

Max-Planck-Institut für Biochemie
Abteilung Molekulare Strukturbiologie

**Theoretische Untersuchungen zur Elektrostatik
bakterieller Porine und zur
Anionentranslokation im Porin Omp32**

Ulrich Zachariae

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der
Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat)
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. N. Rösch

Prüfer der Dissertation:

1. Hon.-Prof. Dr. W. Baumeister
2. Univ.-Prof. Dr. H. Kessler
3. Univ.-Prof. Dr. S. Weinkauf

Die Dissertation wurde am 12. 2. 2004 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 12. 7. 2004 angenommen.

Certainly no subject or field is making more progress on so many fronts at the present moment than biology, and if we were to name the most powerful assumption of all, which leads one on and on in an attempt to understand life, it is that *all things are made of atoms*, and that everything that living things do can be understood in terms of the jiggings and wiggings of atoms.

Richard P. Feynman, *The Feynman Lectures On Physics*, 1965.

In memoriam Erwin Tschierschke

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
2.1	Die äußere Membran gramnegativer Bakterien	3
2.2	Proteine der äußeren Membran	5
2.3	Bakterielle Porine	6
2.4	Das Porin Omp32	9
2.5	Zielsetzung und Fragestellung	13
3	Theoretische Grundlagen	16
3.1	Poisson-Boltzmann-Elektrostatikrechnungen	16
3.1.1	Die Kontinuum-Methode	16
3.1.2	Lösung der Poisson-Boltzmann-Gleichung über finite Diffe- renzen	18
3.1.3	Berechnung von Titrationskurven in Proteinen	21
3.2	Dreidimensionale Poisson-Nernst-Planck-Theorie der Elektrodif- fusion (3D-PNP)	26
3.3	Moleküldynamik-Simulationen	28
3.3.1	Lösung der Bewegungsgleichungen	28
3.3.2	Das Kraftfeld	31
3.3.3	Berechnung der Freien Energie über <i>Umbrella Sampling</i> sowie Kraftspektroskopie-Simulationen	34
4	Einzelheiten der Simulationen	37
4.1	Elektrostatik-Rechnungen	37
4.2	PNP-Modellrechnungen	40
4.3	Moleküldynamik-Rechnungen zum Ionentransfer durch Omp32 . . .	40
4.4	<i>Umbrella-Sampling</i> - und Kraftspektroskopie-Simulationen	42
4.5	Simulationen von Omp32 mit expliziter Membran	43
4.5.1	Aufbau des Simulationssystems	43
4.5.2	Simulationsbedingungen der Produktionsphase	45

5	Ergebnisse	48
5.1	Studien zu den elektrostatischen Eigenschaften von Porinen	48
5.1.1	Die elektrostatischen Eigenschaften von Omp32	48
5.1.2	Titrationenkurven mit funktioneller Bedeutung in den Porinen OmpF und PhoE	58
5.1.3	Der Arginin-Cluster in Porin-Aminosäuresequenzen	64
5.1.4	Die Titrationseigenschaften weiterer proteobakterieller Porine	64
5.2	Poisson-Nernst-Planck-Rechnungen an Modellkanälen	68
5.3	Moleküldynamik-Studien zur Anionentranslokation in Omp32	71
5.3.1	Simulationen mit einem Anion	72
5.3.2	Simulationen mit zwei Anionen und elektrischen Feldern	81
5.3.3	<i>Potential-of-Mean-Force</i> -Profil der Ionentranslokation	83
5.3.4	Kraftspektroskopie-Simulationen	85
5.4	Moleküldynamik-Simulationen eines Omp32-Trimers mit expliziter Membran und Malat-Ionen	89
5.4.1	Simulationssystem	89
5.4.2	Struktur und Stabilität von Omp32 in der Simulation	91
5.4.3	Diffusion und Bindung von Malat-Ionen in Omