion wegdrehen würden. Da es sich bei der Elektrostatik-Methode um eine klassische und nicht um eine quantenmechanische Methode handelt, können die berechneten Wechselwirkungsenergien bei so kurzen Abständen nicht korrekt wiedergegeben werden. Da dieses Wegdrehen physiologisch aber nicht erfolgt, ist die Fixierung der Liganden dringend notwendig. Allerdings wurde der Ionisierungszustand dieser Liganden nicht festgesetzt, sodass eine Protonierung bzw. eine Deprotonierung dieser Calciumliganden weiterhin möglich ist. Auch bei den Simulationen, in denen nur ein Calciumion eingefügt wurde, wurden alle vier Liganden festgehalten.

Bei der Auswertung der Daten wurde auch die Besetzungswahrscheinlichkeit für eine pH-Titration aus dem neutralen Zustand ( $\text{H}_2\text{O}$ ) in den protonierten Zustand ( $\text{H}_3\text{O}^+$ ) berechnet. Dabei wurden für die Auswertung alle Protonierungsmöglichkeiten berücksichtigt. Zur genaueren Untersuchung wurden dann die Wassermoleküle identifiziert, die bei einem pH-Wert von 7 protoniert vorliegen.

Abb. 46 dient zur Veranschaulichung der in den folgenden Kapiteln betrachteten Bereiche innerhalb des Transmembranbereiches. Es ist der Transmembranbereich der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase dargestellt. Der cytoplasmatische Teil der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase ist nach oben gerichtet. Der Übersichtlichkeit wegen ist dieser Teil allerdings nicht abgebildet, da er nicht am Protonentransport beteiligt ist. Die Calciumliganden befinden sich etwa in der Mitte des Transmembranbereiches. In den folgenden Kapiteln werden die Wassermoleküle, die sich oberhalb der Calciumliganden befinden, dem cytoplasmatischen Membranbereich und die Wassermoleküle, welche sich unterhalb der Calciumliganden befinden, dem lumenalen Membranbereich zugeordnet.



**Abb. 46:** Übersicht und Bezeichnungen des Transmembranbereiches der Ca<sup>2+</sup>-ATPase. Die Transmembranhelices sind grün und die Calciumliganden gelb dargestellt.

Im Folgenden werden die festgestellten Protonierungen der einzelnen Enzymzustände besprochen. Anhand der berechneten Protonierungen der explizit eingefügten Wassermoleküle in die verschiedenen Enzymzustände der Ca<sup>2+</sup>-ATPase und der Lokalisierung dieser Moleküle innerhalb und außerhalb des Transmembranbereiches sollen dann Aussagen über einen Protonentransportweg getroffen werden, auf deren Basis ein Protonentransportmechanismus postuliert werden kann.

### 5.2.1 Einfügen der Wassermoleküle mit dem Programm Dowser

Viele Proteine enthalten in ihrem Inneren Kavitäten, die mit Wassermolekülen gefüllt sein können. Diese Wassermoleküle können wesentliche Aufgaben im Protein übernehmen oder sehr wichtig für die Stabilität des Proteins sein. Sollen diese Wassermoleküle in den Kavitäten bei Elektrostatik-Simulationen nicht nur durch ein Kontinuum beschrieben, sondern explizit in die Kavitäten eingefügt werden, so ist ein Programm erforderlich, welches diese expliziten Wassermoleküle in die Kavitäten einfügt.

Das Programm Dowser erfüllt diese Anforderungen (Zhang und Hermans 1996). Es bestimmt die Hohlräume in Proteinen und platziert dann in diese explizite Wassermoleküle. Dazu wird als erstes die solvenszugängliche Oberfläche des Proteins mit einer Testkugel berechnet und somit die Oberfläche der Kavitäten bestimmt. Dies geschieht mittels des implementierten MS-Programms (Connolly 1983). Danach wird die Energie der Wassermoleküle an verschiedenen Positionen und mit verschiedener Orientierung in jedem Hohlraum mittels eines Kraftfeldes berechnet (Hermans et al. 1984). Diese Wassermoleküle mit den zugehörigen Energien werden in einer Liste ausgegeben. Ausgehend von dieser Liste wird dann für jede Position auf der inneren Oberfläche ein Wassermolekül mit minimaler Energie gesetzt. Überschneiden sich die Positionen von zwei Wassermolekülen, so wird nur das Molekül beibehalten, das die geringere Energie besitzt. Ebenso werden die Wassermoleküle nur dann gesetzt, wenn die Wechselwirkungsenergie kleiner als -10 kcal/mol ist.

### 5.2.2 Bestimmung der Simulationsparameter

Zur Berechnung der Protonierung von explizit eingefügten Wassermolekülen mittels des MCCE-Programms mussten die Programmparameter so gewählt werden, dass die berechneten pK-Werte eine möglichst geringe Abweichung von den experimentellen pK-Werten aufweisen. Deshalb wurden Testproteine ausgewählt, für die sowohl experimentelle pK-Werte als auch Kristallstrukturen vorliegen (Kieseritzky und Knapp 2008). An diesen wurden dann Testrechnungen zur Prüfung der Übereinstimmung von berechneten pK-Werten mit den experimentell bestimmten Werten durchgeführt. In der folgenden Tabelle sind die mittleren Abweichungen der berechneten von den experimentellen pK-Werten für acht Testproteine aufgeführt. Für diese Auswahl an Proteinen wurden 108 pK-Werte berechnet, zu denen auch ein experimenteller pK-Wert vorliegt. Die mittlere Abweichung des pK-Wertes des jeweiligen Testproteins ergibt sich durch die Mittelung der einzelnen Abweichungen aller verglichenen pK-Werte je Testprotein. Für die Elektrostatik-Rechnungen wurde das "run.prm.default" verwendet (siehe Anhang A).

Testprotein/ Anzahl der verglichenen pK-Werte	Mittlere Abweichung zwischen berechneten und experimentellen pK-Wert [in pK-Einheiten]
Trypsin(4PTI) / 12	0,61
Streptokokken-Protein G (1PGA) / 14	0,39
Calcium-bindendes Protein (3ICB) / 18	0,42
RNAse (3RN3) / 14	0,40
Barnase (1A2P) Kette A / 13	0,84
Barnase (1A2P) Kette B / 13	0,79
Barnase (1A2P) Kette C / 13	0,84
Thioredoxin (1ERT) / 11	0,65

**Tabelle 22:** Ausgewählte Testproteine zur pK-Wert-Bestimmung.

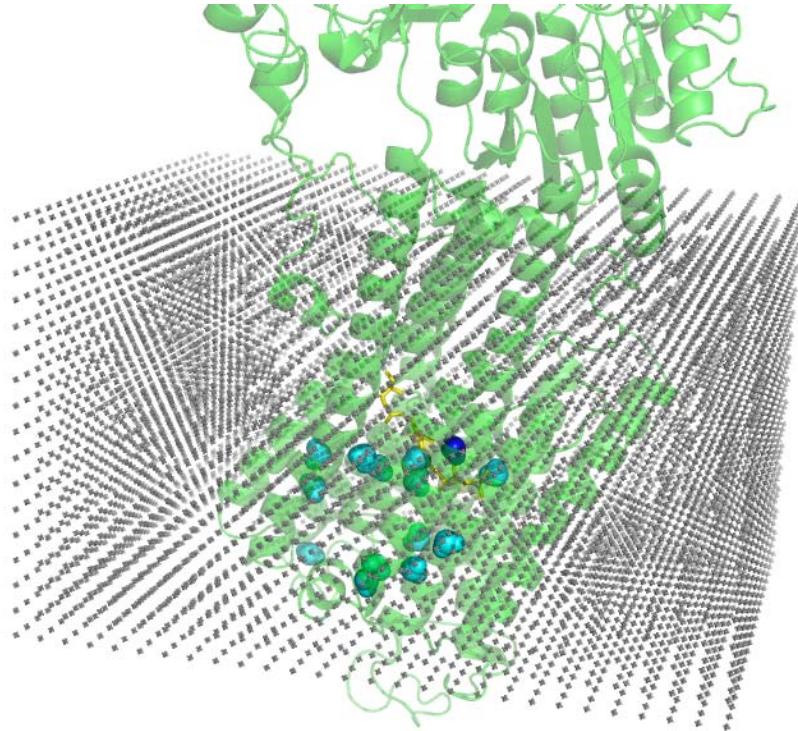
Nach der Auswahl der Programmparameter für MCCE musste als nächstes der Einfluss der Umgebungsparameter auf die Berechnung der pK-Werte bzw. auf die Protonierung der Wassermoleküle geklärt werden. Dazu wurden an verschiedenen Enzymzuständen der Ca<sup>2+</sup>-ATPase unterschiedliche Parameter verändert. Für die Testrechnungen wurden zwei Kristallstrukturen des Enzymzustandes E1P (pdb-Datei: 1T5T und 2ZBD) und eine Kristallstruktur des E2P-Zustandes (pdb-Datei: 3B9B) ausgewählt. An diesen wurden folgende Parameter verändert:

1. Anzahl der eingefügten Wassermoleküle
2. Anzahl der zu erzeugenden Rotamere pro Wassermolekül
3. Einfügen der Ca<sup>2+</sup>-ATPase in eine Membran

Als erstes wurden mittels Dowser 60-70 Wassermoleküle in die verschiedenen Kristallstrukturen eingefügt (siehe Kapitel 5.2.1). Eine Verwendung dieser explizit eingefügten Wassermoleküle in den Simulationen lässt die Anzahl der erzeugten Konformere stark ansteigen. Deshalb wurden nur die Wassermoleküle selektiert, die sich im Transmembranbereich befinden. Diese Reduzierung der Wassermoleküle ist gerechtfertigt, da für den Protonentransport die Wassermoleküle im cytoplasmatischen Bereich des Proteins unerheblich sind. Der Protonentransport findet ausschließlich innerhalb des Transmembranbereiches statt. Dadurch lässt sich die Anzahl der zu berücksichtigenden Wassermoleküle auf 20 - 30 beschränken.

Ebenso wurde die Anzahl der Rotamere variiert. Hier zeigte sich, dass es nicht möglich ist, alle Aminosäuren und alle Wassermoleküle mit sechs Rotameren zu versehen, d.h. jeder rotierbaren Bindung der Aminosäure sechs Rotamere hinzuzufügen. Die Folge wäre eine zu große Anzahl von Konformeren (über 15.000), die eine effiziente Berechnung der Protonierungszustände nicht mehr zulässt. Daher wurden die Rotamere für den Transmembranbereich und für die Wassermoleküle auf drei gesetzt. Die Rotamere für den cytoplasmatischen Bereich des Proteins mussten sogar auf eins reduziert werden, um eine effiziente Berechnung der Protonierungszustände zu gewähren. Selbst diese reduzierte Einstellung der Rotamerzahl erzeugt immer noch eine Konformerzahl von ca. 10000 Rotameren, je nach Anzahl der explizit berücksichtigten Wassermoleküle.

Da es sich bei der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase um ein Membranprotein handelt, wurden ebenso Rechnungen an verschiedenen Enzymzuständen mit einer hinzugefügten Membran durchgeführt. Als Membranmodell konnte allerdings nur ein vereinfachtes Modell eingesetzt werden, welches sich mittels MCCE einfügen lässt (Abb. 47). Dieses Programm erzeugt eine 33 Å dicke Membran, die sich aus ungeladenen Kohlenstoffatomen in einer Reihe zusammensetzt (Song et al. 2003). Eine bessere Modellmembran (DOPC- oder POPC-Membran), wie sie bei den Simulationen zur Energietransduktion verwendet wurde, lässt sich wegen der damit verbundenen massiven Erhöhung der Rechenzeit nicht einsetzen.

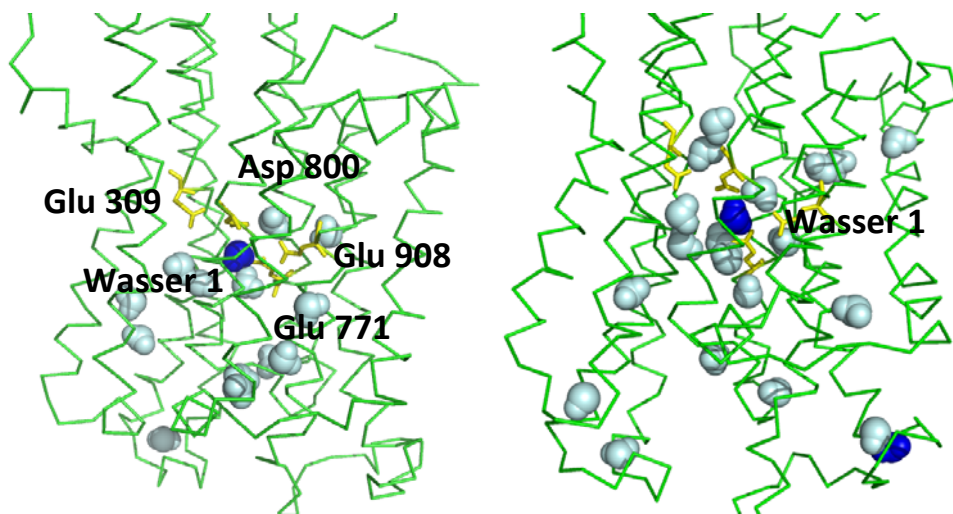


**Abb. 47:** Modellmembran für den Protonengegentransport an der Struktur 1T5T.

Allerdings ist für die Simulation des Protonengegentransports ein verbessertes Membranmodell nicht essentiell, da dieser im Inneren des Transmembranbereiches abläuft. Die eingesetzte Modellmembran sorgt aber dafür, dass sich die äußeren Aminosäuren des Transmembranbereiches in einer Umgebung mit einer niedrigen Dielektrizitätszahl befinden und nicht von Wasser, d.h. von einer hohen Dielektrizitätszahl, umgeben sind. Die Ergebnisse dieser Rechnungen wurden mit den Ergebnissen der Simulationen ohne Membran verglichen. Dabei zeigte sich deutlich, dass die Membran keinen Einfluss auf die Protonierung der Wassermoleküle innerhalb des Transmembranbereiches hat. Aus diesem Grund wurden die Elektrostatik-Rechnungen ohne ein Membranmodell durchgeführt.

### 5.2.3 Protonierungen im E1P-Zustand mit und ohne Calciumionen

Die expliziten Wassermoleküle wurden wie beschrieben (siehe Kapitel 5.2.1) mittels Dowser in zwei Strukturdateien des E1P-Zustandes (pdb-Datei: 1T5T und 2ZBD) eingefügt. Für die Elektrostatik-Rechnungen wurden die im E1P-Zustand vorliegenden Calciumionen aus der Calciumbindestelle entfernt. Aufgrund von unterschiedlichen Orientierungen der verschiedenen Seitenketten im Transmembranbereich unterscheidet sich die Verteilung der explizit eingefügten Wassermoleküle in den beiden Strukturdateien deutlich voneinander.



**Abb. 48:** Protonierungen der expliziten Wassermoleküle im E1P-Zustand ohne Calciumionen. **Links:** pdb-Datei 1T5T. **Rechts:** pdb-Datei 2ZBD. Die Calciumliganden sind gelb, die eingefügten Wassermoleküle hellblau und die protonierten Wassermoleküle dunkelblau markiert.

Für die 1T5T Strukturdatei des E1P-Zustand ohne Calciumionen zeigte sich, dass nur ein Wassermolekül protoniert wird (100 % bei pH 7). Dieses befindet sich zwischen den Calciumliganden Glu 309, Glu 771, Asp 800 und Glu 908 in der Nähe der Liganden Glu 771 (2,8 Å) und Asp 800 (3,5 Å) und ist somit in der 1. Bindestelle lokalisiert (Abb. 48, pdb-Datei: 1T5T, Wasser 1). Dieselbe Elektrostatik-Rechnung zur Protonierung der Wassermoleküle wurde nochmals mit einer erhöhten Anzahl von explizit eingefügten Wassermolekülen durchgeführt. Dabei wurde die Anzahl der verwendeten Wassermoleküle von 14 auf 27 erhöht. Durch das Hinzufügen weiterer Wassermoleküle konnte keine zusätzliche Protonierung nachgewiesen werden. Bei allen Rechnungen an der Strukturdatei 1T5T des E1P Zustandes zeigte sich, dass nur ein einziges Wassermolekül protoniert.

Zusätzliche Simulationen wurden an der Strukturdatei 2ZBD desselben Enzymzustandes durchgeführt, die allerdings im Vergleich zur vorher verwendeten Kristallstruktur (Auflösung 2,9 Å) eine höhere Auflösung von 2,4 Å besitzt (Toyoshima et al. 2004). Auch in dieser Struktur wurden die Calciumionen entfernt. In dieser Struktur ist ebenfalls deutlich zu erkennen, dass das Wassermolekül, welches sich in der 1. Bindestelle befindet, protoniert vorliegt (Abb. 48, pdb-Datei: 2ZBD, Wasser 1).

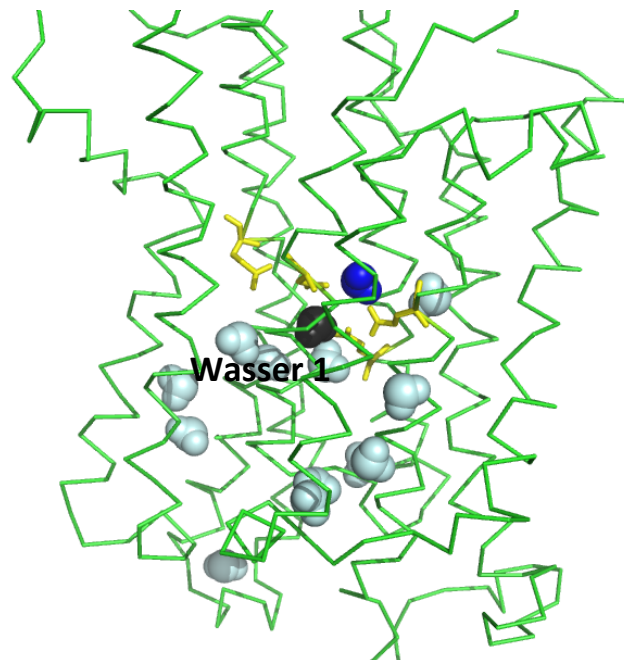


Des Weiteren liegt weit entfernt von den Calciumliganden noch ein Wassermolekül protoniert vor (Abb. 48, pdb-Datei: 2ZBD). Dieses Wassermolekül war bei der Elektrostatik-Rechnung an der pdb-Struktur 1T5T, aufgrund der unterschiedlichen Seitenkettenstrukturen, nicht eingefügt worden. Da dieses Wassermolekül nicht in beide Strukturen eingefügt wird, kann davon ausgegangen werden, dass diese Protonierung nicht am Protonentransport beteiligt ist.

Eine Hinzunahme von Wassermolekülen in die Strukturdatei 2ZBD, welche sich im cytoplasmatischen Membranbereich der Calciumliganden befinden, weist keine weiteren Protonierungen auf. Somit sollten diese Wassermoleküle in diesem Enzymzustand nicht am Protonentransport beteiligt sein.

Die Rechnungen am E1P-Zustand (für die Strukturdateien 1T5T und 2ZBD) lassen den Schluss zu, dass ein Wassermolekül in der 1. Bindestelle am Protonentransport beteiligt ist. Dieses befindet sich in der 1. Calciumbindestelle innerhalb eines Radius von 3 Å um die Liganden Glu 771 und Asp 800.

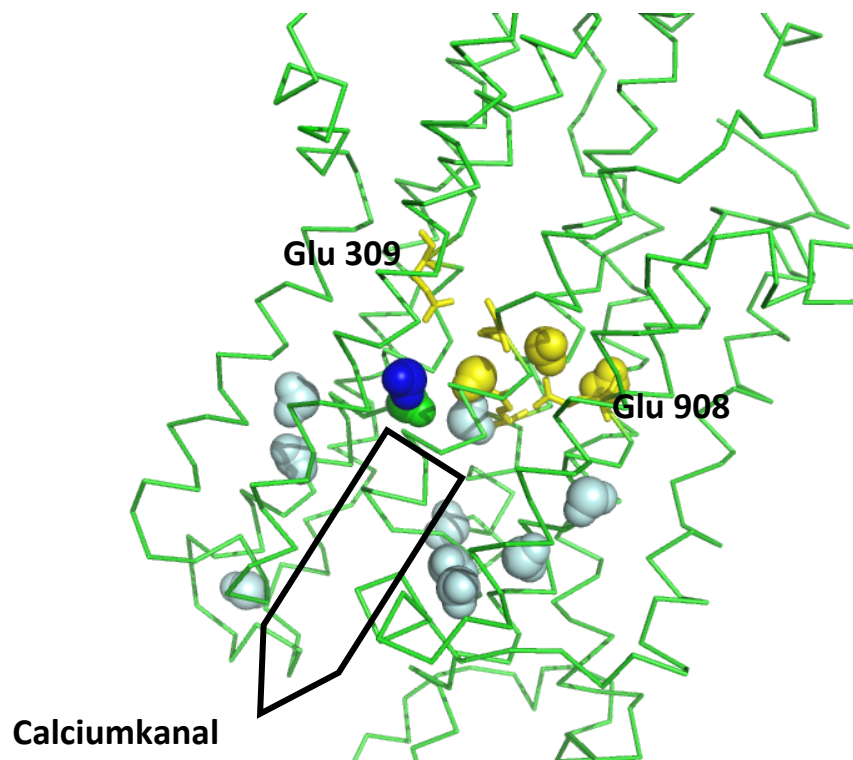
Um den Einfluss der Calciumbindestelle auf die Protonierung weiterer Wassermoleküle innerhalb dieser Bindestelle zu untersuchen, wurde die zuvor berechnete Protonierung des Wassers 1 für die folgende Elektrostatik-Rechnung neutral gesetzt (Abb. 49). Dies bedeutet, dass für das Wasser 1 keine Protonierung stattfinden kann. Damit sollten weitere Wassermoleküle identifiziert werden, die möglicherweise am Protonengentransport beteiligt sind.



**Abb. 49:** Protonierungen der Wassermoleküle im E1P-Zustand mit neutralem Wasser 1 (pdb-Datei: 2ZBD). Die Calciumliganden sind gelb, die eingefügten Wassermoleküle hellblau, das protonierte Wassermolekül dunkelblau und das in der Elektrostatik-Rechnung neutral festgesetzte Wasser 1 ist grau markiert.

Als Ergebnis der beschriebenen Elektrostatik-Rechnung konnte ein weiteres protoniertes Wassermolekül nachgewiesen werden (Abb. 49). Dieses befindet sich in der Calciumbindestelle mit

einem Abstand von 5 Å zu dem als neutral festgesetzten Wasser 1. Diese Lage ist ein deutlicher Hinweis, dass die Calciumbindestelle im E1P-Zustand eine Protonierung der Wassermoleküle, die sich innerhalb der Bindestelle befinden, begünstigt. Die Protonierung der Wassermoleküle innerhalb der Calciumbindestelle lässt sich vor allem darauf zurückführen, dass die Protonen, die in den Calciumbindestellen liegen, zur Stabilisierung der negativ geladenen Liganden benötigt werden. Es ist daher zu vermuten, dass sich alle Wassermoleküle innerhalb der Calciumbindestelle protonieren lassen, sobald ein explizites Wassermolekül innerhalb der Calciumbindestelle als neutral vorgegeben wird. Demzufolge wurden für die weiteren Elektrostatik-Rechnungen die drei Wassermoleküle, die sich in der Calciumbindestelle befinden, neutral gesetzt.



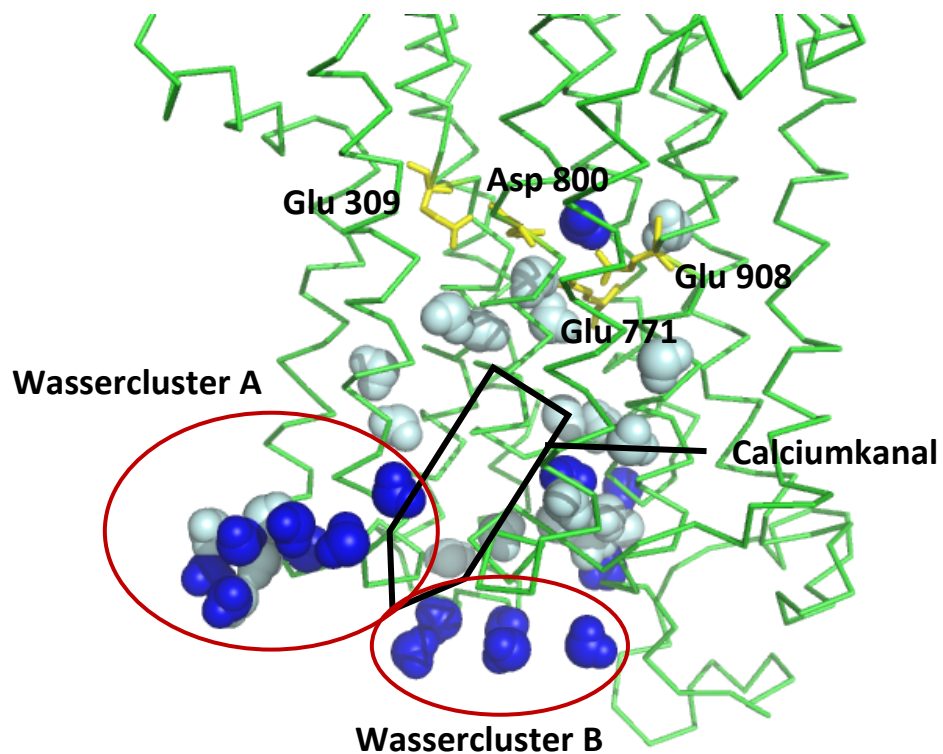
**Abb. 50:** Protonierungen der Wassermoleküle im E1P-Zustand mit drei neutralen Wassermolekülen (neutrale Wassermoleküle sind gelb) bzw. vier neutralen Wassermolekülen (zu den drei gelben, neutralen Wassermolekülen wird das blaue markierte Wassermolekül hinzugefügt)(pdb-Datei: 2ZBD). Die Calciumliganden sind gelb, die eingefügten Wassermoleküle hellblau, die protonierten Wassermoleküle dunkelblau (bei drei neutral gesetzten Wassermolekülen) bzw. grün (bei vier neutral gesetzten Wassermolekülen) und die in beiden Elektrostatik-Rechnungen neutralen Wassermoleküle sind gelb markiert.

Wie sich an der Abb. 50 erkennen lässt, wird die Protonierung von der Mitte der 1. Calciumbindestelle weiter zum Calciumkanal transportiert (blaues und grünes Wassermolekül). Die Richtung, in die die Protonierung verschoben wird, steht in guter Übereinstimmung mit dem postulierten Protonenweg (siehe Kapitel 3.5).

Um den weiteren Weg des Protons durch die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase zu simulieren, wurde zusätzlich zu den drei neutralen Wassermolekülen (gelb markiert in Abb. 50) das zuvor protonierte Wassermolekül

(dunkelblau markiert in Abb. 50) ebenfalls neutral gesetzt. Bei dieser Simulationsanordnung wird wieder die Protonierung zum nächsten Wassermolekül weitergegeben (grünes Wassermolekül in Abb. 50). Ein weiteres "Verschieben" des Protons über Wassermoleküle innerhalb des Transmembranbereiches der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase durch Festsetzen des neutralen Zustands vorher berechneter Protonierungen war, wie die Elektrostatik-Rechnungen zeigten, nicht möglich. Es kann davon ausgegangen werden, dass es nicht möglich ist, den kompletten Protonenweg innerhalb eines Enzymzustandes mit dieser Simulationsmethode beobachten zu können.

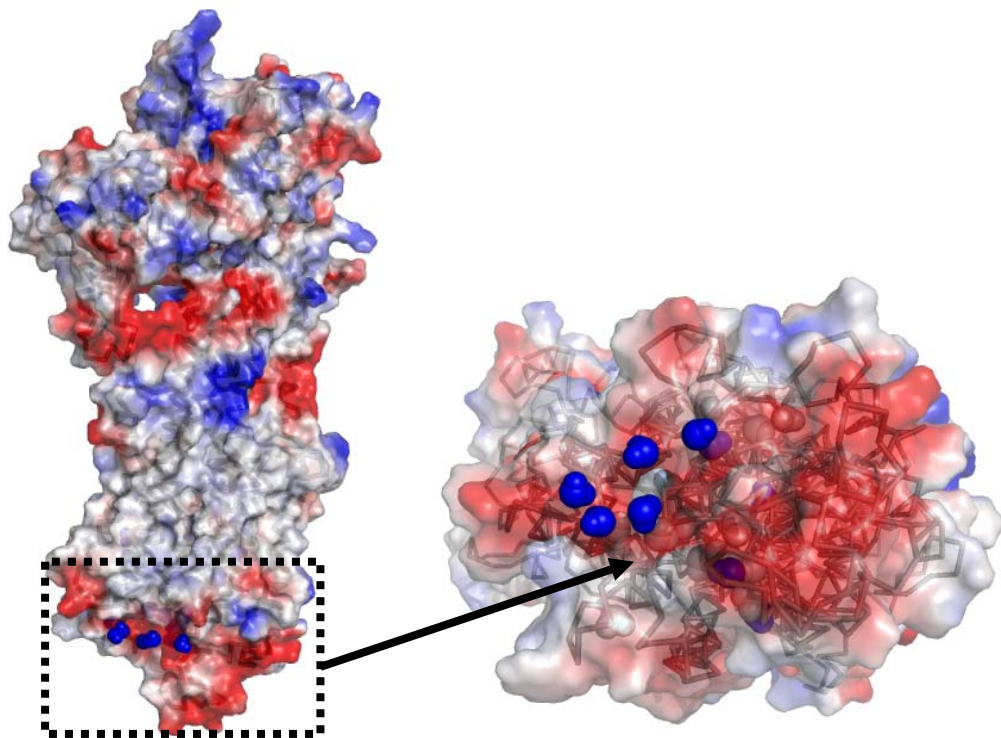
Für den Mechanismus des Protonengegentransportes in der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase sind nicht nur die Protonierungen der Wassermoleküle innerhalb, sondern auch außerhalb des Transmembranbereiches von Interesse. Anhand dieser lässt sich ein möglicher Eingangskanal der Protonen in die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase identifizieren. Dafür wurden explizite Wassermoleküle außerhalb der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase eingefügt. Eine Simulation der vollständigen  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in einer expliziten Wasserumgebung lässt sich aufgrund einer zu hohen Anzahl an benötigten Wassermolekülen nicht realisieren. Deshalb wurden nur an ausgewählten Stellen explizite Wassermoleküle platziert.



**Abb. 51:** Protonierungen der Wassermoleküle im E1P-Zustand mit Wassermolekülen an der Oberfläche der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (pdb-Datei: 1T5T). Die Calciumliganden sind gelb, die eingefügten Wassermoleküle hellblau, die protonierten Wassermoleküle dunkelblau markiert. Der Wassercluster A befindet sich am Ausgang des Calciumkanals. Der Wassercluster B befindet sich am postulierten Protoneneingang.

Der erste eingefügte Wassercluster A befindet sich am Ausgang des Calciumkanals. Diese Position wurde aufgrund einer Überlagerung mit der E2P-Struktur (pdb-Datei: 3B9B), die in diesem Zustand

mit geöffnetem Calciumkanal vorliegt, ausgewählt. Der Wassercluster B ist am postulierten Protoneneingang platziert (siehe Kapitel 3.5). Ein protoniertes Wassermolekül befindet sich, wie auch schon bei den vorausgegangenen Simulationen, innerhalb der Calciumbindestelle (Abb. 51). Die Lage des protonierten Wassermoleküls ist nicht dieselbe wie die des Wassers 1. Sie stimmt aber mit der Lage des protonierten Wassermoleküls in Abb. 49 überein, welches um 2 Å zum cytoplasmatischen Membranbereich verschoben ist. Besonders hervorzuheben ist, dass alle Wassermoleküle, die sich unterhalb des postulierten Protoneneingangs befinden, protoniert vorliegen können, aber nicht alle Wassermoleküle gleichzeitig. Die berechnete Besetzungswahrscheinlichkeit der einzelnen Wassermoleküle ist gering (zwischen 5 - 20 %), aber die Ansammlung dieser Protonierungsmöglichkeiten ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass sich in diesem Bereich der tatsächliche Protoneneingang befindet. Bei Öffnung des Kanals können so die Protonen direkt ins Innere des Proteins zu den Calciumbindestellen gelangen bzw. als protonierte Wassermoleküle ins Innere diffundieren. Ebenso denkbar ist, dass die Protonen an weitere Wassermoleküle im Inneren des Kanals weitergereicht werden.



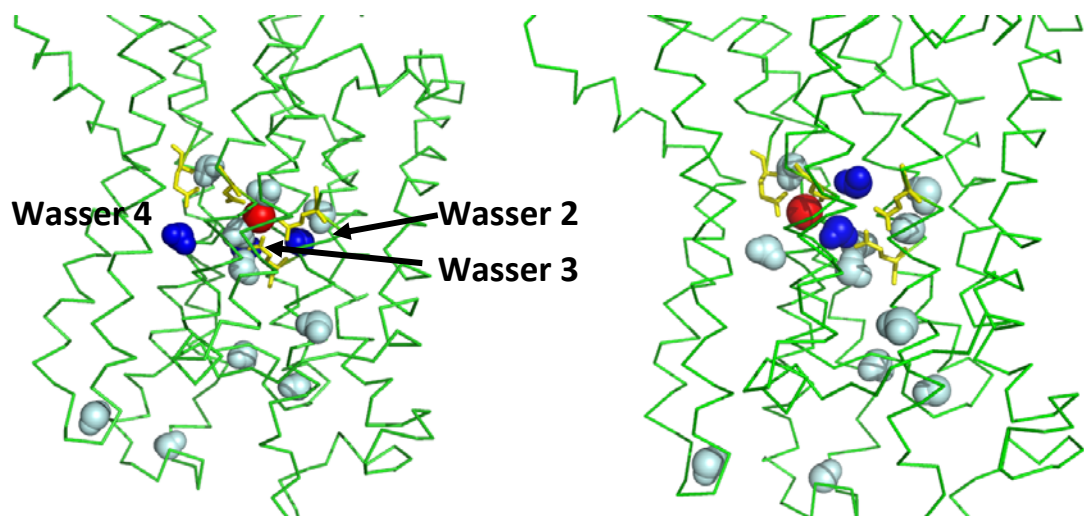
**Abb. 52:** Oberflächenpotential der vollständigen  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. **Rechts:** Luminaler Ausschnitt der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. Die negativen Bereiche sind rot, die neutralen Bereiche weiß und die positiven Bereiche blau dargestellt. Die protonierten Wassermoleküle sind dunkelblau markiert.

Anhand des Oberflächenpotentials lässt sich erkennen, dass vor allem der luminaler Teil der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase negativ geladen ist. Fünf der protonierten Wassermoleküle liegen innerhalb eines Radius von 8 Å zu den negativ geladenen luminalen Aminosäuren Glu 82 und Glu 892. Dies spricht dafür,

dass die negative Oberfläche eine funktionelle Rolle für den Protonentransport einnimmt, da diese die Anlagerung von Protonen begünstigt. Diese Protonen können dann bei Öffnung des Kanals durch diesen weitergeleitet und so zu den Calciumliganden transportiert werden.

### 5.2.3.1 Einfluss von Calciumionen

Weiterhin sollte der Einfluss der Calciumionen auf den Protonentransport untersucht werden. Dazu wurden, wie in Kapitel 5.2 beschrieben, nacheinander die Calciumionen in die Bindestellen eingefügt. Es zeigte sich, dass beim Einfügen eines Calciumions in die 1. Bindestelle, das vorher durchgängig protonierte Wassermolekül (Wasser 1, Abb. 48) verschwindet. Dabei ist allerdings zu berücksichtigen, dass die Position des Wassermoleküls 1 durch das Calciumion besetzt ist. Es protonieren aber weiterhin zwei Wassermoleküle (Wasser 2 und 3) in der Nähe der 1. Bindestelle (Abb. 53), eines davon in der Nähe des Calciumliganden Glu 771 und das andere in der Nähe des Calciumliganden Glu 908. Ebenfalls protoniert ein Wassermolekül in der Nähe des Calciumliganden Glu 309 (Abb. 53, Wasser 4). Im Vergleich zu den beiden anderen befindet sich dieses aber mit ca. 5,5 Å deutlich weiter entfernt von der Calciumbindestelle.

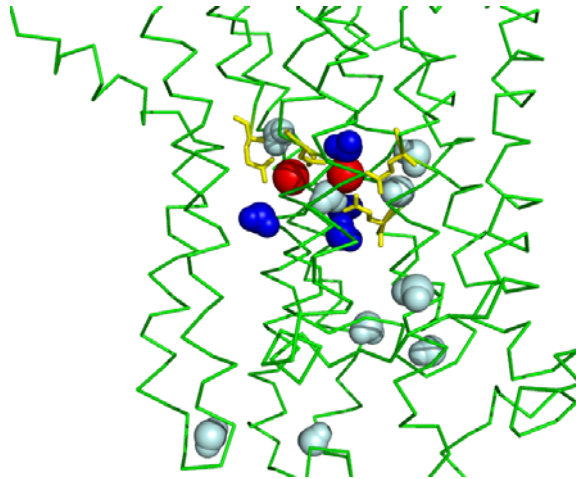


**Abb. 53:** Protonierungen der expliziten Wassermoleküle des E1P-Zustandes mit einem Calciumion in einer der beiden Bindestellen (pdb-Datei: 1T5T). **Links:** Protonierungen im E1P-Zustand mit einem Calciumion in der 1. Bindestelle. **Rechts:** Protonierungen im E1P-Zustand mit einem Calciumion in der 2. Bindestelle. Die Calciumliganden sind gelb, die eingefügten Wassermoleküle hellblau, das Calciumion rot und die protonierten Wassermoleküle blau markiert.

Berücksichtigt man das Calciumion in der 2. Bindestelle, so protonieren zwei Wassermoleküle, welche sich zwischen den beiden Calciumbindestellen befinden (Abb. 53).

Werden die Calciumionen in beide Bindestellen eingefügt, so zeigt sich deutlich eine Anlagerung der protonierten Wassermoleküle um die 1. Bindestelle (Abb. 54).

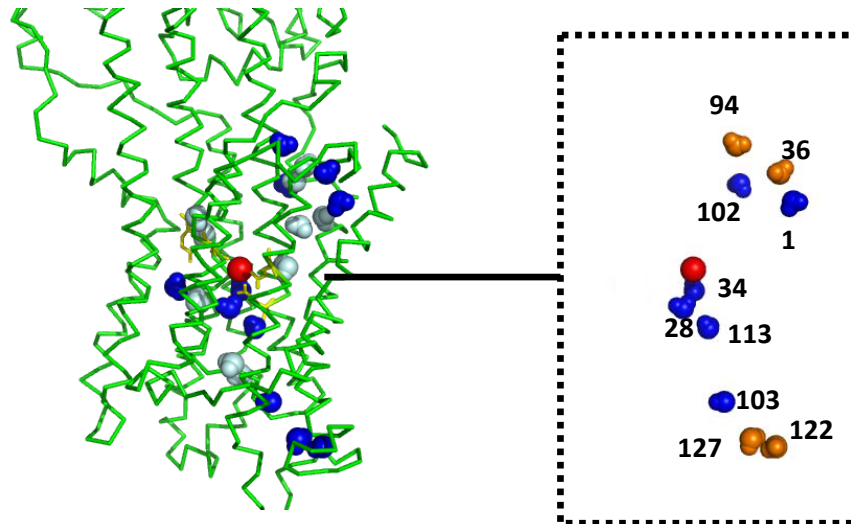




**Abb. 54:** Protonierungen der expliziten Wassermoleküle des E1P-Zustandes mit zwei Calciumionen in den Bindestellen (pdb-Datei: 1T5T). Die Calciumliganden sind gelb, die eingefügten Wassermoleküle hellblau, die Calciumionen rot und die protonierten Wassermoleküle blau markiert.

Zu bedenken ist, dass nicht alle Wassermoleküle gleichzeitig protoniert vorliegen, da die berechnete Besetzungswahrscheinlichkeit der einzelnen Wassermoleküle gering ist (< 30 %). Allerdings ist es auffällig, dass die Anzahl der Protonierungen durch das Einfügen von Calciumionen ansteigt. Dies ist zunächst nicht zu erwarten. Deshalb wurden zur Verifizierung mehrere Elektrostatik-Rechnungen durchgeführt, die alle zum gleichen Resultat führten. Dies legt die Interpretation nahe, dass, auch wenn die positiv geladenen Calciumionen in der Bindestelle okkludiert sind, Protonen in der Bindestelle vorliegen, die bei der Dissoziation der Calciumionen aus der Bindestelle die Calciumliganden sofort stabilisieren können. Damit wird erneut die Hypothese, dass die Protonen zur Stabilisierung der Calciumbindestelle beitragen, bestätigt.

Die gleichen Simulationen wurden auch an einer weiteren Struktur des E1P-Zustandes durchgeführt (pdb-Datei: 2ZBD). Im Gegensatz zu den vorhergehenden Simulationen an demselben Enzymzustand, zeigten sich hier nicht nur Protonierungen um die 1. Bindestelle, sondern auch eine Verteilung der Protonierungen über den ganzen Transmembranbereich (Abb. 55). Dass das Einfügen einer positiven Ladung einen solch starken Einfluss auf die Protonierung innerhalb des ganzen Proteins ausübt, war zunächst nicht zu erwarten. Dies gilt für alle untersuchten Simulationssysteme, d.h. unabhängig davon, ob ein Calciumion in einer der beiden Bindestellen oder beide Calciumionen gebunden sind. Für alle drei Simulationssysteme (Calciumion in der 1. Bindestelle, Calciumion in der 2. Bindestelle oder beide Calciumionen gebunden) lassen sich durch die Elektrostatik-Rechnungen Protonierungen innerhalb des ganzen Transmembranbereiches feststellen (Abb. 56 und Abb. 57).

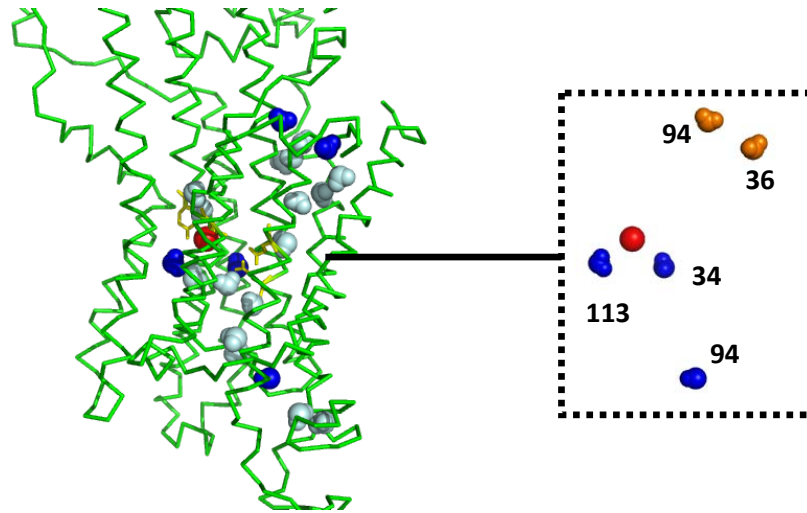


**Abb. 55:** Protonierungen der Wassermoleküle des E1P-Zustandes mit einem Calciumion in der 1. Bindestelle (pdb-Datei: 2ZBD). Die Calciumliganden sind gelb, die eingefügten Wassermoleküle hellblau, das Calciumion rot und die protonierten Wassermoleküle blau markiert. **Rechts:** Ausschnitt: Darstellung aller Wassermoleküle (dunkelblau), die protonieren können. Die Wassermoleküle, die eine Besetzungswahrscheinlichkeit > 50 % bei einem pH-Wert von 7 haben, sind orange gekennzeichnet.

pH-Wert/ Wassermolekül	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	1	1	1	1	0,93	0,39	0	0	0	0	0	0	0	0	0
28	1	0,94	0,78	0,35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
34	1	0,94	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
36	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,84	0,17	0	0	0
94	1	1	1	1	1	1	0,99	0,8	0,04	0	0	0	0	0	0
102	1	0,93	0,27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
103	1	0,99	0,9	0,22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
113	1	0,97	0,55	0,09	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
122	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,78	0	0	0
127	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,78	0	0	0

**Tabelle 23:** Besetzungswahrscheinlichkeit der protonierten Wassermoleküle im E1P-Zustand mit einem Calciumion in der 1. Bindestelle.

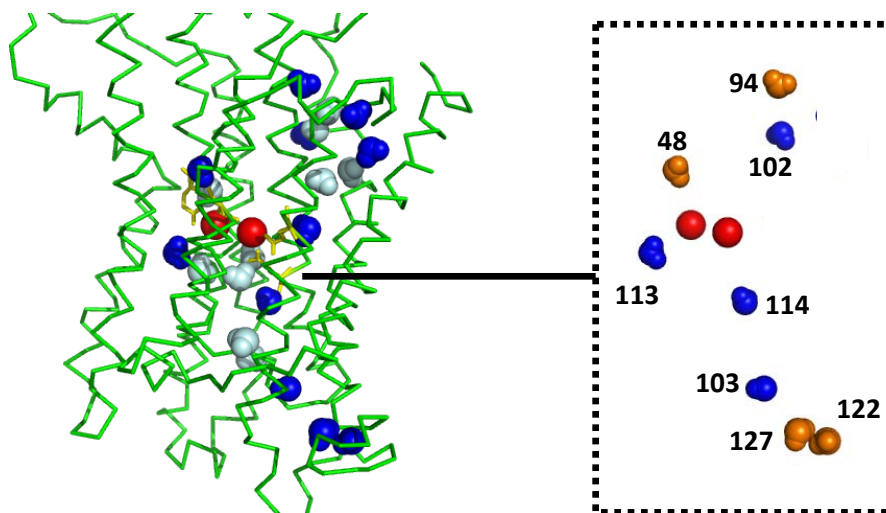
Deutlich ist in Abb. 56 zu erkennen, dass bei einem eingefügten Calciumion in der 2. Bindestelle weniger Protonierungen auftreten als in den beiden anderen Simulationen.



**Abb. 56:** Protonierungen im E1P-Zustand mit einem Calciumion in der 2. Bindestelle (pdb-Datei: 2ZBD). Die Calciumliganden sind gelb, die eingefügten Wassermoleküle hellblau, das Calciumion rot und die protonierten Wassermoleküle blau markiert. **Rechts:** Ausschnitt: Darstellung aller Wassermoleküle (dunkelblau), die protonieren können. Die Wassermoleküle, die eine Besetzungswahrscheinlichkeit > 50 % bei einem pH-Wert von 7 haben, sind orange gekennzeichnet.

pH-Wert Wassermolekül	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
34	1	0,68	0,11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
36	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,91	0,31	0,05	0	0	0
94	1	1	1	1	1	1	1	1	0,61	0,06	0	0	0	0	0
103	1	0,95	0,65	0,09	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
113	1	0,68	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

**Tabelle 24:** Besetzungswahrscheinlichkeit der protonierten Wassermoleküle im E1P-Zustand mit einem Calciumion in der 2. Bindestelle.



**Abb. 57:** Protonierungen der expliziten Wassermoleküle des E1P-Zustandes mit beiden Calciumion in den Bindestellen (pdb-Datei: 2ZBD). Die Calciumliganden sind gelb, die eingefügten Wassermoleküle hellblau, die Calciumionen rot und die protonierten Wassermoleküle blau markiert. **Rechts:** Ausschnitt: Darstellung aller Wassermoleküle (dunkelblau), die protonieren können. Die Wassermoleküle, die eine Besetzungswahrscheinlichkeit > 50 % bei einem pH-Wert von 7 haben, sind orange gekennzeichnet.



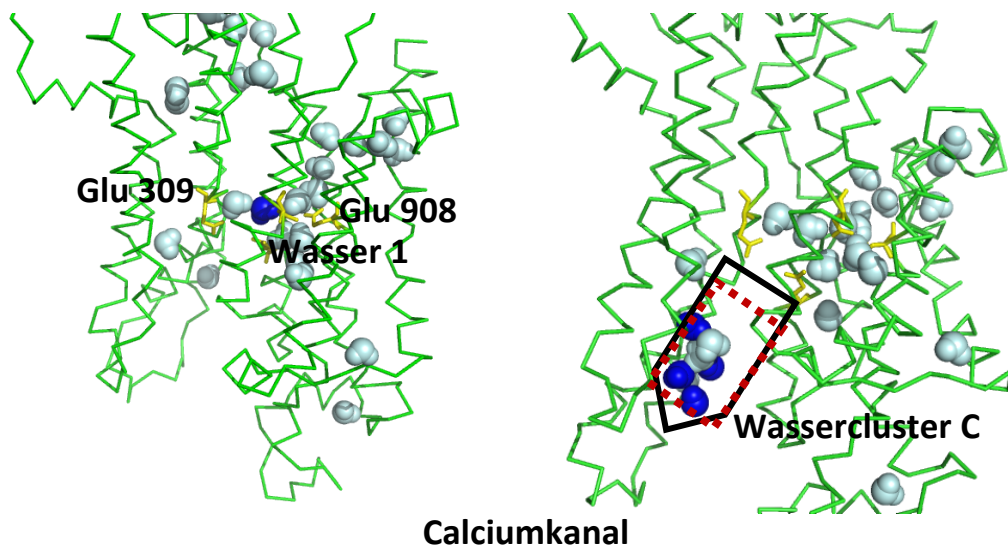
pH-Wert/ Wassermolekül	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
48	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,91	0,38	0	0	0	0
94	1	1	1	1	1	1	1	1	0,93	0,06	0	0	0	0	0
102	1	0,93	0,48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
103	1	1	1	1	0,53	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
113	1	1	1	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
114	1	1	0,62	0,22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
122	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,52	0,3	0,03	0	0	0
127	0,97	0,96	0,95	0,95	0,95	0,95	0,8	0,75	0,22	0,1	0	0	0	0	0

**Tabelle 25:** Besetzungswahrscheinlichkeit der protonierten Wassermoleküle im E1P-Zustand mit beiden Calciumionen in den Bindestellen.

Obwohl die Standardabweichung der Proteinkoordinaten zwischen der Strukturdatei 1T5T und der Strukturdatei 2ZBD nur 1,9 Å beträgt, unterscheiden sich die Anzahl der eingefügten Wassermoleküle und die Verteilungen der protonierten Wassermoleküle deutlich. Die Ursache dafür beruht auf den unterschiedlichen Orientierungen einzelner Seitenketten im Transmembranbereich. Das Programm Dowser fügt daher an unterschiedlichen Stellen im Transmembranbereich Wassermoleküle ein.

### 5.2.4 Protonierungen im E2P-Zustand

Um einen weiteren Enzymzustand einzubeziehen, wurden explizite Wassermoleküle in zwei weitere Strukturdateien des E2P-Zustands der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase eingefügt (pdb-Datei: 3B9B (Oelsen et al. 2007) und 1WPG (Toyoshima et al. 2004)). Die beiden Strukturdateien unterscheiden sich nur geringfügig in ihrer Auflösung (pdb-Datei: 3B9B - 2,7 Å und pdb-Datei: 1WPG - 2,3 Å), allerdings unterscheidet sich die Konformation der Strukturdateien deutlich, da die pdb-Datei 1WPG der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase mit geschlossenem Calciumkanal entspricht, wohingegen die pdb-Datei 3B9B einen offenen Calciumkanal aufweist.

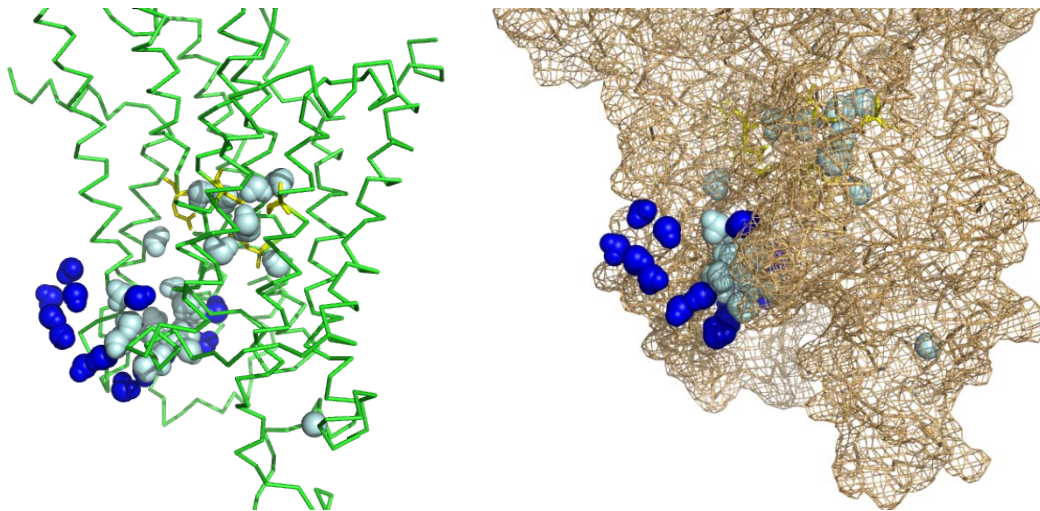


**Abb. 58:** Protonierungen der expliziten Wassermoleküle im E2P-Zustand (pdb-Datei: 3B9B). **Links:** Protonierung des Wassers 1 innerhalb der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. **Rechts:** Protonierungen der expliziten Wassermoleküle im geöffneten Calciumkanal des E2P-Zustand. Die Calciumliganden sind gelb, die eingefügten Wassermoleküle hellblau und die protonierten Wassermoleküle blau markiert.

Wie auch in der E1P-Struktur liegt das Wasser 1 protoniert vor. Dies zeigten sowohl die Elektrostatik-Rechnungen an der pdb-Datei 3B9B (Abb. 58) als auch für die pdb-Datei 1WPG (keine Abbildung vorhanden). Da in der Kristallstruktur des E2P-Zustandes (pdb-Datei: 3B9B) der Calciumkanal zum Lumen hin geöffnet ist, wurden einige Wassermoleküle über den ganzen Calciumkanal verteilt eingefügt (Abb. 58 rechts, Wassercluster C). Die expliziten Wassermoleküle, die sich außerhalb bzw. innerhalb des Calciumkanals der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase befinden, wurden, wie in Kapitel 5.2.3 beschrieben, eingefügt. Wie die anschließenden Elektrostatik-Rechnungen zeigen, lässt sich eine Protonierung von Wassermolekülen innerhalb des Transmembranbereiches nicht mehr nachweisen. Im Calciumkanal hingegen protonieren mehr als die Hälfte der eingefügten Wassermoleküle. Dieses Ergebnis deutet auf funktionelle Protonierungen der Wassermoleküle im Calciumkanal während des Protonentransports hin, denn es befinden sich Protonen sowohl im als auch am Ausgang des Calciumkanals. Wahrscheinlich ist auch, dass die Protonen im Calciumkanal von einem Wassermolekül zum anderen weitergeleitet werden, da die Wassermoleküle in einer Reihe

angeordnet sind und der Abstand zwischen den einzelnen Wassermoleküle 3 Å nicht übersteigt. Hervorzuheben ist, dass keine Protonierung eines Wassermoleküls innerhalb der Calciumbindestelle vorliegt, wenn Wassermoleküle in den Kanal eingefügt worden sind.

Aufgrund des Ergebnisses, das in Abb. 58 dargestellt ist, wurden noch weitere Wassermoleküle sowohl in den Kanal als auch am Ausgang des Calciumkanals an der Oberfläche des Proteins eingefügt.

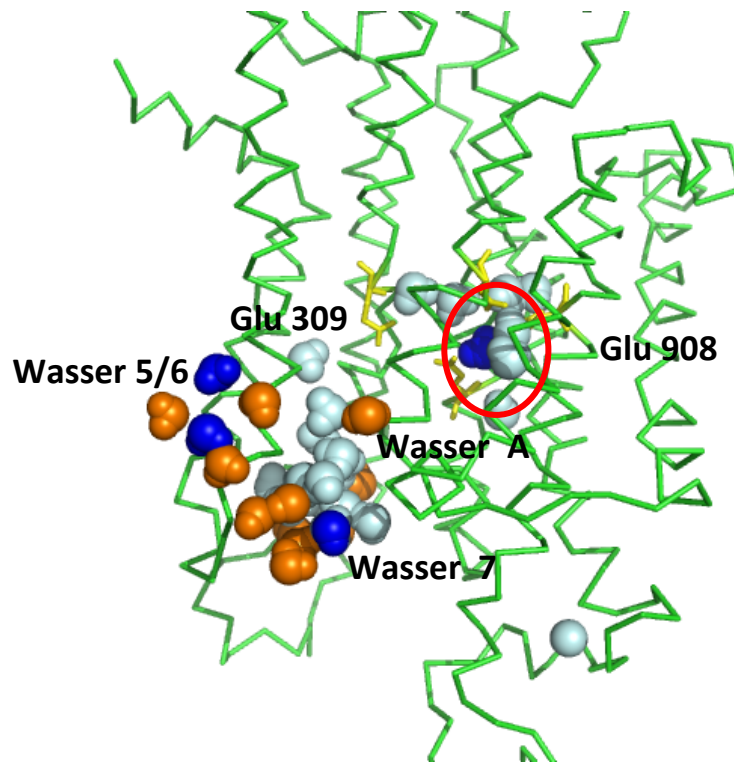


**Abb. 59:** Protonierungen der expliziten Wassermoleküle im und am Ausgang des Calciumkanals (pdb-Datei: 3B9B). **Rechts:** Oberflächendarstellung der gleichen Auswertung. Die Calciumliganden sind gelb, die eingefügten Wassermoleküle hellblau und die protonierten Wassermoleküle blau markiert.

Abb. 59 zeigt, dass beim Einfügen zusätzlicher expliziter Wassermolekülen ein großer Teil davon auch protoniert werden kann. Es werden nicht alle Wassermoleküle gleichzeitig protoniert vorliegen, da die berechnete Besetzungswahrscheinlichkeit der zehn einzelnen Wassermoleküle außerhalb der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase nur ca. 10 % je protoniertem Wassermolekül beträgt. Einzig das protonierte Wassermolekül innerhalb des Kanals, welches am nächsten an den Calciumliganden lokalisiert ist besitzt eine höhere Besetzungswahrscheinlichkeit. Die Protonierungsmöglichkeiten befinden sich sowohl im Calciumkanal als auch außerhalb des Proteins bzw. am Ausgang des Kanals. Dabei ist zu erkennen, dass sich ein Weg von protonierten Wassermolekülen von der Oberfläche über den Ausgang des Kanals bis in den Kanal hinein ausbildet. Auch das ist ein weiteres Anzeichen dafür, dass die Protonen entlang von Wassermolekülen in den Kanal bzw. in das Protein hinein transportiert werden und innerhalb des Proteins ein kombinierter Transportprozess entlang von Wassermolekülen und Aminosäureseitenketten erfolgt.

Die Darstellung der Proteinoberfläche veranschaulicht die Lage der Wassermoleküle (Abb. 59). Daran lässt sich erkennen, welche protonierten Wassermoleküle sich im Inneren des Kanals bzw. auf der Oberfläche des Proteins befinden.

Zur Simulation der Protonenübertragung entlang der Wassermoleküle, die sich in der Umgebung bzw. innerhalb des offenen Kanals befinden, wurden die ermittelten Protonierungen aus den vorausgehenden Simulationen (Abb. 59) im MC-Sampling als protoniert festgesetzt. Die Idee dahinter ist, den Einfluss von protonierten Wassermolekülen auf die anderen eingefügten Wassermoleküle zu untersuchen.

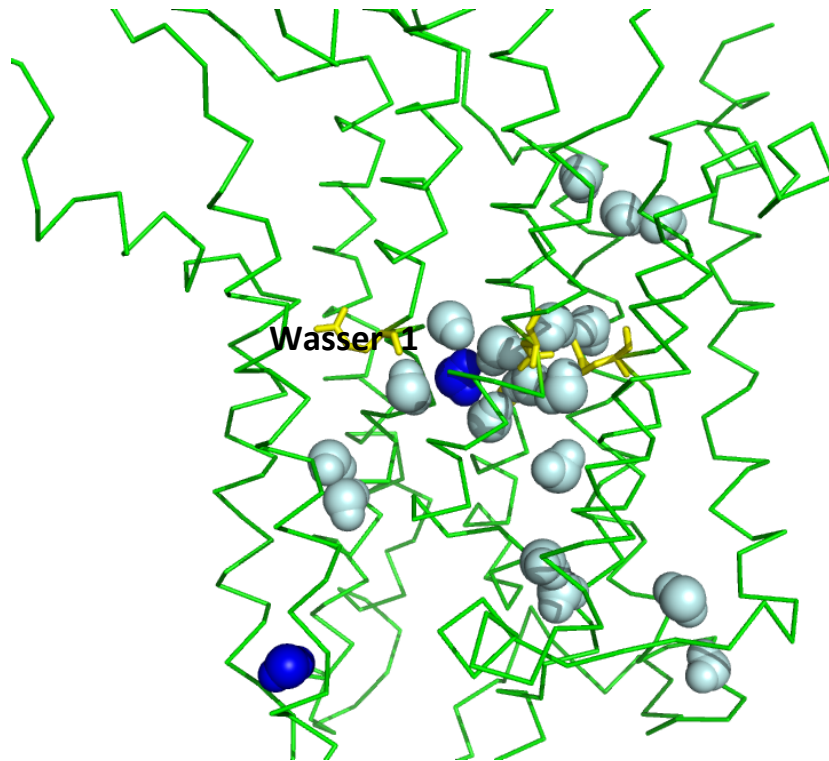


**Abb. 60:** Einfluss von festgesetzten Protonierungen auf weitere Wassermoleküle im und am Ausgang des Calciumkanals (pdb-Datei: 3B9B). Die Calciumliganden sind gelb, die eingefügten Wassermoleküle hellblau, die festgesetzten Protonierungen orange und die daraufhin protonierten Wassermoleküle blau markiert.

Durch die festgesetzten Protonierungen konnten noch weitere Wassermoleküle auf der Oberfläche protoniert werden (Abb. 60, Wasser 5 und 6). Des Weiteren wird ein Wassermolekül im Kanal protoniert (Abb. 60, Wasser 7). Wichtigstes Ergebnis dieser Simulation ist die Protonierung des Wassermoleküls (rot umkreist), das sich in der 1. Bindestelle befindet und somit wieder mit dem protonierten Wassermolekül im E1P-Zustand übereinstimmt (Abb. 48, Wasser 1). Erst durch die gezielt festgesetzte Protonierung (Abb. 60, orangene Wassermoleküle A) konnte eine reproduzierbare Protonierung in der 1. Bindestelle festgestellt werden. Dieses Wassermolekül des E2P-Zustandes besitzt einen Abstand von 5,5 Å zu dem Wasser 1 des E1P-Zustandes.

### 5.2.5 Protonierungen im E2-P-Zustand

Für den E2-P-Enzymzustand wurde aus der pdb-Datenbank die Kristallstruktur 1XP5 ausgewählt. In diesem Zustand sind die Protonen im Transmembranbereich okkludiert (Oelsen et al. 2004).

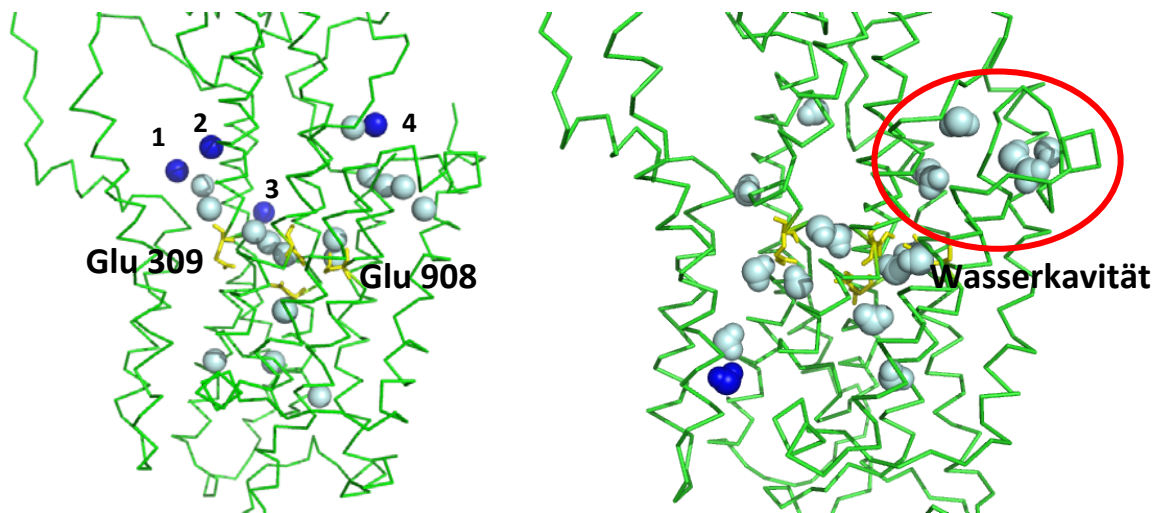


**Abb. 61:** Protonierungen der expliziten Wassermoleküle im E2-P-Zustand (pdb-Datei: 1XP5). Die Calciumliganden sind gelb, die eingefügten Wassermoleküle hellblau und die protonierten Wassermoleküle blau markiert.

Wie auch im E1P-Zustand liegt für diesen Zustand eine Protonierung innerhalb der Calciumliganden vor. Auch hier nimmt das protonierte Wassermolekül dieselbe Position wie das Wasser 1 im E1P-Zustand der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase ein (Abb. 48). Ein weiteres protoniertes Wassermolekül liegt weit entfernt von den Calciumliganden im luminalen Teil der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase vor. Dieses Wassermolekül befindet sich zwar in der Nähe des Calciumkanals, es hat aber keinen Zugang zu diesem. In der Nähe dieses protonierten Wassermoleküles befinden sich auch keine weiteren Wassermoleküle. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass diese Protonierung nicht am Protonentransport beteiligt ist, vorausgesetzt, dass der Calcium- und Protonenkanal ähnlich verlaufen.

### 5.2.6 Protonierungen im E2-Zustand

Ebenso wie bei den vorhergehenden Elektrostatik-Rechnungen wurden auch explizite Wassermoleküle in die Strukturdaten des E2-Zustands eingefügt. Für diese eingefügten Wassermoleküle konnten weder in den Calciumbindestellen noch im Transmembranbereich der Ca<sup>2+</sup>-ATPase Protonierungen nachgewiesen werden. Daher wurden weitere explizite Wassermoleküle, die in der Strukturdatei enthalten sind, in das Simulationssystem eingefügt. Diese Wassermoleküle wurden aber nicht nur im Transmembranbereich der Ca<sup>2+</sup>-ATPase, sondern auch im *stalk*-Bereich platziert mit dem Ergebnis, dass vier dieser eingefügten Wassermoleküle eine Protonierung aufweisen. Die Protonierungen sind allerdings nur bei sauren pK-Werten signifikant, bei pH 7 sind sie verschwindende gering. Diese befinden sich sowohl im *stalk*-Bereich als auch im cytoplasmatischen Bereich der Ca<sup>2+</sup>-ATPase.



**Abb. 62:** Protonierungen der expliziten Wassermoleküle des E2-Zustandes (pdb-Datei: 2AGV). **Rechts:** Protonierungen der expliziten Wassermoleküle des E2-Zustandes nach 25 ns MD-Simulation. Die Calciumliganden sind gelb, die eingefügten Wassermoleküle hellblau und die protonierten Wassermoleküle blau markiert.

pH-Wert/ Wassermolekül	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	0,15	0,12	0,12	0,11	0,09	0,09	0,08	0,08	0	0	0	0	0	0	0
2	0,84	0,81	0,8	0,66	0,52	0,33	0,17	0,03	0	0	0	0	0	0	0
3	0,87	0,86	0,85	0,84	0,83	0,69	0,38	0,23	0	0	0	0	0	0	0
4	0,88	0,84	0,8	0,63	0,45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

**Tabelle 26:** Besetzungswahrscheinlichkeit der protonierten Wassermoleküle in der E2-Struktur.

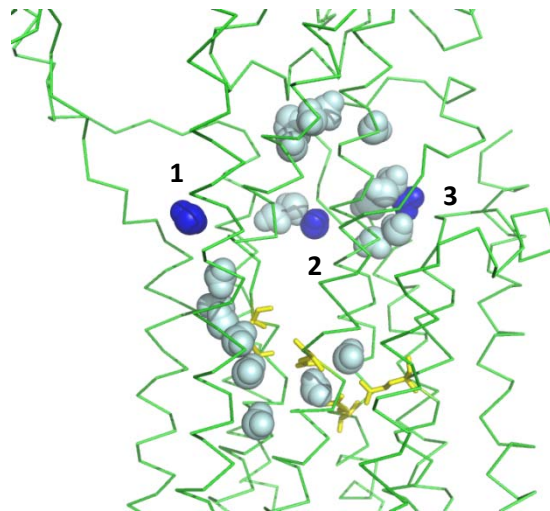
Weiterhin wurden Elektrostatik-Rechnungen an einem MD-Simulations-Schnapschuss nach 25 ns durchgeführt, um die Flexibilität der Ca<sup>2+</sup>-ATPase zu berücksichtigen. Es wurden die Atomkoordinaten der Trajektorie nach 25 ns Simulationszeit ausgewählt und explizite Wassermoleküle für die Elektrostatik-Rechnungen eingefügt. Der Schnapschuss nach 25 ns wurde ausgewählt, da dieser den

größten konformellen Unterschied zur Kristallstruktur aufweist. In Abb. 62 ist erkennbar, dass in der Wasserkavität weniger Wassermoleküle, im Vergleich zu den explizit eingefügten Wassermolekülen in der Kristallstruktur, vorhanden sind und die Protonierungen verschwunden sind. Im luminalen Teil der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase kann eine neue Protonierung nachgewiesen werden. Auch diese Protonierung besitzt keinen Zugang zum Calciumkanal und es kann daher davon ausgegangen werden, dass sie nicht am Protonentransport beteiligt ist.



### 5.2.7 Protonierungen im E1-Zustand mit und ohne Calciumionen

Als weiterer Zustand wurde der E1-Zustand der Ca<sup>2+</sup>-ATPase ausgewählt und wieder der Transmembranbereich der Strukturdatei 1SU4 mit expliziten Wassermolekülen aufgefüllt. Die in dieser Strukturdatei vorhandenen Calciumionen wurden zunächst entfernt.



**Abb. 63:** Protonierungen der expliziten Wassermoleküle des E1-Zustandes ohne Calciumionen (pdb-Datei: 1SU4). Die Calciumliganden sind gelb, die eingefügten Wassermoleküle hellblau und die protonierten Wassermoleküle blau markiert.

pH-Wert/ Wassermolekül	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	0,85	0,58	0,52	0,33	0,22	0,11	0,07	0,05	0	0	0	0	0	0	0
2	0,72	0,32	0,1	0,02	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0,21	0,19	0,15	0,13	0,03	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

**Tabelle 27:** Besetzungswahrscheinlichkeit der protonierten Wassermoleküle in der E1-Struktur.

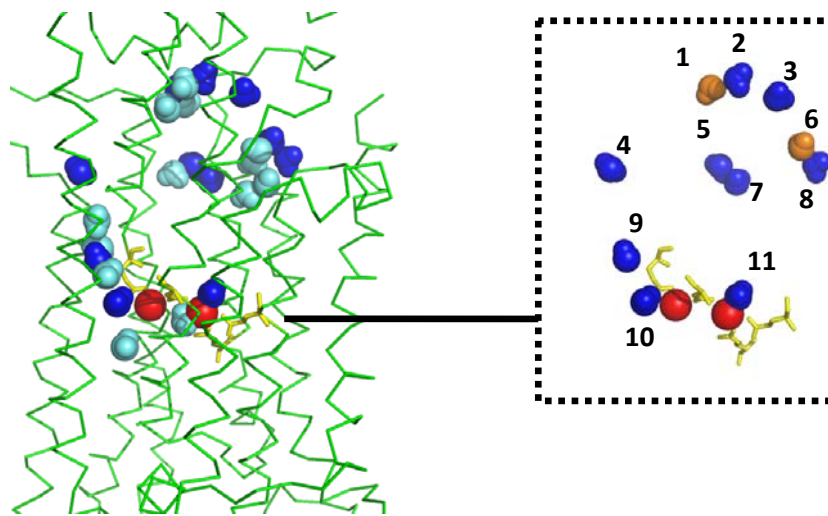
Wie beim E2-Zustand konnte auch hier kein protoniertes Wassermolekül in den Calciumbindestellen nachgewiesen werden. Auch wenn der konformelle Unterschied zwischen dem E1- und dem E2-Zustand im cytoplasmatischen Bereich sehr groß ist, scheint dieser sich nicht auf die Protonierung der Wassermoleküle innerhalb des Transmembranbereiches auszuwirken. Offensichtlich liegt zwischen den beiden Zuständen eine ähnliche Protonierungssituation vor. Wie im E2-Zustand liegen die Protonierungen im cytoplasmatischen Membranbereich, d.h. zwischen dem Transmembranbereich und der *stalk*-Region. Diese Lage deutet darauf hin, dass die Protonen während des Reaktionszyklus vom E2- in den E1-Zustand von der Calciumbindestelle zum Cytoplasma transferiert werden. Diese Vermutung ist plausibel, da im E1-Zustand die Calciumbindestellen wieder von der cytoplasmatischen Seite zugänglich sind und so die Protonen von den Calciumbindestellen in das Cytoplasma transportiert werden könnten. Im Vergleich zum E2-Zustand sind die Besetzungswahrscheinlichkeiten der protonierten Wassermoleküle noch geringer. Dies lässt darauf



schließen, dass in diesem Zustand die Protonen schon zum größten Teil in das Cytoplasma abgegeben worden sind.

### 5.2.7.1 Einfluss von Calciumionen

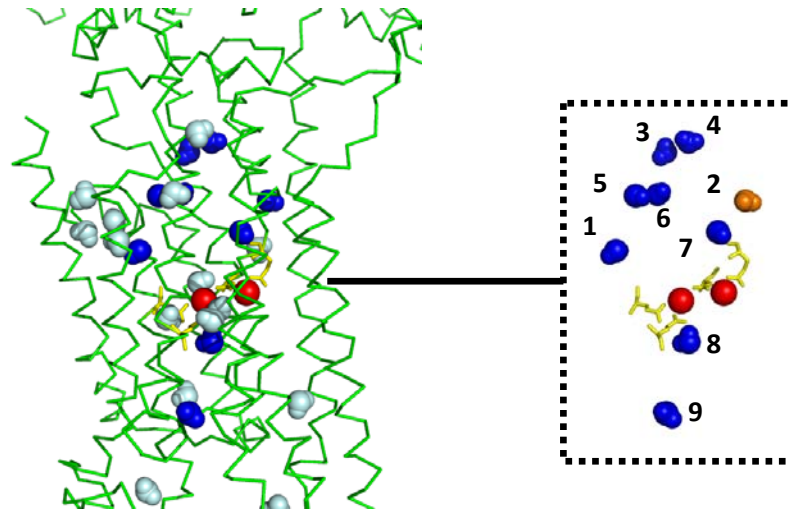
Im Weiteren wird die Struktur der Ca<sup>2+</sup>-ATPase im E1-Zustand mit Calciumionen simuliert. Dazu wird die Strukturdatei 1SU4 verwendet, wobei zum einen die Wassermoleküle, die in der Kristallstruktur vorliegen, und zum anderen die mittels Dowser eingefügten Wassermoleküle in den Elektrostatik-Rechnungen berücksichtigt wurden.



**Abb. 64:** Protonierungen der expliziten Wassermoleküle des E1-Zustandes mit beiden Calciumionen in den Bindestellen (pdb-Datei: 1SU4 mit Wassermolekülen aus der Kristallstruktur). Die Calciumliganden sind gelb, die eingefügten Wassermoleküle hellblau, die Calciumionen rot und die protonierten Wassermoleküle blau markiert. **Rechts:** Ausschnitt: Darstellung aller Wassermoleküle (dunkelblau), die protonieren können. Die Wassermoleküle, die eine Besetzungswahrscheinlichkeit > 50 % bei einem pH-Wert von 7 haben, sind orange gekennzeichnet.

pH-Wert/ Wassermolekül	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,97	0,8	0	0	0	0	0	0	0
2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,17	0,1	0,04	0	0	0
3	1	0,98	0,97	0,95	0,96	0,95	0,92	0,05	0	0	0	0	0	0	0
4	1	1	1	0,97	0,28	0,02	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	1	0,97	0,72	0,01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0,97	0,97	0,97	0,97	0,88	0,87	0,82	0,81	0,05	0	0	0	0	0	0
7	0,96	0,96	0,96	0,77	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0,86	0,86	0,86	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	1	1	1	0,99	0,18	0,18	0,16	0,14	0,11	0,06	0,02	0	0	0	0
10	1	1	0,27	0,22	0,02	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	1	0,34	0,35	0,24	0,21	0,17	0,16	0,13	0	0	0	0	0	0	0

**Tabelle 28:** Besetzungswahrscheinlichkeit der protonierten Wassermoleküle im E1-Zustand mit gebundenen Calciumionen und Wassermolekülen aus der Kristallstruktur.



**Abb. 65:** Protonierungen der Wassermoleküle, die mittels Dowser eingefügt wurden. Die Calciumliganden sind gelb, die eingefügten Wassermoleküle hellblau, die Calciumionen rot und die protonierten Wassermoleküle blau markiert. **Rechts:** Ausschnitt: Darstellung aller Wassermoleküle (dunkelblau), die protonieren können. Die Wassermoleküle, die eine Besetzungswahrscheinlichkeit > 50 % bei einem pH-Wert von 7 haben sind, orange gekennzeichnet.

pH-Wert/ Wassermolekül	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	1	0,67	0,4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,51	0,06	0	0	0	0
3	0,75	0,74	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	1	1	1	1	0,32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0,71	0,7	0,66	0,63	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0,85	0,72	0,67	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0,94	0,35	0,15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	1	1	0,98	0,92	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	1	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

**Tabelle 29:** Besetzungswahrscheinlichkeit der protonierten Wassermoleküle im E1-Zustand mit gebundenen Calciumionen und mittels Dowser eingefügten Wassermolekülen.

Auch hier zeigt sich, dass das Einfügen der Calciumionen eine Erhöhung der Protonierung nach sich zieht. Wiederum muss bedacht werden, dass viele Protonierungsmöglichkeiten bei einem pH-Wert von 7 nicht besetzt sind, d.h. durch die protonierten Wassermoleküle werden nur mögliche Protonierungsstellen identifiziert. Die Wassermoleküle liegen nicht alle gleichzeitig vollständig protoniert vor. Wie die Auswertung zeigt, liegen die Protonierungen hauptsächlich im cytoplasmatischen Membranbereich vor. Die zuletzt durchgeführten Simulationen an Strukturen mit Calciumionen bestätigen auch für diesen Enzymzustand der  $Ca^{2+}$ -ATPase, dass die Zahl der Protonierungen steigt, wenn Calciumionen in die Simulation einbezogen werden (Abb. 65). Eine Erklärung für diese berechnete Protonierungssituation könnten die Wechselwirkungen der Calciumionen innerhalb des Proteins sein. Die Calciumionen wirken hauptsächlich mit den Calciumliganden. Es bestehen aber auch Wechselwirkungen mit den Aminosäuren, die die Calciumionen umgeben. Dadurch kann es zu Umorientierungen von Seitenketten und

Ladungsverschiebungen kommen. Diese wiederum können die Protonierung von eingefügten Wassermolekülen begünstigen.

Im E1-Zustand befinden sich die Protonierungen hauptsächlich im Übergang vom transmembranen zum cytoplasmatischen Bereich. Diese Lage spricht dafür, dass protonierte Wassermoleküle ebenso bei Enzymzuständen mit gebundenen Calciumionen vorhanden sind. Diese Wassermoleküle sind dadurch in der Lage, die gebundenen Protonen nach Verlassen der Calciumionen an die Liganden abgeben zu können. Dies könnte wesentlich zur Stabilität des Proteins beitragen, da sofort die negativ geladenen Liganden durch die Protonen neutralisiert werden bis wieder Protonen aus dem Lumen nachfolgen. Dieses Verhalten entspricht den bisherigen Ergebnissen, die zeigen, dass die Liganden protoniert vorliegen, wenn die Calciumionen nicht gebunden sind (siehe Kapitel 3.5).

### 5.2.8 pK-Werte der Aminosäuren im Transmembranbereich

Nicht nur die explizit eingefügten Wassermoleküle können am Protonengegentransport beteiligt sein. Speziell die titrierbaren Aminosäuren im Transmembranbereich der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase entlang des Calciumkanals sowie an dessen Enden sind in der Lage, die Protonen durch die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase zu transportieren. Daher wurden die pK-Werte dieser titrierbaren Aminosäuren untersucht. Ein möglicher Hinweis auf eine funktionelle Beteiligung einer speziellen Aminosäure am Protonengegentransport kann ein verschobener pK-Wert im Vergleich zum pK-Wert der Aminosäure in wässriger Lösung sein. Dabei wurden die Aminosäuren identifiziert, deren pK-Wert um mehr als zwei pK-Einheiten verschoben ist. Da der Protonentransport oberhalb eines pH-Wertes von acht nicht mehr stattfindet, sind vor allem die Aminosäuren von Interesse, die einen pK-Wert zwischen sechs und acht besitzen (Yu et al. 1994). Da diese prädestiniert für eine Beteiligung am Protonengegentransport sind, wurden die Aminosäuren identifiziert, die einen in diesen Bereich verschobenen pK-Wert aufweisen. Bei der Auswertung traten folgende, in den Tabellen zusammengefasste, Aminosäuren mit einer pK-Wert-Verschiebung auf.

Aminosäure	pK-Wert im E1P-Zustand
Asp 254	≈ 8
Asp 813	≈ 8
Asp 815	≈ 1
Arg 836	≈ 7

**Tabelle 30:** pK-Wert der ausgewählten Aminosäuren im E1P-Enzymzustand (pdb-Datei:1T5T).

Die vier in der Tabelle aufgeführten Aminosäuren befinden sich im cytoplasmatischen Bereich der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (Abb. 66, blau markiert sind nur die Aminosäuren mit einem pK-Wert von sechs bis acht). Die Aminosäure Asp 813 befindet sich sogar an einem möglichen Calciumeingang bzw. Protonenausgang. Bis auf die Aminosäure Asp 815 weisen die Aminosäuren in Tabelle 30 im E1P-Zustand einen zu höheren Werten verschobenen pK-Wert zwischen sechs und acht auf und sind somit prädestiniert für eine Beteiligung am Protonentransport.

Aminosäure	pK-Wert im E2P-Zustand
Glu 90	≈ 7

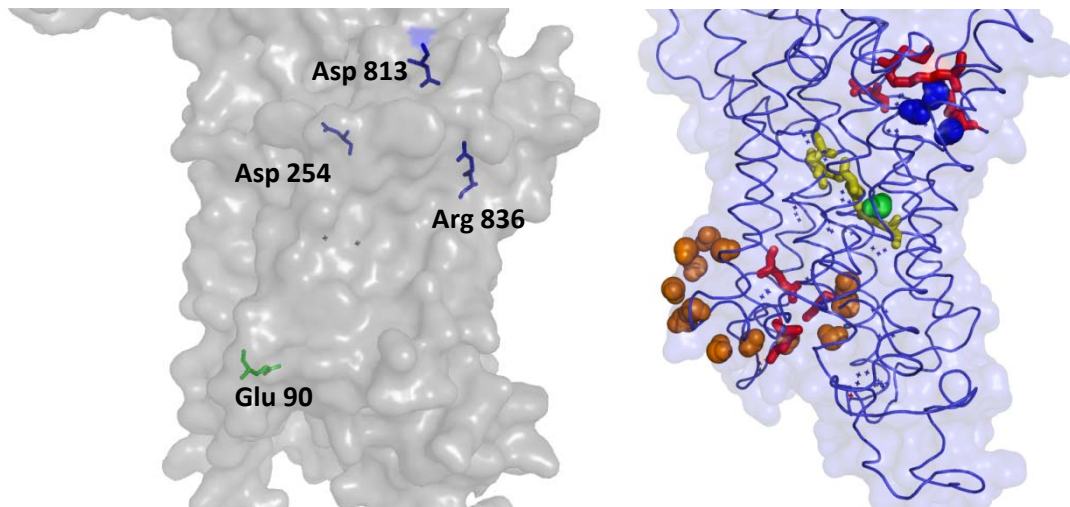
**Tabelle 31:** pK-Wert der ausgewählten Aminosäure im E2P-Enzymzustand (pdb-Datei:3B9B).

Im E2P-Zustand der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase lässt sich nur eine Aminosäure mit einem pK-Bereich zwischen sechs und acht feststellen. Die Aminosäure Glu 90 befindet sich im luminalen Bereich der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (Abb. 66, grün markiert) und ist direkt am Protoneneingang lokalisiert.

Aminosäure	pK-Wert in beiden Enzymzuständen
Lys 297	>14
Lys 758	>14
Lys 958	≈ 13
Lys 985	>14

**Tabelle 32:** pK-Wert der ausgewählten Aminosäuren in beiden Enzymzuständen E1P und E2P.

Die pK-Werte der Aminosäuren in Tabelle 32 sind zwar in beiden Enzymzuständen verschoben, allerdings weisen alle diese Aminosäuren einen sehr hohen pK-Wert auf. Dies lässt vermuten, dass sie nicht funktionell am Protonengegentransport beteiligt sind.

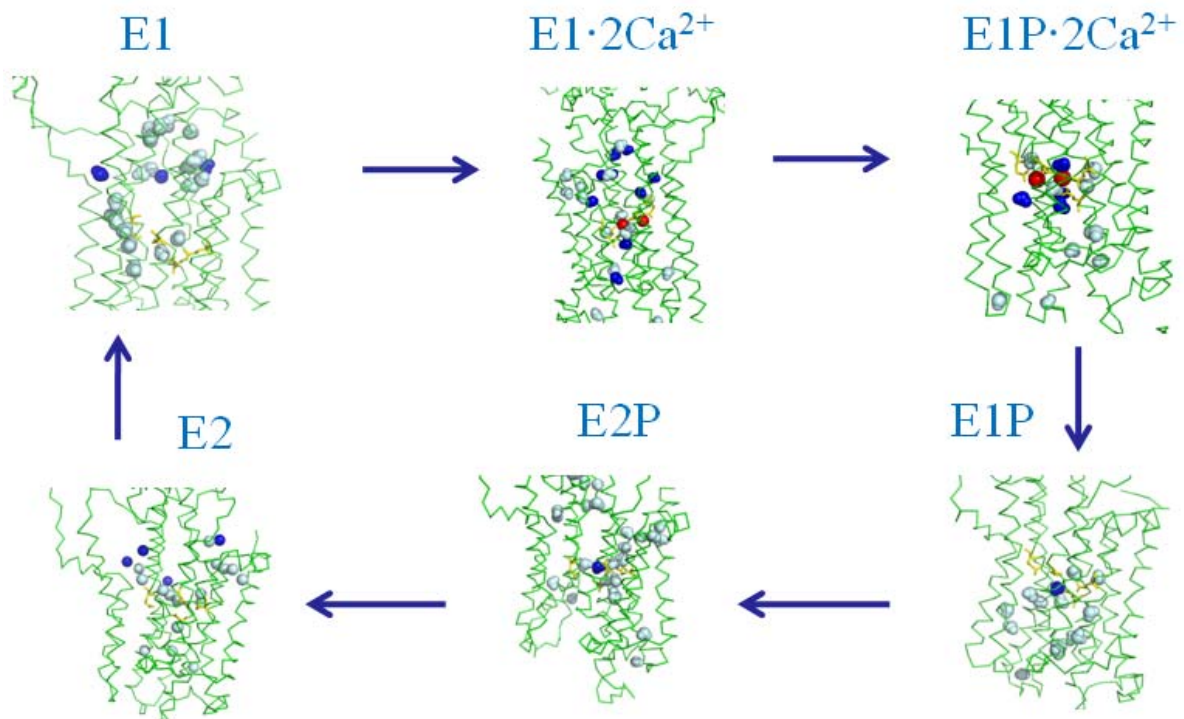


**Abb. 66:** Lage der Aminosäuren, deren pK-Wert über zwei pK-Einheiten verschoben ist. **Links:** Die Lage der Aminosäuren, deren pK-Wert in den pK-Bereich von 6 - 8 verschoben ist. Die grün markierte Aminosäure ist im E2P-Zustand verschoben, blau markierte im E1P-Zustand. **Rechts:** Lage aller Aminosäuren mit verschobenen pK-Werten (rot) und der berechneten protonierten Wassermoleküle in den verschiedenen Enzymzuständen (orange, grün und blau).

Im E2P-Zustand besitzt die Aminosäure Glu 90 einen pK-Wert von 7. Da diese am Calciumausgang und damit an einem möglichen Eingang der Protonen liegt, ist diese Verschiebung wichtig für die Aufnahme der Protonen aus dem Lumen, welche im E2P-Zustand stattfindet. Die Aminosäuren, die im E1P-Zustand der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase verschobene pK-Werte aufweisen, liegen an einem möglichen Ausgang der Protonen zum Cytoplasma. Daher können diese wichtig für die Abgabe der Protonen in das Cytoplasma sein, welche im E1P-Zustand stattfindet.

### 5.2.9 Zusammenfassung des Protonentransportes in der $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase

Zur Aufklärung eines möglichen Protonenweges durch den Transmembranbereich der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase wurden in sechs verschiedene Enzymzustände der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase explizite Wassermoleküle eingefügt. In der folgenden Abbildung sind für die verschiedenen Zustände E1, E1·2  $\text{Ca}^{2+}$ , E1P·2  $\text{Ca}^{2+}$  und E2 alle prinzipiell möglichen Protonierungen durch dunkelblaue Wassermoleküle hervorgehoben. Diese liegen aber nur zu einem Bruchteil und bei verschiedenen pH-Werten vor, d.h. alle möglichen berechneten Protonierungen finden nicht gleichzeitig statt. Anhand dieser berechneten Protonierungsmöglichkeiten der eingefügten Wassermoleküle konnte ein möglicher Protonenweg identifiziert werden.



**Abb. 67:** Protonierung der expliziten Wassermoleküle in den verschiedenen Enzymzuständen. Die Calciumliganden sind gelb, die eingefügten Wassermoleküle hellblau, die Calciumionen rot und die teilweise protonierten Wassermoleküle blau markiert. Im E1P-Zustand findet eine Protonierung in der Nähe der 1. Bindestelle statt. Diese wird auch für den E2P-Zustand beibehalten, bis Protonen aus dem Lumen in den Calciumkanal eintreten. Im E2-Zustand sind die möglichen Protonierungen zum cytoplasmatischen Membranbereich verschoben. Die Protonierungssituation im E1-Zustand ist vergleichbar mit der des E2-Zustandes. Im E1·2  $\text{Ca}^{2+}$ -Zustand liegt eine Verteilung der Protonierungsmöglichkeiten über den ganzen Membranbereich vor, bis die Protonen ins Cytoplasma abgegeben sind und sich im E1P·2  $\text{Ca}^{2+}$ -Zustand die aus dem Lumen transportierten Protonen um die Bindestelle anlagern.

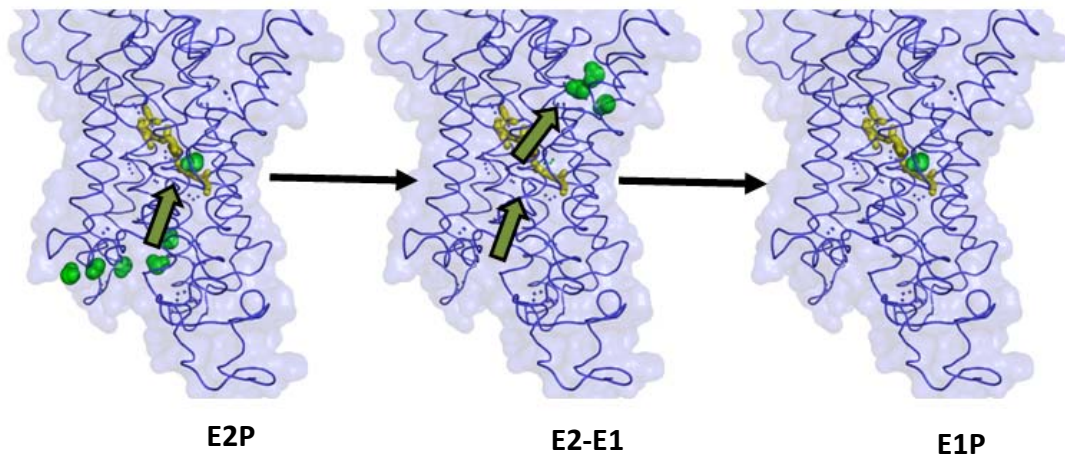
Im Enzymzustand E1P (pdb-Dateien: 1T5T und 2ZBD) findet in allen Simulationen eine Protonierung in der Nähe der 1. Bindestelle statt (Abb. 67). Diese stimmt mit dem postulierten protonierten Wassermolekül, dem "Wasser V", überein (Abb. 18).

Die berechnete Protonierung in der Bindestelle lässt sich in den Elektrostatik-Rechnungen neutralisieren, wodurch die Protonierung auf andere Wassermoleküle in der Calciumbindestelle übertragen werden kann. Im Enzymzustand E2P lässt sich erneut dieselbe Protonierung eines expliziten Wassermoleküls in der Umgebung der 1. Calciumbindestelle feststellen (Abb. 67). Dies gilt sowohl für die Struktur, bei der dieser Kanal geschlossen ist, als auch für die Struktur mit dem offenen Kanal zum Lumen hin. Weiterhin können viele Protonierungen sowohl im als auch am Zugang des Kanals festgestellt werden. Wie auch bei der E1P-Struktur ist es möglich, durch gezielt festgesetzte Protonierungen, die Protonierung weiterer Wassermoleküle zu bewirken. Es lässt sich dadurch ein protoniertes Wassermolekül innerhalb der 1. Bindestelle, wie es im E1P-Zustand vorliegt, induzieren. Dieses besitzt die gleiche Lage wie das Wasser 1 in den Elektrostatik-Rechnungen am E1P-Zustand (Abb. 48).

Im E2-Zustand des Proteins ist erkennbar, dass sich die vorhergehenden Protonierungen aus der 1. Bindestelle heraus nach oben verlagern. Die Protonierungen sind vor allem zu der Wasserkavität im cytoplasmatischen Transmembranbereich hin verschoben (Abb. 67). Diese berechneten Protonierungen stimmen mit den postulierten Wassern VI und VII überein (Abb. 18). Insgesamt liegen auch in diesem Zustand nur sehr wenige Protonierungen vor, die sich innerhalb des Transmembranbereiches befinden.

Im E1-Zustand sind zwei deutlich unterschiedliche Protonierungszustände der Wassermoleküle zu erkennen. Entfernt man die Calciumionen aus der Bindestelle, so treten protonierte Wassermoleküle nur oberhalb der Calciumbindestellen im *stalk*-Bereich auf. Berücksichtigt man die Calciumionen in den Elektrostatik-Rechnungen, so verteilen sich die Protonierungen über den gesamten Transmembranbereich. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass durch das Entfernen der Calciumionen ein transienter Enzymzustand geschaffen wird, der vom Protonierungsverhalten dem E2-Zustand ähnelt. Spekulativ lassen die ausgeführten Rechnungen den Schluss zu, dass der Protonentransfer nicht durch einen linearen Transport der Protonen, beginnend im Lumen durch den Transmembranbereich ins Cytoplasma, erfolgt. Wahrscheinlicher ist ein mehrstufiger Prozess, an dem Protonen in verschiedenen Transmembranbereichen der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase beteiligt sind.



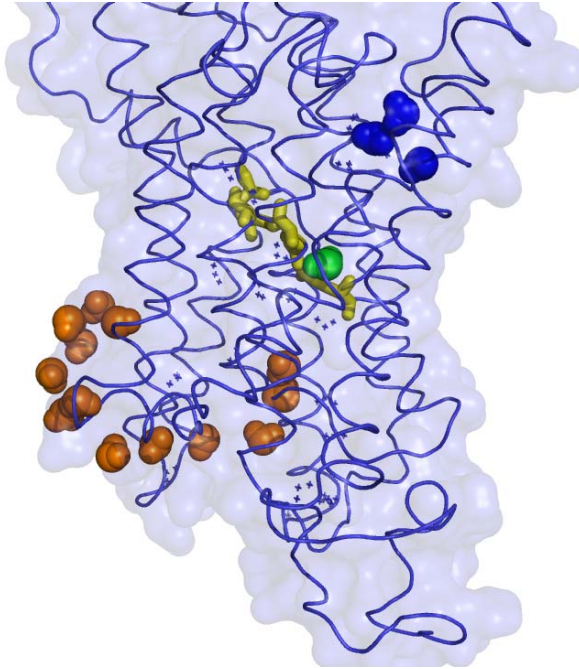


**Abb. 68:** Mehrstufiger Prozess des Protonengegentransportes schematisch dargestellt. Im E2P-Zustand (links) kann eine Ansammlung von Protonen um die Calciumbindestellen festgestellt werden, die bei Dissoziation der Calciumionen ins Lumen an die negativ geladenen Calciumliganden binden. Ebenfalls können durch die Öffnung des Calciumkanals zum Lumen, Protonen in die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase eintreten. Bei dem Übergang aus dem E2- in den E1-Zustand (mitte) werden die Protonen Richtung Cytoplasma transportiert, während die aus dem Lumen aufgenommen Protonen durch den Transmembranbereich zu den Calciumbindestellen transportiert werden. Diese werden dann wieder im E1P-Zustand um die Calciumbindestellen angelagert (rechts).

Beginnt man im E2P-Zustand, so kann eine Ansammlung von Protonen um die Calciumbindestellen beobachtet werden. Diese Protonenanlagerung um die Calciumliganden kann beim Dissoziieren der Calciumionen an die negativ geladenen Calciumliganden abgegeben werden. Dieser Vorgang hat eine weitreichende Bedeutung für den Reaktionsmechanismus und für die Stabilität der Struktur. Somit ist es möglich, dass beim Verlassen der Calciumionen aus den negativ geladenen Calciumbindestellen diese sofort durch die vorliegenden Protonen neutralisiert werden können. Bei der Dissoziation der Calciumionen und dem damit verbundenen Öffnen des Kanals zum Lumen können Protonen, die sich um die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase angelagert haben, durch den Kanal zu den Calciumliganden transportiert werden. Nach Schließen des zum Lumen gewandten Calciumkanals durch konformelle Wechsel des Proteins vom E2- in den E1-Zustand können die an den Calciumliganden gebundenen Protonen an das Cytoplasma abgegeben werden, bevor die Calciumbindestellen wieder mit neuen Calciumionen aus dem Cytoplasma besetzt werden. Dieses Protonierungsverhalten lässt sich in den Strukturdaten des Calcium-freien E2-Zustandes und im E1-Zustand, in dem die Calciumionen nicht berücksichtigt sind, beobachten. Betrachtet man den Calcium-gebundenen E1-Zustand, so können nun wieder Protonen, die aus dem Lumen nachgewandert sind, sich um die Calciumbindestelle anlagern. Es lässt sich vermuten, dass die Protonen durch die Wassermoleküle in die Calciumbindestellen transportiert werden und zwischen dem E1P- und dem E2P-Zustand an die Liganden abgegeben werden. Diese können dann nach erneutem Eintritt von Calciumionen mittels Wassermoleküle zum Cytoplasma transportiert werden.



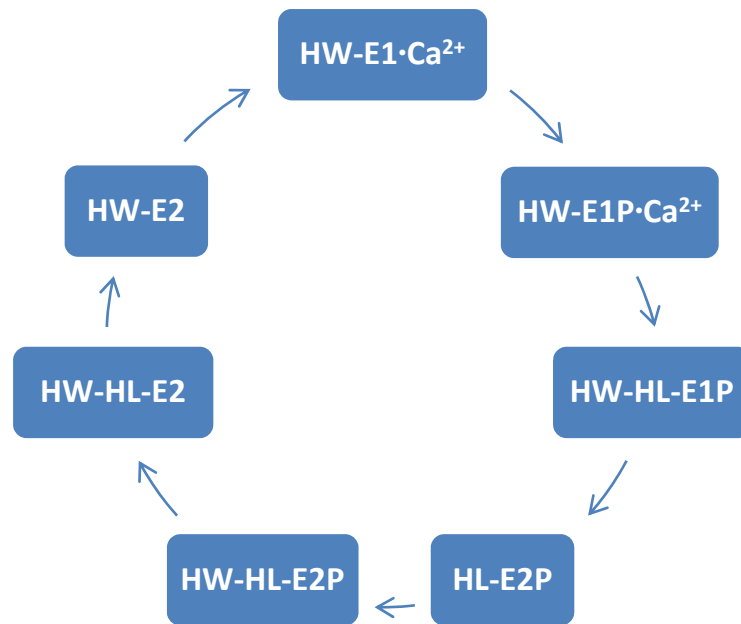
Abb. 69 zeigt die verschiedenen Protonierungsbereiche während der unterschiedlichen Enzymzustände der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. Die zeitlich nacheinander ablaufenden Protonierungen in diesen Enzymzuständen sind farblich markiert.



**Abb. 69:** Protonierungen in den Zuständen E1P (grün), E2P (orange) und E2 (blau).

Der Ablauf beginnt mit der Protonierung von einem Wassermolekül in der 1. Bindestelle während des E1P-Zustandes (grün), geht dann über in den offenen Kanal des E2P Zustandes (orange) und endet im E2 Zustand (blau). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass für jeden Enzymzustand verschiedene, spezifische Protonierungen vorliegen und dass bei allen Simulationen nur Protonierungen und keine Deprotonierungen der Wassermoleküle auftreten.

Ausgehend von bisherigen Modellen des Protonentransports war anzunehmen, dass die Protonen erst während der Calciumdissoziation durch den Transmembranbereich transportiert werden (Yamaguchi und Kanazawa 1985). Die durchgeführten Simulationen an den verschiedenen Enzymzuständen der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase lassen aber vermuten, dass dies nicht der Fall ist, sondern der Protonentransport in mehreren Schritten abläuft. Vor allem lässt sich vermuten, dass im E1-Zustand 2-3 Protonen im Protein an Wassermoleküle gebunden vorliegen (sowohl bei der Bindung von Calciumionen als auch ohne Calciumionen).



**Abb. 70:** Schematisierter Reaktionszyklus der Ca<sup>2+</sup>-ATPase mit vorliegenden Protonierungen in den verschiedenen Enzymzuständen. HW sind die Protonen die an Wassermoleküle gebunden sind und HL die Protonen, die an die Calciumliganden gebunden sind.

Die Dissoziation der Calciumionen und die damit verbundene Öffnung des Calciumkanals ermöglicht einen Protonentransport vom Lumen zu den Calciumbindestellen. Verlassen die Calciumionen die Calciumbindestelle, so können die Protonen, welche um die Calciumliganden angelagert sind diese neutralisieren. Danach können bei Eintritt von neuen Calciumionen aus dem Cytoplasma die Protonen ins Cytoplasma abgegeben werden und die Protonen, die aus dem Lumen transportiert wurden, wiederum an die Calciumliganden angelagert werden.

Ein Wechsel der Protonen von den Wassermolekülen zu den Calciumliganden erfolgt somit mit dem Übergang aus dem E1P·2Ca<sup>2+</sup>-Zustand in den E2-P Zustand (Abb. 70).

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Die Funktion von P-Typ-ATPasen ist die Basis für eine Vielzahl zellulärer Transportprozesse. Um diese verstehen zu können, ist es von entscheidender Bedeutung, die molekularen Mechanismen zu untersuchen, auf denen diese Prozesse beruhen. Die Untersuchung dieser Phänomene erfordert Methoden, die auf molekularer Ebene Einblick in die Vorgänge geben können. Dafür werden zunehmend auch computergestützte Verfahren verwendet, die in dieser Arbeit zur Untersuchung zweier elementarer Vorgänge in P-Typ-ATPasen eingesetzt wurden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde mit Elektrostatik-Rechnungen und molekulardynamischen Simulationen der Mechanismus der Energietransduktion in P-Typ-ATPasen im Allgemeinen und der Mechanismus des Protonengegentransports in der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase im Speziellen untersucht.

Für den aktiven Transport von Ionen muss Energie aufgewendet werden. Die im cytoplasmatischen Teil des Proteins gewonnene Energie muss zur räumlich entfernten transmembranen Ionenbindungsstelle übertragen werden. Dieser Energietransduktionsmechanismus wurde mittels einer Kombination von Elektrostatik-Rechnungen und MD-Simulationen an zwei Mitgliedern der P-Typ-ATPasen Familie, der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase und der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, untersucht.

Zunächst wurden Elektrostatik-Rechnungen durchgeführt, um den Einfluss eines elektrischen Feldes auf die verschiedenen Transmembranhelices zu analysieren. Dazu wurde ein Simulationssystem entwickelt, welches aus einem molekularen Kondensator besteht, der im Simulationsmodell das Anlegen eines homogenen elektrischen Feldes über den Transmembranbereich nachbildet. Da es sich bei dem Energietransduktionsmechanismus um einen dynamischen Prozess handelt, wurden die Elektrostatik-Rechnungen um Molekular-Dynamik-Simulationen erweitert. Durch diese Erweiterung konnte die elektrische Feldstärke, die in den Elektrostatik-Rechnungen erforderlich war, reduziert und den physiologischen Werten angenähert werden. Aufgrund von Spannungsklemmen-Fluorometrie-Experimenten, bei denen eine Spannung über die Membran angelegt wird, besteht die Vermutung, dass der Helix M5+S5 die Funktion als Energietransduktionselement zukommt. Diese experimentell gefundene Vermutung konnte mit Hilfe der Simulationsrechnungen für verschiedene Enzymzustände der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase und für die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase bestätigt werden. Dabei zeigte sich, dass auf der Helix M5+S5 die meisten Rotameränderungen durch das simulierte elektrische Feld induziert werden, aber auch Ionisierungsänderungen wichtig sind.

In der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase findet während des Transports der Calciumionen ein Protonengegentransport statt, für den bisher nicht eindeutig festgestellt werden konnte, zu welchem Zweck diese Protonen transportiert werden und wie der Transport durch das Protein stattfindet. Zur Untersuchung dieses Mechanismus wurden in sechs verschiedenen Enzymzuständen der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase explizite

Wassermoleküle eingefügt. Der Protonengegentransport verläuft über titrierbaren Aminosäuren, aber sehr wahrscheinlich sind zudem intramolekulare Wassermoleküle beteiligt. Mittels Elektrostatik-Rechnungen wurde der Protonierungszustand der eingefügten Wassermoleküle sowie der titrierbaren Aminosäuren für verschiedene Enzymzustände der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase bestimmt. Aus den Elektrostatik-Rechnungen kann geschlossen werden, dass der Protonentransfer nicht durch einen linearen Transport der Protonen, beginnend im Lumen durch den Transmembranbereich ins Cytoplasma, erfolgt. Es handelt sich vielmehr um einen mehrstufigen Prozess, an dem Protonen in verschiedenen Transmembranbereichen der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase beteiligt sind. Anhand der berechneten Protonierungszustände der eingefügten Wassermoleküle und der pK-Werte der Aminosäuren im Transmembranbereich konnte ein möglicher Protonenweg identifiziert werden.

In dieser Arbeit wurden zum ersten Mal zwei molekulare Mechanismen der P-Typ-ATPasen mit Hilfe von Elektrostatik-Rechnungen und MD-Simulationen untersucht und analysiert. Dadurch konnte die aus Experimenten vermutete Rolle der Helix M5+S5 als wichtigstes Energietransduktionselement in P-Typ-ATPasen bestätigt werden und ein möglicher Protonentransportmechanismus in der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase postuliert werden.

## 7 LITERATUR

- Albers, R.W.** (1967) *Biochemical Aspects of Active Transport*. Annual Review of Biochemistry, 36, 727-756.
- Alder, B.J. und Wainwright, T.E.** (1957) *Phase Transition for A Hard Sphere System*. Journal of Chemical Physics, 27, 1208-1209.
- Alexov, E.G. und Gunner, M.R.** (1997) *Incorporating protein conformational flexibility into the calculation of pH-dependent protein properties*. Biophysical Journal, 72, 2075-2093.
- Andersen, J.P. und Vilsen, B.** (1994) *Amino-Acids Asn(796) and Thr(799) of the Ca<sup>2+</sup>-Atpase of Sarcoplasmic-Reticulum Bind Ca<sup>2+</sup> at Different Sites*. Journal of Biological Chemistry, 269, 15931-15936.
- Andersson, J., Hauser, K., Karjalainen, E.L. und Barth, A.** (2008) *Protonation and hydrogen bonding of Ca<sup>2+</sup> site residues in the E2P phosphoenzyme intermediate of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase studied by a combination of infrared Spectroscopy and electrostatic calculations*. Biophysical Journal, 94, 600-611.
- Antosiewicz, J., Mccammon, J.A. und Gilson, M.K.** (1996) *The determinants of pKas in Proteins*. Biochemistry, 35, 7819-7833.
- Atkins, P.W.**, (2006) *Physikalische Chemie*, Wiley-VCH
- Bahar, I., Lezon, T.R., Bakan, A. und Shrivastava, I.H.** (2010) *Normal Mode Analysis of Biomolecular Structures: Functional Mechanisms of Membrane Proteins*. Chemical Reviews, 110, 1463-1497.
- Baker, N.A.** (2005) *Improving implicit solvent simulations: a Poisson-centric view*. Current opinion in structural biology, 15, 137-143.
- Barth, A.** (2008) *Structural dynamics of the Ca<sup>2+</sup>-ATPase studied by time-resolved infrared spectroscopy*. Spectroscopy-An International Journal, 22, 63-82.
- Bartlett, G.J., Porter, C.T., Borkakoti, N. und Thornton, J.M.** (2002) *Analysis of catalytic residues in enzyme active sites*. Journal of Molecular Biology, 324, 105-121.
- Bashford, D.** (2004) *Macroscopic electrostatic models for protonation states in proteins*. Frontiers in Bioscience, 9, 1082-1099.
- Bashford, D. und Case, D.A.** (2000) *Generalized born models of macromolecular solvation effects*. Annual Review of Physical Chemistry, 51, 129-152.
- Bashford, D. und Karplus, M.** (1990) *Pkas of Ionizable Groups in Proteins - Atomic Detail from A Continuum Electrostatic Model*. Biochemistry, 29, 10219-10225.
- Bates, P.A., Kelley, L.A., MacCallum, R.M. und Sternberg, M.J.E.** (2001) *Enhancement of protein modeling by human intervention in applying the automatic programs 3D-JIGSAW and 3D-PSSM*. Proteins-Structure Function and Genetics, 39-46.
- Bedeaux, D. und Kjelstrup, S.** (2008) *The measurable heat flux that accompanies active transport by Ca<sup>2+</sup>-ATPase*. Physical Chemistry Chemical Physics, 10, 7304-7317.
- Berendsen, H.J.C., Vanderspoel, D. und Vandrunen, R.** (1995) *Gromacs - A Message-Passing Parallel Molecular-Dynamics Implementation*. Computer Physics Communications, 91, 43-56.
- Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N. und Bourne, P.E.** (2000) *The Protein Data Bank*. Nucleic Acids Research, 28, 235-242.

- Boeckmann,B., Bairoch,A., Apweiler,R., Blatter,M.C., Estreicher,A., Gasteiger,E., Martin,M.J., Michoud,K., O'Donovan,C., Phan,I., Pilbout,S. und Schneider,M. (2003) *The SWISS-PROT protein knowledgebase and its supplement TrEMBL in 2003*. Nucleic Acids Research, 31, 365-370.
- Bourne,P. und Weissig,H. (2003) *Structural bioinformatics*. Wiley-Liss.
- Brandl,C.J., Green,N.M., Korczak,B. und MacLennan,D.H. (1986) *2 Ca<sup>2+</sup> Atpase Genes - Homologies and Mechanistic Implications of Deduced Amino-Acid-Sequences*. Cell, 44, 597-607.
- Brooks,B.R., Brooks,C.L., Mackerell,A.D., Nilsson,L., Petrella,R.J., Roux,B., Won,Y., Archontis,G., Bartels,C., Boresch,S., Caflich,A., Caves,L., Cui,Q., Dinner,A.R., Feig,M., Fischer,S., Gao,J., Hodoscek,M., Im,W., Kuczera,K., Lazaridis,T., Ma,J., Ovchinnikov,V., Paci,E., Pastor,R.W., Post,C.B., Pu,J.Z., Schaefer,M., Tidor,B., Venable,R.M., Woodcock,H.L., Wu,X., Yang,W., York,D.M. und Karplus,M. (2009) *CHARMM: The Biomolecular Simulation Program*. Journal of Computational Chemistry, 30, 1545-1614.
- Brooks,B.R., Bruccoleri,R.E., Olafson,B.D., States,D.J., Swaminathan,S. und Karplus,M. (1983) *Charmm - A Program for Macromolecular Energy, Minimization, and Dynamics Calculations*. Journal of Computational Chemistry, 4, 187-217.
- Bublitz,M., Poulsen,H., Morth,J.P. und Nissen,P. (2010) *In and out of the cation pumps: P-Type ATPase structure revisited*. Current opinion in structural biology, 20, 431-439.
- Buch-Pedersen,M.J., Pedersen,B.P., Veierskov,B., Nissen,P. und Palmgren,M.G. (2009) *Protons and how they are transported by proton pumps*. Pflugers Archiv-European Journal of Physiology, 457, 573-579.
- Carpenter,E.P., Beis,K., Cameron,A.D. und Iwata,S. (2008) *Overcoming the challenges of membrane protein crystallography*. Current opinion in structural biology, 18, 581-586.
- Case,D.A., Cheatham,T.E., Darden,T., Gohlke,H., Luo,R., Merz,K.M., Onufriev,A., Simmerling,C., Wang,B. und Woods,R.J. (2005) *The Amber biomolecular simulation programs*. Journal of Computational Chemistry, 26, 1668-1688.
- Cha,A. und Bezannila,F. (1998) *Structural implications of fluorescence quenching in the Shaker K<sup>+</sup> channel*. Journal of General Physiology, 112, 391-408.
- Chenna,R., Sugawara,H., Koike,T., Lopez,R., Gibson,T.J., Higgins,D.G. und Thompson,J.D. (2003) *Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs*. Nucleic Acids Research, 31, 3497-3500.
- Chiesi,M. und Inesi,G. (1981) *Mg<sup>2+</sup> and Mn<sup>2+</sup> Modulation of Ca<sub>2+</sub> Transport and Atpase Activity in Sarcoplasmic-Reticulum Vesicles*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 208, 586-592.
- Clarke,D.M., Loo,T.W., Inesi,G. und MacLennan,D.H. (1989) *Location of High-Affinity Ca<sup>2+</sup>-Binding Sites Within the Predicted Transmembrane Domain of the Sarcoplasmic-Reticulum Ca<sup>2+</sup>-Atpase*. Nature, 339, 476-478.
- Clarke,R.J. (2001) *The dipole potential of phospholipid membranes and methods for its detection*. Advances in Colloid and Interface Science, 89, 263-281.
- Connolly,M.L. (1983) *Solvent-Accessible Surfaces of Proteins and Nucleic-Acids*. Science, 221, 709-713.
- Costa,V. und Carloni,P. (2003) *Calcium, binding to the transmembrane domain of the sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase: Insights from molecular modeling*. Proteins-Structure Function and Genetics, 50, 104-113.
- Creighton,T. (1993) *Proteins*. Freeman.
- Cukierman,S. (2006) *Et tu, Grothuss! and other unfinished stories*. Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics, 1757, 876-885.

- Dacosta,A.G. und Madeira,V.M.C.** (1994) *Proton Ejection As A Major Feature of the Ca<sup>2+</sup>-Pump*. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1189, 181-188.
- Daiho,T., Yamasaki,K., Danko,S. und Suzuki,H.** (2007) *Critical role of glu(40)-ser(48) loop linking actuator domain and first transmembrane helix of Ca<sup>2+</sup>-ATPase in Ca<sup>2+</sup> deocclusion and release from ADP-insensitive phosphoenzyme*. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 34429-34447.
- Daiho,T., Yamasaki,K., Wang,G.L., Danko,S., Iizuka,H. und Suzuki,H.** (2003) *Deletions of any single residues in Glu(40)-Ser(48) loop connecting a domain and the first transmembrane helix of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase result in almost complete inhibition of conformational transition and hydrolysis of phosphoenzyme intermediate*. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 39197-39204.
- Davis,M.E. und Mccammon,J.A.** (1990) *Electrostatics in Biomolecular Structure and Dynamics*. *Chemical Reviews*, 90, 509-521.
- Davis,M.E., Madura,J.D., Luty,B.A. und Mccammon,J.A.** (1991) *Electrostatics and Diffusion of Molecules in Solution - Simulations with the University-Of-Houston-Brownian Dynamics Program*. *Computer Physics Communications*, 62, 187-197.
- de Groot,B., Böckmann,R. und Grubmüller,H.** (2006) *Molekulare Nanomaschinen unter der Lupe*. *Physik in unserer Zeit*, 37, 73-79.
- Dempski,R.E., Friedrich,T. und Bamberg,E.** (2009) *Voltage clamp fluorometry: Combining fluorescence and electrophysiological methods to examine the structure-function of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase*. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 1787, 714-720.
- Deye,J., Elam,C., Lape,M., Ratliff,R., Evans,K. und Paula,S.** (2009) *Structure-based virtual screening for novel inhibitors of the sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase and their experimental evaluation*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17, 1353-1360.
- Feig,M. und Brooks,C.L.** (2004) *Recent advances in the development and application of implicit solvent models in biomolecule simulations*. *Current opinion in structural biology*, 14, 217-224.
- Fogolari,F., Brigo,A. und Molinari,H.** (2002) *The Poisson-Boltzmann equation for biomolecular electrostatics: a tool for structural biology*. *Journal of Molecular Recognition*, 15, 377-392.
- Forge,V., Mintz,E. und Guillain,F.** (1993) *Ca<sup>2+</sup> Binding to Sarcoplasmic-Reticulum Atpase Revisited Mechanism of Affinity and Cooperativity Modulation by H<sup>+</sup> and Mg<sup>2+</sup>*. *Journal of Biological Chemistry*, 268, 10953-10960.
- Forsyth,W.R., Antosiewicz,J.M. und Robertson,A.D.** (2002) *Empirical relationships between protein structure and carboxyl pK(a) values in proteins*. *Proteins-Structure Function and Genetics*, 48, 388-403.
- Franzini-Armstrong,C. und Ferguson,D.G.** (1985) *Density and Disposition of Ca<sup>2+</sup>-Atpase in Sarcoplasmic-Reticulum Membrane As Determined by Shadowing Techniques*. *Biophysical Journal*, 48, 607-615.
- Freddolino,P.L., Arkhipov,A.S., Larson,S.B., McPherson,A. und Schulten,K.** (2006) *Molecular dynamics simulations of the complete satellite tobacco mosaic virus*. *Structure*, 14, 437-449.
- Gatto,C., Lutsenko,S., Shin,J.M., Sachs,G. und Kaplan,J.H.** (1999) *Stabilization of the H,K-ATPase M5M6 membrane hairpin by K<sup>+</sup> ions - Mechanistic significance for P-2-type ATPases*. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 13737-13740.
- Geibel,S., Kaplan,J.H., Bamberg,E. und Friedrich,T.** (2003) *Conformational dynamics of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase probed by voltage clamp fluorometry*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 964-969.
- Georgescu,R.E., Alexov,E.G. und Gunner,M.R.** (2002) *Combining conformational flexibility and continuum electrostatics for calculating pKas in proteins*. *Biophysics Journal*, 83, 1731-1748.

- Gilson, M.K., Rashin, A., Fine, R. und Honig, B.** (1985) *On the Calculation of Electrostatic Interactions in Proteins*. Journal of Molecular Biology, 184, 503-516.
- Green, N.M. und MacLennan, D.H.** (1989) *Atp Driven Ion Pumps - An Evolutionary Mosaic*. Biochemical Society Transactions, 17, 819-822.
- Gu, W. und Helms, V.** (2009) *Tightly Connected Water Wires Facilitate Fast Proton Uptake at The Proton Entrance of Proton Pumping Proteins*. Journal of the American Chemical Society, 131, 2080-2081.
- Guex, N. und Peitsch, M.C.** (1997) *SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling*. Electrophoresis, 18, 2714-2723.
- Gunner, M.R. und Alexov, E.** (2000) *A pragmatic approach to structure based calculation of coupled proton and electron transfer in proteins*. Biochimica et Biophysica Acta, 1458, 63-87.
- Gunner, M.R., Mao, J.J., Song, Y.F. und Kim, J.** (2006) *Factors influencing the energetics of electron and proton transfers in proteins. What can be learned from calculations?* Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics, 1757, 942-968.
- Hauser, K.** (2006) *Electrostatic calculations for assignment of infrared difference bands to carboxyl groups getting protonated during protein reactions*. Biopolymers, 82, 430-434.
- Hauser, K. und Barth, A.** (2007) *Side-chain protonation and mobility in the sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase: Implications for proton countertransport and  $Ca^{2+}$  release*. Biophysical Journal, 93, 3259-3270.
- Hermans, J., Berendsen, H.J.C., Vangunsteren, W.F. und Postma, J.P.M.** (1984) *A Consistent Empirical Potential for Water-Protein Interactions*. Biopolymers, 23, 1513-1518.
- Holst, M.J. und Saied, F.** (1995) *Numerical-Solution of the Nonlinear Poisson-Boltzmann Equation - Developing More Robust and Efficient Methods*. Journal of Computational Chemistry, 16, 337-364.
- Honig, B. und Nicholls, A.** (1995) *Classical Electrostatics in Biology and Chemistry*. Science, 268, 1144-1149.
- Honig, B., Sharp, K. und Yang, A.S.** (1993) *Macroscopic Models of Aqueous-Solutions - Biological and Chemical Applications*. Journal of Physical Chemistry, 97, 1101-1109.
- Huang, Y.Q., Li, H.F. und Bu, Y.X.** (2009) *Molecular Dynamics Simulation Exploration of Cooperative Migration Mechanism of Calcium Ions in Sarcoplasmic Reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase*. Journal of Computational Chemistry, 30, 2136-2145.
- Humphrey, W., Dalke, A. und Schulten, K.** (1996) *VMD: Visual molecular dynamics*. Journal of Molecular Graphics, 14, 33-38.
- Inesi, G.** (1987) *Sequential Mechanism of Calcium-Binding and Translocation in Sarcoplasmic-Reticulum Adenosine-Triphosphatase*. Journal of Biological Chemistry, 262, 16338-16342.
- Inesi, G., Kurzmack, M., Coan, C. und Lewis, D.E.** (1980) *Cooperative Calcium-Binding and Atpase Activation in Sarcoplasmic-Reticulum Vesicles*. Journal of Biological Chemistry, 255, 3025-3031.
- Jayachandran, G., Vishal, V. und Pande, V.S.** (2006) *Using massively parallel simulation and Markovian models to study protein folding: Examining the dynamics of the villin headpiece*. Journal of Chemical Physics, 124, 164902-164914.
- Jensen, A.M.L., Sorensen, T.L.M., Olesen, C., Moller, J.V. und Nissen, P.** (2006) *Modulatory and catalytic modes of ATP binding by the calcium pump*. Embo Journal, 25, 2305-2314.
- Jorgensen, P.L., Hakansson, K.O. und Karlisch, S.J.D.** (2003) *Structure and mechanism of Na,K-ATPase: Functional sites and their interactions*. Annual Review of Physiology, 65, 817-849.



- Kamerlin,S.C.L., Haranczyk,M. und Warshel,A.** (2009) *Progress in Ab Initio QM/MM Free-Energy Simulations of Electrostatic Energies in Proteins: Accelerated QM/MM Studies of pK(a), Redox Reactions and Solvation Free Energies.* Journal of Physical Chemistry B, 113, 1253-1272.
- Kaplan,J.H.** (2002) *Biochemistry of Na,K-ATPase.* Annual Review of Biochemistry, 71, 511-535.
- Karjalainen,E.L., Hauser,K. und Barth,A.** (2007) *Proton paths in the sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase.* Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics, 1767, 1310-1318.
- Karplus,M. und McCammon,J.A.** (2002) *Molecular dynamics simulations of biomolecules.* Nature Structural Biology, 9, 646-652.
- Kawakami,K., Noguchi,S., Noda,M., Takahashi,H., Ohta,T., Kawamura,M., Nojima,H., Nagano,K., Hirose,T., Inayama,S., Hayashida,H., Miyata,T. und Numa,S.** (1985) *Primary Structure of the Alpha-Subunit of Torpedo-Californica (Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>)Atpase Deduced from Cdna Sequence.* Nature, 316, 733-736.
- Kieseritzky,G. und Knapp,E.W.** (2008) *Optimizing pK(A) computation in proteins with pH adapted conformations.* Proteins-Structure Function and Bioinformatics, 71, 1335-1348.
- Kim,J., Mao,J. und Gunner,MR.** (2005) *Are acidic and basic groups in buried proteins predicted to be ionized?* Journal Molecular Biology, 348, 1283-1298.
- Kjelstrup,S., Barragan,D. und Bedeaux,D.** (2009) *Coefficients for Active Transport and Thermogenesis of Ca<sup>2+</sup>-ATPase Isoforms.* Biophysical Journal, 96, 4376-4386.
- Kjelstrup,S., de Meis,L., Bedeaux,D. und Simon,J.M.** (2008) *Is the Ca<sup>2+</sup>-ATPase from sarcoplasmic reticulum also a heat pump?* European Biophysics Journal with Biophysics Letters, 38, 59-67.
- Klein,M.L. und Shinoda,W.** (2008) *Large-scale molecular dynamics simulations of self-assembling systems.* Science, 321, 798-800.
- Koehl,P.** (2006) *Electrostatics calculations: latest methodological advances.* Current opinion in structural biology, 16, 142-151.
- Koenderink,J.B., Geibel,S., Grabsch,E., De Pont,J.J.H.H., Bamberg,E. und Friedrich,T.** (2003) *Two-electrode voltage-clamp analysis of Na,K-ATPase asparagine 776 mutants.* Annals of the New York Academy of Science, 150-154.
- Koenderink,J.B., Geibel,S., Grabsch,E., De Pont,J.J.H.H., Bamberg,E. und Friedrich,T.** (2003) *Electrophysiological analysis of the mutated Na,K-ATPase cation binding pocket.* Journal of Biological Chemistry, 278, 51213-51222.
- Kubala,M.** (2006) *ATP-binding to P-type ATPases as revealed by biochemical, spectroscopic, and crystallographic experiments.* Proteins-Structure Function and Bioinformatics, 64, 1-12.
- Kubala,M., Grycova,L., Lansky,Z., Sklenovsky,P., Janovska,M., Otyepka,M. und Teisinger,J.** (2009) *Changes in Electrostatic Surface Potential of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase Cytoplasmic Headpiece Induced by Cytoplasmic Ligand(s) Binding.* Biophysical Journal, 97, 1756-1764.
- Kühlbrandt , W.** (2004) *Biology, Structure and Mechanism of P-type ATPases.* Nature, 5, 282-295.
- Lape,M., Elam,C., Versluis,M., Kempton,R. und Paula,S.** (2008) *Molecular determinants of sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase inhibition by hydroquinone-based compounds.* Proteins-Structure Function and Bioinformatics, 70, 639-649.
- Laursen,M., Bublitz,M., Moncoq,K., Olesen,C., Moller,J.V., Young,H.S., Nissen,P. und Morth,J.P.** (2009) *Cyclopiazonic Acid Is Complexed to a Divalent Metal Ion When Bound to the Sarcoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase.* Journal of Biological Chemistry, 284, 13513-13518.

- Law,R.J., Munson,K., Sachs,G. und Lightstone,F.C.** (2008) *An ion gating mechanism of gastric H,K-ATPase based on molecular dynamics simulations.* Biophysical Journal, 95, 2739-2749.
- Leach,A.** (2006) *Molecular Modelling principles and applications.* pearson.
- Lee,A.G.** (2002) *A calcium pump made visible.* Current opinion in structural biology, 12, 547-554.
- Lee,A.G. und East,M.** (2001) *What the structure of a calcium pump tell us about its mechanism.* Biochemical Journal, 356, 665-683.
- Lee,F.S., Chu,Z.T. und Warshel,A.** (1993) *Microscopic and Semimicroscopic Calculations of Electrostatic Energies in Proteins by the Polaris and Enzymix Programs.* Journal of Computational Chemistry, 14, 161-185.
- Levy,D., Seigneuret,M., Bluzat,A. und Rigaud,J.L.** (1990) *Evidence for Proton Countertransport by the Sarcoplasmic-Reticulum  $Ca^{2+}$ -Atpase During Calcium-Transport in Reconstituted Proteoliposomes with Low Ionic Permeability.* Journal of Biological Chemistry, 265, 19524-19534.
- Li,G.H. und Cui,Q.** (2002) *A coarse-grained normal mode approach for macromolecules: An efficient implementation and application to  $Ca^{2+}$ -ATPase.* Biophysical Journal, 83, 2457-2474.
- Li,H., Robertson,A.D. und Jensen,J.H.** (2005) *Very fast empirical prediction and rationalization of protein pK(a) values.* Proteins-Structure Function and Bioinformatics, 61, 704-721.
- Lindahl,E., Hess,B. und Van der Spoel,D.** (2001) *GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis.* Journal of Molecular Modeling, 7, 306-317.
- Lingrel,J.B. und Kuntzweiler,T.** (1994)  *$Na^+,K^+$ -ATPase.* Journal of Biological Chemistry, 269, 19659-19662.
- Lutsenko,S., Anderko,R. und Kaplan,J.H.** (1995) *Membrane Disposition of the M5-M6 Hairpin of  $Na^+,K^+$ -ATPase Alpha-Subunit Is Ligand-Dependent.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 92, 7936-7940.
- MacLennan,D.H., Brandl,C.J., Korczak,B. und Green,N.M.** (1985) *Amino-Acid-Sequence of A  $Ca^{2+} + Mg^{2+}$ -Dependent ATPase from Rabbit Muscle Sarcoplasmic-Reticulum, Deduced from Its Complementary-Dna Sequence.* Nature, 316, 696-700.
- Mandal,A.K., Mikhailova,L. und Arguello,J.M.** (2003) *The Na,K-ATPase S5-H5 helix - Structural link between phosphorylation and cation-binding sites.* Annals of the New York Academy of Science, 224-225.
- Mannuzzu,L.M., Moronne,M.M. und Isacoff,E.Y.** (1996) *Direct physical measure of conformational rearrangement underlying potassium channel gating.* Science, 271, 213-216.
- Mao,J.J., Hauser,K. und Gunner,M.R.** (2003) *How cytochromes with different folds control heme redox potential.* Biochemistry, 42, 9829-9840.
- Martin,D.W. und Tanford,C.** (1981) *Phosphorylation of Calcium Adenosine-Triphosphatase by Inorganic-Phosphate - Vanthoff Analysis of Enthalpy Changes.* Biochemistry, 20, 4597-4602.
- Martin,R.B.** (1992) *Cooperative Proton and Calcium-Binding by Sarcoplasmic-Reticulum Atpase.* Febs Letters, 308, 59-61.
- Martonosi,A.N.** (1995) *The structure and interactions of  $Ca^{2+}$ -ATPase.* Bioscience Reports, 15, 263-281.
- McCammom,J.A., Gelin,B.R. und Karplus,M.** (1977) *Dynamics of Folded Proteins.* Nature, 267, 585-590.
- Mintz,E. und Guillain,F.** (1997)  *$Ca^{2+}$  transport by the sarcoplasmic reticulum ATPase.* Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics, 1318, 52-70.

- Moller, J.V., Juul, B. und leMaire, M.** (1996) *Structural organization, ion transport, and energy transduction of P-type ATPases*. *Biochimica et Biophysica Acta-Reviews on Biomembranes*, 1286, 1-51.
- Moller, J.V., Olesen, C., Jensen, A.M.L. und Nissen, P.** (2005) *The structural basis for coupling of  $\text{Ca}^{2+}$  transport to ATP hydrolysis by the sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase*. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 37, 359-364.
- Moller, J.V., Nissen, P., Sorensen, T.L.-M. und le Maire, M.** (2005) *Transport mechanism of the sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase pump*. *Current opinion in structural biology*, 15, 387-393.
- Moncoq, K., Trieber, C.A. und Young, H.S.** (2007) *The molecular basis for cyclopiazonic acid inhibition of the sarcoplasmic reticulum calcium pump*. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 9748-9757.
- Morii, M., Yamauchi, M., Ichikawa, T., Fujii, T., Takahashi, Y., Asano, S., Takeguchi, N. und Sakai, H.** (2008) *Involvement of the  $\text{H}_3\text{O}^+$ -Lys-164-Gln-161-Glu-345 charge transfer pathway in proton transport of gastric  $\text{H}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase*. *Journal of Biological Chemistry*, 283, 16876-16884.
- Morth, J.P., Pedersen, B.P., Toustrup-Jensen, M.S., Sorensen, T.L.M., Petersen, J., Andersen, J.P., Vilsen, B. und Nissen, P.** (2007) *Crystal structure of the sodium-potassium pump*. *Nature*, 450, 1043-1049.
- Müller-Esterl, W.** (2004) *Biochemie: Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler*. Spektrum,
- Murzin, A.G., Brenner, S.E., Hubbard, T. und Chothia, C.** (1995) *Scop - A Structural Classification of Proteins Database for the Investigation of Sequences and Structures*. *Journal of Molecular Biology*, 247, 536-540.
- Nakamura, J.** (1994) *2 Types of Proton-Modulated Calcium-Binding in the Sarcoplasmic-Reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase .2. Characteristics of Their Calcium Bindings*. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 30822-30827.
- Nelson, D.L., Cox, M.M.,** (2000) *Lehninger Principles of Biochemistry*, Palgrave Macmillan
- Nicholls, A. und Honig, B.** (1991) *A Rapid Finite-Difference Algorithm, Utilizing Successive Over-Relaxation to Solve the Poisson-Boltzmann Equation*. *Journal of Computational Chemistry*, 12, 435-445.
- Obara, K., Miyashita, N., Xu, C., Toyoshima, I., Sugita, Y., Inesi, G. und Toyoshima, C.** (2005) *Structural role of countertransport revealed in  $\text{Ca}^{2+}$  pump crystal structure in the absence of  $\text{Ca}^{2+}$* . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 14489-14496.
- Ogawa, H., Shinoda, T., Cornelius, F. und Toyoshima, C.** (2009) *Crystal structure of the sodium-potassium pump ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase) with bound potassium and ouabain*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 13742-13747.
- Ogawa, H., Stokes, D.L., Sasabe, H. und Toyoshima, C.** (1998) *Structure of the  $\text{Ca}^{2+}$  pump of sarcoplasmic reticulum: A view along the lipid bilayer at 9-angstrom resolution*. *Biophysical Journal*, 75, 41-52.
- Olesen, C., Picard, M., Winther, A.M.L., Gyrop, C., Morth, J.P., Oxvig, C., Moller, J.V. und Nissen, P.** (2007) *The structural basis of calcium transport by the calcium pump*. *Nature*, 450, 1036-1045.
- Olesen, C., Sorensen, T.L.M., Nielsen, R.C., Moller, J.V. und Nissen, P.** (2004) *Dephosphorylation of the calcium pump coupled to counterion occlusion*. *Science*, 306, 2251-2255.
- Orlowski, S. und Champeil, P.** (1991) *Kinetics of Calcium Dissociation from Its High-Affinity Transport Sites on Sarcoplasmic-Reticulum ATPase*. *Biochemistry*, 30, 352-361.
- Palmgren, M.G. und Axelsen, K.B.** (1998) *Evolution of P-type ATPases*. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 1365, 37-45.
- Pedersen, P.L.** (2007) *Transport ATPases into the year 2008: a brief overview related to types, structures, functions and roles in health and disease*. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 39, 349-355.

- Pedersen,P.L. und Carafoli,E.** (1987) *Ion Motive Atpases .2. Energy Coupling and Work Output.* Trends in Biochemical Sciences, 12, 186-189.
- Peinelt,C. und Apell,H.A.** (2002) *Kinetics of the  $Ca^{2+}$ ,  $H^+$ , and  $Mg^{2+}$  interaction with the ion-binding sites of the SR Ca-ATPase.* Biophysical Journal, 82, 170-181.
- Phillips,J.C., Braun,R., Wang,W., Gumbart,J., Tajkhorshid,E., Villa,E., Chipot,C., Skeel,R.D., Kale,L. und Schulten,K.** (2005) *Scalable molecular dynamics with NAMD.* Journal of Computational Chemistry, 26, 1781-1802.
- Pieper,U., Eswar,N., Webb,B.M., Eramian,D., Kelly,L., Barkan,D.T., Carter,H., Mankoo,P., Karchin,R., Marti-Renom,M.A., Davis,F.P. und Sali,A.** (2009) *MODBASE, a database of annotated comparative protein structure models and associated resources.* Nucleic Acids Research, 37, D347-D354.
- Post,R.L., Kume,S. und Hegyvary,C.** (1972) *Activation by Adenosine-Triphosphate in Phosphorylation Kinetics of Sodium and Potassium Ion Transport Adenosine-Triphosphatase.* Journal of Biological Chemistry, 247, 6530-6540.
- Pyrkov,T.V., Kosinsky,Y.A., Arseniev,A.S., Priestle,J.P., Jacoby,E. und Efremov,R.G.** (2007) *Docking of ATP to Ca-ATPase: Considering protein domain motions.* Journal of Chemical Information and Modeling, 47, 1171-1181.
- Ren,P.Y. und Ponder,J.W.** (2003) *Polarizable atomic multipole water model for molecular mechanics simulation.* Journal of Physical Chemistry B, 107, 5933-5947.
- Reuter,N., Hinsen,K. und Lacapere,J.J.** (2003) *Transconformations of the SERCA1 Ca-ATPase: A normal mode study.* Biophysical Journal, 85, 2186-2197.
- Rolfe,D.F.S. und Brown,G.C.** (1997) *Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals.* Physiological Reviews, 77, 731-758.
- Roux,B.** (2008) *The Membrane Potential and its Representation by a Constant Electric Field in Computer Simulations.* Biophysical Journal, 95, 4205-4216.
- Scarborough,G.A.** (2002) *Molecular mechanism of the P-type ATPases.* Journal of Bioenergetics and Biomembranes, 34, 235-250.
- Schröder,G.** (2004) *Simulation fluoreszenzspektroskopischer Experimente.*
- Schutz,C.N. und Warshel,A.** (2001) *What axe the dielectric "constants" of proteins and how to validate electrostatic models?* Proteins-Structure Function and Genetics, 44, 400-417.
- Sham,Y.Y., Chu,Z.T., Tao,H. und Warshel,A.** (2000) *Examining methods for calculations of binding free energies: LRA, LIE, PDL-D-LRA, and PDL-D/S-LRA calculations of ligands binding to an HIV protease.* Proteins-Structure Function and Bioinformatics, 39, 393-407.
- Shamraj,O.I. und Lingrel,J.B.** (1994) *A Putative 4Th  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase Alpha-Subunit Gene Is Expressed in Testis.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 91, 12952-12956.
- Shinoda,T., Ogawa,H., Cornelius,F. und Toyoshima,C.** (2009) *Crystal structure of the sodium-potassium pump at 2.4 angstrom resolution.* Nature, 459, 446-U167.
- Shull,G.E., Schwartz,A. und Lingrel,J.B.** (1985) *Amino-Acid-Sequence of the Catalytic Subunit of the  $(Na^+ + K^+)Atpase$  Deduced from A Complementary-Dna.* Nature, 316, 691-695.
- Sitkoff,D., Sharp,K.A. und Honig,B.** (1994) *Accurate Calculation of Hydration Free-Energies Using Macroscopic Solvent Models.* Journal of Physical Chemistry, 98, 1978-1988.

- Skou, J.C.** (1957) *The Influence of Some Cations on An Adenosine Triphosphatase from Peripheral Nerves*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 23, 394-401.
- Schoel, H., Jensen, A.M.L., Moller, J.V., Nissen, P., Denmeade, S.R., Isaacs, J.T., Olsen, C.E. und Christensen, S.B.** (2006) *Natural products as starting materials for development of second-generation SERCA inhibitors targeted towards prostate cancer cells*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14, 2810-2815.
- Song, Y., Mao, J. und Gunner, M.R.** (2009) *MCCE2: improving protein pKa calculations with extensive side chain rotamer sampling*. *J Computational Chemistry*, 30.
- Song, Y.F., Mao, J.J. und Gunner, M.R.** (2003) *Calculation of proton transfers in bacteriorhodopsin bR and M intermediates*. *Biochemistry*, 42, 9875-9888.
- Sorensen, T.L.M. und Andersen, J.P.** (2000) *Importance of stalk segment S5 for intramolecular communication in the sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase*. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 28954-28961.
- Sorensen, T.L.M., Moller, J.V. und Nissen, P.** (2004) *Phosphoryl transfer and calcium ion occlusion in the calcium pump*. *Science*, 304, 1672-1675.
- Sorensen, T.L.M., Olesen, C., Jensen, A.M.L., Moller, J.V. und Nissen, P.** (2006) *Crystals of sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase*. *Journal of Biotechnology*, 124, 704-716.
- Sridharan, S., Nicholls, A. und Honig, B.** (1992) *A New Vertex Algorithm to Calculate Solvent Accessible Surface-Areas*. *Faseb Journal*, 6, A174.
- Steinhauser, M.O. und Hiermaier, S.** (2009) *A Review of Computational Methods in Materials Science: Examples from Shock-Wave and Polymer Physics*. *International Journal of Molecular Sciences*, 10, 5135-5216.
- Stokes, D.L. und Green, N.M.** (2003) *Structure and function of the calcium pump*. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 32, 445-468.
- Stryer, L. (2207)** *Biochemie*, Elsevier
- Sugita, Y., Miyashita, N., Ikeguchi, M., Kidera, A. und Toyoshima, C.** (2005) *Protonation of the acidic residues in the transmembrane cation-binding sites of the  $Ca^{2+}$  pump*. *Journal of the American Chemical Society*, 127, 6150-6151.
- Sugita, Y., Miyashita, N., Yoda, T., Ikeguchi, M. und Toyoshima, C.** (2006) *Structural changes in the cytoplasmic domain of phospholamban by phosphorylation at Ser16: A molecular dynamics study*. *Biochemistry*, 45, 11752-11761.
- Sweadner, K.J. und Donnet, C.** (2001) *Structural similarities of Na,K-ATPase and SERCA, the  $Ca^{2+}$ -ATPase of the sarcoplasmic reticulum*. *Biochemical Journal*, 356, 685-704.
- Tadini-Buoninsegni, F., Bartolommei, G., Moncelli, M.R., Guidelli, R. und Inesi, G.** (2006) *Pre-steady state electrogenic events of  $Ca^{2+}/H^+$  exchange and transport by the  $Ca^{2+}$ -ATPase*. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 37720-37727.
- Takahashi, M., Kondou, Y. und Toyoshima, C.** (2007) *Interdomain communication in calcium pump as revealed in the crystal structures with transmembrane inhibitors*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 5800-5805.
- Tanford, C.** (1981) *Equilibrium State of Atp-Driven Ion Pumps in Relation to Physiological Ion Concentration Gradients*. *Journal of General Physiology*, 77, 223-229.
- Tanford, C., Reynolds, J.A. und Johnson, E.A.** (1987) *Sarcoplasmic-Reticulum Calcium-Pump - A Model for  $Ca^{2+}$  Binding and  $Ca^{2+}$ -Coupled Phosphorylation*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84, 7094-7098.

- Thever, M.D. und Saier, M.H.** (2009) *Bioinformatic Characterization of P-Type ATPases Encoded Within the Fully Sequenced Genomes of 26 Eukaryotes*. *Journal of Membrane Biology*, 229, 115-130.
- Torres, J., Stevens, T.J. und Samsó, M.** (2003) *Membrane proteins: the 'Wild West' of structural biology*. *Trends in Biochemical Sciences*, 28, 137-144.
- Toyoshima, C.** (2008) *Structural aspects of ion pumping by  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase of sarcoplasmic reticulum*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 476, 3-11.
- Toyoshima, C.** (2009) *How  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase pumps ions across the sarcoplasmic reticulum membrane*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1793, 941-946.
- Toyoshima, C. und Inesi, G.** (2004) *Structural basis of ion pumping by  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase of the sarcoplasmic reticulum*. *Annual Review of Biochemistry*, 73, 269-292.
- Toyoshima, C. und Mizutani, T.** (2004) *Crystal structure of the calcium pump with a bound ATP analogue*. *Nature*, 430, 529-535.
- Toyoshima, C. und Nomura, H.** (2002) *Structural changes in the calcium pump accompanying the dissociation of calcium*. *Nature*, 418, 605-611.
- Toyoshima, C., Nakasako, M., Nomura, H. und Ogawa, H.** (2000) *Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution*. *Nature*, 405, 647-655.
- Toyoshima, C., Nomura, H. und Tsuda, T.** (2004) *Luminal gating mechanism revealed in calcium pump crystal structures with phosphate analogues*. *Nature*, 432, 361-368.
- Toyoshima, C., Norimatsu, Y., Iwasawa, S., Tsuda, T. und Ogawa, H.** (2007) *How processing of aspartylphosphate is coupled to luminal gating of the ion pathway in the calcium pump*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 19831-19836.
- Toyoshima, C., Sasabe, H. und Stokes, D.L.** (1993) *3-Dimensional Cryoelectron Microscopy of the Calcium-Ion Pump in the Sarcoplasmic-Reticulum Membrane*. *Nature*, 362, 469-471.
- van der Kamp, M.W., Shaw, K.E., Woods, C.J. und Mulholland, A.J.** (2008) *Biomolecular simulation and modelling: status, progress and prospects*. *Journal of the Royal Society Interface*, 5, S173-S190.
- van Gunsteren, W.F., Bakowies, D., Baron, R., Chandrasekhar, I., Christen, M., Daura, X., Gee, P., Geerke, D.P., Glattli, A., Hunenberger, P.H., Kastenholz, M.A., Ostenbrink, C., Schenk, M., Trzesniak, D., van der Vegt, N.F.A. und Yu, H.B.** (2006) *Biomolecular modeling: Goals, problems, perspectives*. *Angewandte Chemie-International Edition*, 45, 4064-4092.
- van Gunsteren, W.F. und Karplus, M.** (1982) *Protein Dynamics in Solution and in A Crystalline Environment - A Molecular-Dynamics Study*. *Biochemistry*, 21, 2259-2274.
- Verlet, L.** (1967) *Computer Experiments on Classical Fluids .I. Thermodynamical Properties of Lennard-Jones Molecules*. *Physical Review*, 159, 98-103.
- Vilsen, B. und Andersen, J.P.** (1998) *Mutation to the glutamate in the fourth membrane segment of  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase and  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase affects cation binding from both sides of the membrane and destabilizes the occluded enzyme forms*. *Biochemistry*, 37, 10961-10971.
- Wallin, E. und von Heijne, G.** (1998) *Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms*. *Protein Science*, 7, 1029-1038.
- Walz, D. und Caplan, S.R.** (1988) *Energy Coupling and Thermokinetic Balancing in Enzyme-Kinetics - Microscopic Reversibility and Detailed Balance Revisited*. *Cell Biophysics*, 12, 13-28.

- Warshel,A. und Aqvist,J.** (1991) *Electrostatic Energy and Macromolecular Function*. Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry, 20, 267-298.
- Warshel,A. und Levitt,M.** (1976) *Theoretical Studies of Enzymic Reactions - Dielectric, Electrostatic and Steric Stabilization of Carbonium-Ion in Reaction of Lysozyme*. Journal of Molecular Biology, 103, 227-249.
- Warshel,A. und Papazyan,A.** (1998) *Electrostatic effects in macromolecules: fundamental concepts and practical modeling*. Current opinion in structural biology, 8, 211-217.
- Warshel,A. und Russell,S.T.** (1984) *Calculations of Electrostatic Interactions in Biological-Systems and in Solutions*. Quarterly Reviews of Biophysics, 17, 283-422.
- Warshel,A., Sharma,P.K., Kato,M. und Parson,W.W.** (2006) *Modeling electrostatic effects in proteins*. Biochimica et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics, 1764, 1647-1676.
- Warwicker,J. und Watson,H.C.** (1982) *Calculation of the Electric-Potential in the Active-Site Cleft Due to Alpha-Helix Dipoles*. Journal of Molecular Biology, 157, 671-679.
- Weidemüller,C.** (2006) *Elektrostatik-Rechnungen zur Untersuchung der Energietransduktion in ionentransportierenden Membranproteinen*, Diplomarbeit, Goethe-Universität Frankfurt
- Weidemüller,C. und Hauser,K.** (2008) *A computational approach to study the energy transduction mechanism in the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase*. From Computational Biophysics to System Biology (CBSB08). Jülich, pp. 409-411.
- Weidemüller,C. und Hauser,K.** (2008) *Impact of an electric field on P-type ATPases*. Spectroscopy-An International Journal, 22, 319-325.
- Weidemüller,C. und Hauser,K.** (2009) *Ion transport and energy transduction of P-type ATPases: Implications from electrostatic calculations*. Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics, 1787, 721-729.
- Weidemüller,C., Siu,S., Boeckmann,B. und Hauser,K.** (2009) *Ion transport and energy transduction of P-type ATPases studied by simulations*. European Biophysics Journal Suppl. 1, 59.
- Wells,D.B., Abramkina,V. und Aksimentiev,A.** (2007) *Exploring transmembrane transport through alpha-hemolysin with grid-steered molecular dynamics*. Journal of Chemical Physics, 127.
- Winters,D.L., Autry,J.M., Svensson,B. und Thomas,D.D.** (2008) *Interdomain fluorescence resonance energy transfer in SERCA probed by cyan-fluorescent protein fused to the actuator domain*. Biochemistry, 47, 4246-4256.
- Wisz,M.S. und Hellinga,H.W.** (2003) *An empirical model for electrostatic interactions in proteins incorporating multiple geometry-dependent dielectric constants*. Proteins-Structure Function and Genetics, 51, 360-377.
- Wraight,C.A.** (2006) *Chance and design - Proton transfer in water, channels and bioenergetic proteins*. Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics, 1757, 886-912.
- Wuytack,F.** (2009) *Half a century of ion-transport ATPases: the P- and V-type ATPases*. Pflugers Archiv-European Journal of Physiology, 457, 569-571.
- Xu,C., Rice,W.J., He,W.Z. und Stokes,D.L.** (2002) *A structural model for the catalytic cycle of Ca<sup>2+</sup>-ATPase*. Journal of Molecular Biology, 316, 201-211.
- Yamaguchi,M. und Kanazawa,T.** (1985) *Coincidence of H<sup>+</sup> Binding and Ca<sup>2+</sup> Dissociation in the Sarcoplasmic-Reticulum Ca-ATPase During Atp Hydrolysis*. Journal of Biological Chemistry, 260, 4896-4900.

- Yatime,L., Buch-Pedersen,M.J., Musgaard,M., Morth,J.P., Winther,A.M.L., Pedersen,B.P., Olesen,C., Andersen,J.P., Vilsen,B., Schiott,B., Palmgren,M.G., Moller,J.V., Nissen,P. und Fedosova,N.** (2009) *P-type ATPases as drug targets: Tools for medicine and science*. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 1787, 207-220.
- Yu,X., Carroll,S., Rigaud,J.L. und Inesi,G.** (1993) *H<sup>+</sup> Countertransport and Electrogenicity of the Sarcoplasmic-Reticulum Ca<sup>2+</sup> Pump in Reconstituted Proteoliposomes*. *Biophysical Journal*, 64, 1232-1242.
- Yu,X., Hao,L.N. und Inesi,G.** (1994) *A Pk Change of Acidic Residues Contributes to Cation Countertransport in the Ca-ATPase of Sarcoplasmic-Reticulum - Role of H<sup>+</sup> in Ca<sup>2+</sup>-Atpase Countertransport*. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 16656-16661.
- Zauhar,R.J. und Varnek,A.** (1996) *A fast and space-efficient boundary element method for computing electrostatic and hydration effects in large molecules*. *Journal of Computational Chemistry*, 17, 864-877.
- Zhang,L. und Hermans,J.** (1996) *Hydrophilicity of cavities in proteins*. *Proteins-Structure Function and Genetics*, 24, 433-438.
- Zhang,Z.S., Lewis,D., Stroock,C. und Inesi,G.** (2000) *Detailed characterization of the cooperative mechanism of Ca<sup>2+</sup> binding and catalytic activation in the Ca<sup>2+</sup> transport (SERCA) ATPase*. *Biochemistry*, 39, 8758-8767.
- Zheng,Z. und Gunner,A.R.** (2009) *Analysis of the electrochemistry of hemes with E(m)s spanning 800 mV*. *Proteins-Structure Function and Bioinformatics*, 75, 719-734.



## 8 ABKÜRZUNGEN

<b>ADP</b>	Adenosindiphosphat
<b>AlF<sub>4</sub></b>	Tetrafluoroaluminat-Ion
<b>AMPPCP</b>	Adenosin-5'-[Beta, Gamma-Methylen]Triphosphat
<b>ATP</b>	Adenosintri-phosphat
<b>BeF<sub>3</sub></b>	Trifluoroberyllat
<b>BHQ</b>	2,5-di- <i>tert</i> -butyl-1,4-dihydroxybenzol
<b>DOPC</b>	Dioleoyl-Phosphatidylcholin
<b>GB-Modell</b>	generalisiertes Born-Modell
<b>H<sup>+</sup></b>	Protonen
<b>MCCE</b>	Multiconformation Continuum Electrostatics
<b>MC-Sampling</b>	Monte Carlo Sampling
<b>MD</b>	Molekulardynamik
<b>MgF<sub>4</sub><sup>2-</sup></b>	Magnesiumtetrafluorid
<b>PARSE</b>	Parameters for solvation energy
<b>PC1</b>	1,2-Diacyl-sn-glycero-3-phosphocholin
<b>PDB</b>	Proteindatenbank
<b>PTY</b>	Phosphatidylethanolamin
<b>POPC</b>	1-Palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylcholin
<b>RMSD</b>	Standardabweichung - ( <i>Root-Mean-Square Difference</i> )
<b>SAS</b>	solvenz zugängliche Oberfläche ( <i>Solvens Accessible Surface</i> )
<b>SR</b>	<i>Sarkoplasmatisches Retikulum</i>
<b>TG</b>	Thapsigargin

## 9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<b>ABB. 1:</b> SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER LÄNGENSKALA IN DER BIOLOGIE UND DEN MATERIALWISSENSCHAFTEN .....	9
<b>ABB. 2:</b> SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER IONENTRANSPORTIERENDEN $Ca^{2+}$ -ATPASE UNTER VERBRAUCH VON ATP. ....	11
<b>ABB. 3:</b> SCHEMATISCHE DARSTELLUNG EINER AMINOSÄURE. ....	13
<b>ABB. 4:</b> SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER BINDUNG ZWEIER AMINOSÄUREN MITTELS DER PEPTIDBINDUNG .....	14
<b>ABB. 5:</b> SCHEMATISCHE DARSTELLUNG EINER POLYPEPTIDKETTE, .....	14
<b>ABB. 6:</b> DARSTELLUNG DER VIER STRUKTUREBENEN. ....	15
<b>ABB. 7:</b> WECHSELWIRKUNGEN IN PROTEINEN.....	17
<b>ABB. 8:</b> VAN-DER-WAALS-WECHSELWIRKUNG ZWISCHEN ZWEI ATOMEN. ....	18
<b>ABB. 9:</b> DER HYDROPHOBE EFFEKT .....	19
<b>ABB. 10:</b> OBERFLÄCHENLADUNGSVERTEILUNG DER $Ca^{2+}$ -ATPASE. ....	20
<b>ABB. 11:</b> TITRATIONSKURVE DER AMINOSÄURE HISTIDIN IN WÄSSRIGER LÖSUNG. ....	24
<b>ABB. 12:</b> PHYLOGENETISCHER BAUM DER P-TYP-ATPASEN .....	26
<b>ABB. 13:</b> DIE DOMÄNEN DER $Ca^{2+}$ -ATPASE.....	28
<b>ABB. 14:</b> SEQUENZ UND SEKUNDÄRSTRUKTUR DER DER $Ca^{2+}$ -ATPASE.....	29
<b>ABB. 15:</b> REAKTIONSZYKLUS DER P-TYP-ATPASEN AM BEISPIEL DER $Ca^{2+}$ -ATPASE .....	33
<b>ABB. 16:</b> A-UNTEREINHEIT DER $Na^+/K^+$ .....	35
<b>ABB. 17:</b> AUFSICHT AUF DIE CALCIUMBINDESTELLE.....	36
<b>ABB. 18:</b> POSTULIERTER PROTONENWEG IN DER $Ca^{2+}$ -ATPASE .....	38
<b>ABB. 19:</b> VERSCHIEDENE ZU BERÜCKSICHTIGENDE BEDINGUNGEN AN DAS SIMULATIONSMODELL.....	40
<b>ABB. 20:</b> SCHEMA DER FINITE-DIFFERENZEN-METHODE.....	47
<b>ABB. 21:</b> BESTIMMUNG DER PROTEIN-SOLVENS-GRENZFLÄCHE .....	48
<b>ABB. 22:</b> ABLAUSCHEMA DES MCCE-PROGRAMMS.....	52
<b>ABB. 23:</b> DREI BEISPIELHAFTE KONFORMERE DER GLUTAMINSÄURE. ....	53
<b>ABB. 24:</b> LÄNGEN- UND ZEITSKALA VON MD-SIMULATIONEN .....	57
<b>ABB. 25:</b> SCHEMATISIERTE KRÄFTE IN EINEM TYPISCHEN KRAFTFELD .....	60
<b>ABB. 26:</b> TYPISCHES MD-SIMULATIONSSYSTEM (LINKS) MIT SCHEMATISIERTEN KRÄFTEN (RECHTS) .....	61
<b>ABB. 27:</b> SCHEMATISCHE DARSTELLUNG EINES SYSTEMS MIT PERIODISCHEN RANDBEDINGUNGEN .....	62
<b>ABB. 28:</b> SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER UNTERSUCHUNG ZUR ENERGIETRANSDUKTION IN P-TYP-ATPASEN. ....	74
<b>ABB. 29:</b> REALISIERUNG EINES MOLEKULAREN KONDENSATORS .....	76
<b>ABB. 30:</b> KONFORMERÄNDERUNGEN DER TRANSMEMBRANHELICES M1 - M10 FÜR VERSCHIEDENE ENZYMZUSTÄNDE. ....	84
<b>ABB. 31:</b> DIE KONFORMERÄNDERUNGEN JEDER TRANSMEMBRANHELIX.....	86
<b>ABB. 32:</b> SIMULATIONSSYSTEM DER $Na^+/K^+$ -ATPASE. ....	90
<b>ABB. 33:</b> KONFORMERÄNDERUNGEN DER $Na^+/K^+$ -ATPASE .....	91
<b>ABB. 34:</b> DARSTELLUNG DER KONFORMERÄNDERUNGEN DER $Na^+/K^+$ -ATPASE INDUZIERT DURCH DAS ELEKTRISCHE FELD.....	92
<b>ABB. 35:</b> VERGLEICH DES WILDSTYPS MIT EINER SPANNUNGSUNABHÄNGIGEN MUTANTE DER $Na^+/K^+$ -ATPASE. ....	93
<b>ABB. 36:</b> ÜBERLAGERUNG DES E1- UND DES E2-ZUSTANDES MIT SIMULIERTEN STRUKTUREN. ....	95
<b>ABB. 37:</b> STANDARDABWEICHUNG DER ATOMPOSITIONEN DER CALCIUM-FREIEN E1-STRUKTUR .....	96

<b>ABB. 38:</b> STANDARDABWEICHUNG DER ATOMPOSITIONEN DER CALCIUM-FREIEN E1-STRUKTUR.....	97
<b>ABB. 39:</b> ÜBERLAGERUNG DER CALCIUM-FREIEN KRISTALLSTRUKTUR (PDB-DATEI: 2AGV) MIT DER CALCIUM-GEBUNDENEN.....	98
<b>ABB. 40:</b> STANDARDABWEICHUNG DER ATOMPOSITIONEN DER CALCIUM-FREIEN E2-STRUKTUR .....	99
<b>ABB. 41:</b> LOKALISATION DER HELICES MIT DEN MEISTEN KONFORMERÄNDERUNGEN IN DER CALCIUM-FREIEN E2-STRUKTUR. ....	104
<b>ABB. 42:</b> LOKALISATION DER HELICES MIT DEN MEISTEN KONFORMERÄNDERUNGEN IN DER CALCIUM-GEBUNDEN E1-STRUKTUR. .	107
<b>ABB. 43:</b> VERGLEICH DER KONFORMERÄNDERUNGEN DER BEIDEN ENZYMZUSTÄNDE E1 UND E2.....	108
<b>ABB. 44:</b> LOKALISATION DER HELICES MIT DEN MEISTEN KONFORMERÄNDERUNGEN IN DER $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPASE .....	112
<b>ABB. 45:</b> PROZENTUALER VERGLEICH DER KONFORMERÄNDERUNGEN DER $\text{Ca}^{2+}$ -ATPASE UND DER $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPASE.....	114
<b>ABB. 46:</b> ÜBERSICHT UND BEZEICHNUNGEN DES TRANSMEMBRANBEREICHES DER $\text{Ca}^{2+}$ -ATPASE. ....	119
<b>ABB. 47:</b> MODELLMEMBRAN FÜR DEN PROTONENGEGETRANSPORT AN DER STRUKTUR 1T5T. ....	123
<b>ABB. 48:</b> PROTONIERUNGEN DER EXPLIZITEN WASSERMOLEKÜLE IM E1P-ZUSTAND OHNE CALCIUMIONEN. ....	124
<b>ABB. 49:</b> PROTONIERUNGEN DER WASSERMOLEKÜLE IM E1P-ZUSTAND MIT NEUTRALEM WASSER 1.....	125
<b>ABB. 50:</b> PROTONIERUNGEN DER WASSERMOLEKÜLE IM E1P-ZUSTAND MIT DREI NEUTRALEN WASSERMOLEKÜLEN .....	126
<b>ABB. 51:</b> PROTONIERUNGEN DER WASSERMOLEKÜLE IM E1P-ZUSTAND MIT WASSERMOLEKÜLEN AN DER OBERFLÄCHE .....	127
<b>ABB. 52:</b> OBERFLÄCHENPOTENTIAL DER VOLLSTÄNDIGEN $\text{Ca}^{2+}$ -ATPASE. ....	128
<b>ABB. 53:</b> PROTONIERUNGEN DER EXPLIZITEN WASSERMOLEKÜLE DES E1P-ZUSTANDES MIT EINEM CALCIUMION.....	129
<b>ABB. 54:</b> PROTONIERUNGEN DER EXPLIZITEN WASSERMOLEKÜLE DES E1P-ZUSTANDES MIT ZWEI CALCIUMIONEN .....	130
<b>ABB. 55:</b> PROTONIERUNGEN DER WASSERMOLEKÜLE DES E1P-ZUSTANDES MIT EINEM CALCIUMION IN DER 1. BINDESTELLE .....	131
<b>ABB. 56:</b> PROTONIERUNGEN IM E1P-ZUSTAND MIT EINEM CALCIUMION IN DER 2. BINDESTELLE .....	132
<b>ABB. 57:</b> PROTONIERUNGEN DER EXPLIZITEN WASSERMOLEKÜLE DES E1P-ZUSTANDES MIT BEIDEN CALCIUMION.....	132
<b>ABB. 58:</b> PROTONIERUNGEN DER EXPLIZITEN WASSERMOLEKÜLE IM E2P-ZUSTAND .....	134
<b>ABB. 59:</b> PROTONIERUNGEN DER EXPLIZITEN WASSERMOLEKÜLE IM UND AM AUSGANG DES CALCIUMKANALS .....	135
<b>ABB. 60:</b> EINFLUSS VON FESTGESETZTEN PROTONIERUNGEN AUF WEITERE WASSERMOLEKÜLE.....	136
<b>ABB. 61:</b> PROTONIERUNGEN DER EXPLIZITEN WASSERMOLEKÜLE IM E2-P-ZUSTAND .....	137
<b>ABB. 62:</b> PROTONIERUNGEN DER EXPLIZITEN WASSERMOLEKÜLE DES E2-ZUSTANDES.....	138
<b>ABB. 63:</b> PROTONIERUNGEN DER EXPLIZITEN WASSERMOLEKÜLE DES E1-ZUSTANDES OHNE CALCIUMIONEN .....	140
<b>ABB. 64:</b> PROTONIERUNGEN DER EXPLIZITEN WASSERMOLEKÜLE DES E1-ZUSTANDES MIT BEIDEN CALCIUMIONEN .....	141
<b>ABB. 65:</b> PROTONIERUNGEN DER WASSERMOLEKÜLE, DIE MITTELS DOWSER EINGEFÜGT WURDEN. ....	142
<b>ABB. 66:</b> LAGE DER AMINOSÄUREN, DEREN pK-WERT ÜBER ZWEI pK-EINHEITEN VERSCHOBEN IST. ....	145
<b>ABB. 67:</b> PROTONIERUNG DER EXPLIZITEN WASSERMOLEKÜLE IN DEN VERSCHIEDENEN ENZYMZUSTÄNDEN. ....	146
<b>ABB. 68:</b> MEHRSTUFIGER PROZESS DES PROTONENGEGETRANSPORTES SCHEMATISCH DARGESTELLT. ....	148
<b>ABB. 69:</b> PROTONIERUNGEN IN DEN ZUSTÄNDEN E1P (GRÜN), E2P (ORANGE) UND E2 (BLAU).....	149
<b>ABB. 70:</b> SCHEMATISierter REAKTIONSZYKLUS DER $\text{Ca}^{2+}$ -ATPASE.....	150

## 10 TABELLENVERZEICHNIS

<b>TABELLE 1:</b> PHYSIKOCHEMISCHE EIGENSCHAFTEN VON AMINOSÄUREN .....	13
<b>TABELLE 2:</b> PK-WERTE DER IONISIERBAREN AMINOSÄUREN IN WÄSSRIGER LÖSUNG BEI PH = 7.....	23
<b>TABELLE 3:</b> VERFÜGBARE KRISTALLSTRUKTUREN DER $Ca^{2+}$ -ATPASE .....	65
<b>TABELLE 4:</b> VORHANDENE KRISTALLSTRUKTUREN DER $Na^+/K^+$ -ATPASE .....	65
<b>TABELLE 5:</b> ZUSAMMENSETZUNG DER TRANSMEMBRANHELICES DER $Ca^{2+}$ -ATPASE.....	80
<b>TABELLE 6:</b> ZUSAMMENSETZUNG DES TRANSMEMBRANBEREICHES DER $Na^+/K^+$ -ATPASE. ....	81
<b>TABELLE 7:</b> BERECHNETE SAS-WERTE IN $\text{Å}^2$ DER TRANSMEMBRANHELICES M1 - M10.....	82
<b>TABELLE 8:</b> ANZAHL DER BERECHNETEN KONFORMERÄNDERUNGEN FÜR VERSCHIEDENE ENZYMZUSTÄNDE DER $Ca^{2+}$ -ATPASE. ....	83
<b>TABELLE 9:</b> AUFTeilUNG DER KONFORMERÄNDERUNGEN IN ROTAMERÄNDERUNGEN UND IONISIERUNGSÄNDERUNGEN.....	85
<b>TABELLE 10:</b> KONFORMERÄNDERUNGEN FÜR VERSCHIEDENE STRUKTURMODELLE DER $Na^+/K^+$ -ATPASE. ....	89
<b>TABELLE 11:</b> KONFORMERÄNDERUNGEN FÜR VERSCHIEDENE STRUKTURMODELLE DER $Na^+/K^+$ -ATPASE INKLUSIVE <i>STALK</i> -BEREICH..	89
<b>TABELLE 12:</b> KONFORMERÄNDERUNGEN DER $Na^+/K^+$ -ATPASE AUF DEN TRANSMEMBRANHELICES M1 - M10.....	90
<b>TABELLE 13:</b> KONFORMERÄNDERUNGEN DER $Na^+/K^+$ -ATPASE ZUZÜGLICH DES <i>STALK</i> -BEREICHS. ....	91
<b>TABELLE 14:</b> PROZENTUALE KONFORMERÄNDERUNGEN DER MUTIERTEN $N^+/K^+$ -ATPASE (N776D) .....	93
<b>TABELLE 15:</b> KONFORMERÄNDERUNGEN ZU VERSCHIEDENEN SIMULATIONSZEITEN DES CALCIUM-FREIEN ZUSTANDES E2 .....	102
<b>TABELLE 16:</b> KONFORMERÄNDERUNGEN ZU VERSCHIEDENEN SIMULATIONSZEITEN DES E2-ZUSTANDES INKLUSIVE <i>STALK</i> -BEREICH.	103
<b>TABELLE 17:</b> KONFORMERÄNDERUNGEN ZU VERSCHIEDENEN SIMULATIONSZEITEN DES CALCIUM-GEBUNDENEN ZUSTANDES E1....	105
<b>TABELLE 18:</b> KONFORMERÄNDERUNGEN ZU VERSCHIEDENEN SIMULATIONSZEITEN DES E1-ZUSTANDES INKLUSIVE <i>STALK</i> -BEREICH.	106
<b>TABELLE 19:</b> KONFORMERÄNDERUNGEN DER $Na^+/K^+$ -ATPASE.....	111
<b>TABELLE 20:</b> KONFORMERÄNDERUNGEN DER $Na^+/K^+$ -ATPASE INKLUSIVE <i>STALK</i> -BEREICH.....	111
<b>TABELLE 21:</b> KONFORMERÄNDERUNGSVERGLEICH ZWISCHEN DER KRISTALLSTRUKTUR UND DEN GEMITTELTEN MD-SCHNAPPSCHÜSSEN.....	113
<b>TABELLE 22:</b> AUSGEWÄHLTE TESTPROTEINE ZUR PK-WERT-BESTIMMUNG. ....	121
<b>TABELLE 23:</b> BESETZUNGSWAHRSCHEINLICHKEIT DER PROTONIERTEN WASSERMOLEKÜLE IM E1P-ZUSTAND.....	131
<b>TABELLE 24:</b> BESETZUNGSWAHRSCHEINLICHKEIT DER PROTONIERTEN WASSERMOLEKÜLE IM E1P-ZUSTAND.....	132
<b>TABELLE 25:</b> BESETZUNGSWAHRSCHEINLICHKEIT DER PROTONIERTEN WASSERMOLEKÜLE IM E1P-ZUSTAND.....	133
<b>TABELLE 26:</b> BESETZUNGSWAHRSCHEINLICHKEIT DER PROTONIERTEN WASSERMOLEKÜLE IN DER E2-STRUKTUR. ....	138
<b>TABELLE 27:</b> BESETZUNGSWAHRSCHEINLICHKEIT DER PROTONIERTEN WASSERMOLEKÜLE IN DER E1-STRUKTUR. ....	140
<b>TABELLE 28:</b> BESETZUNGSWAHRSCHEINLICHKEIT DER PROTONIERTEN WASSERMOLEKÜLE IM E1-ZUSTAND.....	141
<b>TABELLE 29:</b> BESETZUNGSWAHRSCHEINLICHKEIT DER PROTONIERTEN WASSERMOLEKÜLE IM E1-ZUSTAND.....	142
<b>TABELLE 30:</b> PK-WERT DER AUSGEWÄHLTEN AMINOSÄUREN IM E1P-ENZYMZUSTAND .....	144
<b>TABELLE 31:</b> PK-WERT DER AUSGEWÄHLTEN AMINOSÄURE IM E2P-ENZYMZUSTAND .....	144
<b>TABELLE 32:</b> PK-WERT DER AUSGEWÄHLTEN AMINOSÄUREN IN BEIDEN ENZYMZUSTÄNDEN .....	145

## 11 ANHANG

### A. Ablaufprotokoll zur Berechnung der Protonierung mittels MCCE

step 1:

t add neutral atoms to simulate a membrane slab (IPECE\_ADD\_MEM)  
33. the thickness of the membrane to be add (IPECE\_MEM\_THICKNESS)  
M the chain ID of the add atoms (IPECE\_MEM\_CHAINID)  
t Label terminal residues? (TERMINALS)  
2.0 distance limit of reporting clashes (CLASH\_DISTANCE)  
0.95 cut off water if % SAS exceeds this number (H2O\_SASCUTOFF)

step 2:

f Use specific control (head1.lst) on rotamer making (ROT\_SPECIF)  
-1 Numble of cycles used for initial minimization (N\_INITIAL\_RELAX)  
f Rebuild sidechain based on torsion minima (REBUILD\_SC)  
t Do swap (stereo isotope) (ROT\_SWAP)  
t Do rotate? (PACK)  
3 number of rotamers in a bond rotation (ROTATIONS)  
0.25 SAS cutoff of making fewer rotamers (SAS\_CUTOFF)  
10.0 Cutoff of self vdw in kcal/mol (VDW\_CUTOFF)  
5000 number of repacks (REPACKS)  
0.05 occupancy cutoff of repacks (REPACK\_CUTOFF)  
t h-bond directed rotamer making, requir 't' on Do rotate (HDIRECTED)  
1.0 threshold for two conformers being different (HDIRDIFF)  
36 Limit number of the Hbond conformers (HDIRLIMIT)  
3 number of cycles to relax rotamer clash (HV\_RELAX\_NCYCLE)  
4 time (in fs) for each relaxation iteration (HV\_RELAX\_DT)  
250 number of iterations (HV\_RELAX\_NITER)  
2. relax rotamer if vdw interaction is bigger than this (HV\_RELAX\_VDW\_THR)  
5. not relax rotamer if heavy atom vdw is bigger than this (HV\_RELAX\_HV\_VDW\_THR)  
20. scaling factor for torsion during relaxation (HV\_TORS\_SCALE)  
10000 maximun n steps of shake (HV\_RELAX\_N\_SHAKE)  
1.0 constraint distance (HV\_RELAX\_CONSTRAINT)

20. constraint force for atom stay in original position (HV\_RELAX\_CONSTRAINT\_FRC)
- 3.0 relax if electrostatic interaction is more favorable than this, and the charged groups are close (HV\_RELAX\_ELEC\_THR)
- 0.3 threshold used to define a charged atom, see hv\_relax\_elec\_dist\_thr (HV\_RELAX\_ELEC\_CRG\_THR)
- 3.0 only relax electrostatically favorable pairs that has charged atom distance shorter than this (HV\_RELAX\_ELEC\_DIST\_THR)
- f Do relaxation on hydrogens (RELAX\_H)
- 1.0 Energy threshold for keeping the conformer (RELAX\_E\_THR)
- 100 Loop over N local microstates (RELAX\_NSTATES)
- 36 default number of hydroxyl positions (RELAX\_N\_HYD)
5. do not relax hydrogen if vdw bwt two sidechain conformer bigger than this (RELAX\_CLASH\_THR)
- 1.0 phi for each step of relaxation (RELAX\_PHI)
- 300 Maximum number of steps of relaxation (RELAX\_NITER)
- 0.5 Torque threshold for keep relaxing (RELAX\_TORQ\_THR)
- step 3:
- 80.0 Solvent dielectric constant for DelPhi (EPSILON\_SOLV)
- 65 Grids in each DelPhi (GRIDS\_DELPHI)
- 2.0 The target grids per angstrom for DelPhi (GRIDS\_PER\_ANG)
- 1.4 Radius of the probe (RADIUS\_PROBE)
- 2.0 Ion radius (IONRAD)
- 0.15 Salt (SALT)
- /cluster/mcce2.4/bin/delphi DelPhi executable (DELPHI\_EXE)
- step 4:
- 5.0 Big pairwise threshold to make big list (BIG\_PAIRWISE)
- 1 Random seed, -1 uses time as random seed (MONTE\_SEED)
- 298.15 Temperature (MONTE\_T)
- 3 Number of flips (MONTE\_FLIPS)
- 100 Annealing = n\_start \* confs (MONTE\_NSTART)
- 300 Equalibration = n\_eq \* confs (MONTE\_NEQ)
- 0.001 Cut-off occupancy of the reduction (MONTE\_REDUCE)
- 2 Independent monte carlo sampling (MONTE\_RUNS)
- 2000 Sampling = n\_iter \* confs (MONTE\_NITER)
- 50000 Trace energy each MONTE\_TRACE steps, 0 no trace (MONTE\_TRACE)

---

2000 Sampling = n\_iter \* confs (MONTE\_NITER)

50000 Trace energy each MONTE\_TRACE steps, 0 no trace (MONTE\_TRACE)

1000000 Maximum microstates for analytical solution (NSTATE\_MAX)

t Do entropy correction (MONTE\_TSX)

# Advanced options:

1 delphi start conformer number, 0 based (DELPHI\_START)

99999 delphi end conformer number, self included (DELPHI\_END)

/home/weidemueller/tmp delphi temporary file folder, "/tmp" uses node (DELPHI\_FOLDER)

t clean up delphi focusing directory? (DELPHI\_CLEAN)

debug.log additional error information (DEBUG\_LOG)

new.tpl local parameter file for unrecognized res (NEWTPL)

1.7 default van der Waals radius, for SAS (DEFAULT\_RADIUS)

0.5 factor to 1-4 LJ potential (1.0 is full) (FACTOR\_14LJ)

6.0 dielectric constant for Coulomb's law (EPSILON\_COULOMB)

1.5 Pruning cutoff of RMSD (PRUNE\_RMSD)

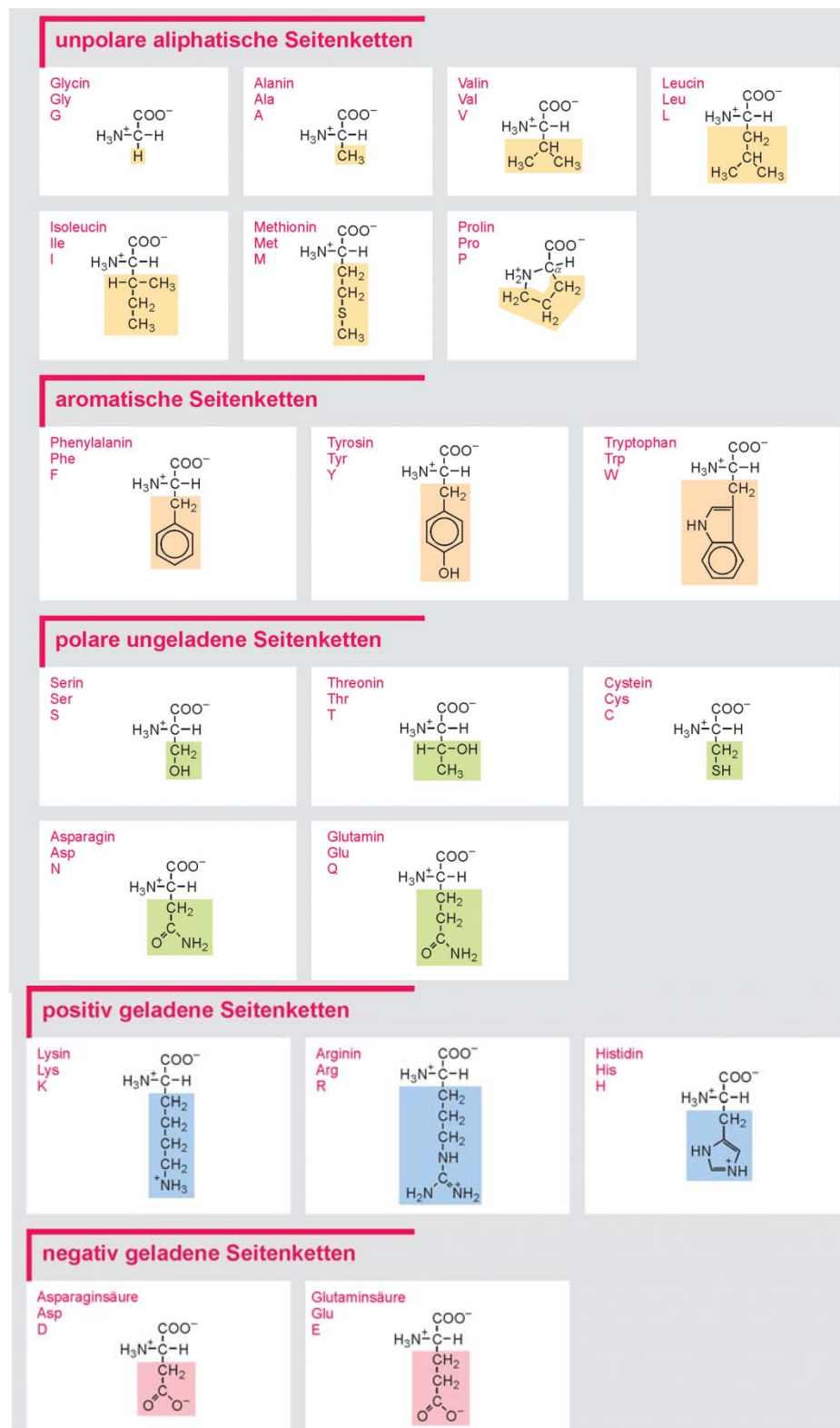
1.5 Pruning cutoff of electrostatic pairwise (PRUNE\_ELE)

1.5 Pruning cutoff of vdw pairwise (PRUNE\_VDW)

-0.06 coefficient used to calculate vdw interaction with implicit water (SAS2VDW)

B. Aminosäuren



(nach Müller-Esterl 2004)



## DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während meiner Doktorarbeit unterstützt und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt.....

### **Prof. Dr. Karin Hauser**

für die Vergabe des interessanten Themas sowie für die hervorragende engagierte Betreuung während meiner gesamten Promotion. Besonders bedanken möchte ich mich für die großen Freiräume, Vertrauen in meine selbständige Arbeit und einer stets offenen Tür bei allen Problemen und Fragen. Ganz herzlich bedanken möchte ich mich auch für die Hilfe und Unterstützung bei der Bewerbung für das DAAD-Stipendium. Der dadurch entstandene Auslandsaufenthalt wird neben dem wissenschaftlichem Gewinn für mich persönlich ein unvergessliches Erlebnis bleiben. Die Teilnahme an allen Konferenzen wäre ohne ihre Unterstützung nicht möglich gewesen. Daher möchte ich mich bedanken, dass immer ein Weg gefunden wurde, mir das zu ermöglichen.

### **Prof. Dr. Werner Mäntele**

für die Übernahme des Zweitgutachtens und einer stets offenen Tür bei allen Problemen und Fragen. Vor allem möchte ich mich aber auch bedanken, dass die Türen des Instituts stets weiterhin offen blieben, auch in der Zeit, in der ich nicht mehr Teil der Frankfurter Biophysik war.

### **Prof. Dr. Rainer Böckmann und Dr. Shirley Siu**

für die nette Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und die Einarbeitung in die Methode der MD-Simulation bedanken.

### **Prof. Dr. Andreas Barth**

möchte ich für den Aufenthalt in seiner Arbeitsgruppe in Stockholm danken. Ebenso gilt der Dank für seine Unterstützung bei der Vorbereitung des Aufenthalts, der Beratung und ergiebigen, hilfreichen Diskussionen zum Thema des Protonengegengentransportes

### **Für finanzielle Unterstützung**

möchte ich mich beim **SFB 472 - Molekulare Bioenergetik**. Beim **CMP-Frankfurt** und **der Deutschen Biophysikalischen Gesellschaft** möchte ich mich für die Reisestipendien zu Tagungen bedanken. Dem **DAAD** danke ich, dass er den Aufenthalt in Stockholm überhaupt erst möglich gemacht hat.

### **CSC-Frankfurt**

Bei dem *Center for Scientific Computing* möchte ich mich für den Zugang zu den Rechenclustern bedanke. Ohne die mir zu Verfügung gestellte Rechenzeit, wäre diese Arbeit nicht entstanden.

### **Den Arbeitsgruppen**

Ein besonderer Dank geht an die Arbeitsgruppen Zumbusch und Wöll in Konstanz und von Plessen und Wuttig in Aachen, die uns einen leichten und schnellen Einstieg in die neue Umgebung ermöglichten. Auch möchte ich herzlichst der Arbeitsgruppe Mäntele in Frankfurt danken, in der ich den Großteil meiner Promotionszeit verbrachte.

### **Meinen Bürokollegen**

Andreas Rau, Gesa Lüdemann, Alexandra Hellerbach, Alexander Popp, und Marina Galetskaya gehört ein großer Dank, da sie mich täglich ertragen durften.

Unvergessen sind und bleiben die Kollegen aus dem Büro 412 in Frankfurt. **Annette Kopitz** und **Jürgen Maurer**. Sie gaben mir während der ganzen Zeit das Gefühl, immer noch in ihrem Büro zu sitzen, egal wie weit ich entfernt war. Ich möchte aber nicht nur Annette, sondern ihrer ganzen Familie danken. Arne, Hannes und Otto haben es immer wieder geschafft, mich nicht verzweifeln zu lassen.

**Dr. Georg Wille**, der Mann des Wortes. Er traute sich auszusprechen woran alle dachten und keiner es sagen wollte.

**Lisa Lorenz** möchte ich danken, dass sie mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand und ich es bis heute nicht vergessen habe, dass sie mich in die IfB-Welt eingeführt hat.

Auch möchte ich allen ehemaligen Mitarbeitern des Instituts für Biophysik, vor allem **Dr. Carsten Krejtschi**, **Dr. Enela Dzafic** und **Dr. Gabriela Schäfer** danken. Enela bin ich zu großem Dank verpflichtet, dass sie ohne zu zögern mir eine Wohnung in Stockholm organisierte, ohne die ich sonst wohl auf der Straße geschlafen hätte.

Am Schluss gilt mein Dank besonders meinen Eltern für ihre stete Unterstützung und für das Verständnis und die Geduld, die sie für meine fast zehnjährige Ausbildung aufbrachten. Meiner Freundin Katharina möchte ich zusätzlich für ihr Verständnis danken, dass sie auch dann noch aufbrachte, wenn andere schon längst aufgegeben hätten. Ich bin sehr dankbar, dass du mich während dieser langen Zeit unterstützt und motiviert hast, auch wenn ich nicht immer dort sein konnte, wo du warst.

## CURRICULUM VITAE

### CHRISTIAN WEIDEMÜLLER

E-Mail: weidemueller@biophysik.org

Geboren am 25. Oktober 1981 in Frankfurt am Main

## SCHULE UND HOCHSCHULSTUDIUM

---

- 09/1992 – 05/2001      **Georg Büchner Gymnasium, Bad Vilbel**  
Abitur 05/2001 (Note 2,3)
- 10/2001 - 02/2007      **Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main**  
Studium der Physik mit Vertiefungsrichtung Biophysik  
Abschluss: Physik-Diplom (sehr gut)
- 10/2005 – 10/2006      Diplomarbeit am Institut für Biophysik: Elektrostatik-Rechnungen zur  
Untersuchung der Energietransduktion in ionentransportierenden  
Membranproteinen  
Note: sehr gut
- 03/2007 – 07/2009      **Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main**  
Promotionsbeginn und Wissenschaftlicher Mitarbeiter am FB Physik im  
Institut für Biophysik im Rahmen des SFB 472 „Molekulare  
Bioenergetik“ – P32 Arbeitsgruppe Hauser
- 08/2009 – 03/2010      **Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen**  
Wissenschaftlicher Mitarbeiter und Fortsetzung der Promotion  
am FB Physik im Physikalischen Institut IA – Biophysikgruppe Hauser
- seit 04/2010              **Universität Konstanz**  
Wissenschaftlicher Mitarbeiter und Fortsetzung der Promotion am FB  
Chemie am Lehrstuhl für Biophysikalische Chemie - Arbeitsgruppe Hauser

## BERUFSBEGLEITENDE TÄTIGKEITEN

---

- 03/2007 – 07/2009      **Goethe-Universität, Frankfurt am Main**
- Betreuer des Physikpraktikums für Mediziner
  - Betreuer des Fortgeschrittenenpraktikums „Biophysik“
  - Übungsleiter zur Vorlesung „Computational Biophysics“
- 10/2009 - 03/2010      **RWTH Aachen**  
Übungsleiter zur Vorlesung „Biophysik“
- seit 03/2010              **Universität Konstanz**  
Übungsleiter "Chemische Thermodynamik"

## AUSZEICHNUNGEN

---

01/2008

**Philipp Siedler-Wissenschaftspreis**

Verliehen vom Physikalischen Verein Frankfurt/Main für hervorragende Diplomarbeiten

## FORSCHUNGAUFENTHALTE

---

06/2007

**Zentrum für Bioinformatik Saarbrücken**

Theoretical & Computational Membrane Biology ; Arbeitsgruppe Böckmann

06/2009 - 08/2009

**Department of Biochemistry and Biophysics, Arrhenius  
Laboratories for Natural Sciences Stockholm University**

Infrared Spectroscopy Group; Arbeitsgruppe Barth

## **ERKLÄRUNG**

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst, keine anderen, als die angegebenen Hilfsmittel verwendet und sämtliche Stellen, die aus benutzten Werken im Wortlaut oder dem Sinne nach entnommen sind, mit Quellen-bzw. Herkunftsangaben kenntlich gemacht habe.

Frankfurt am Main, den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_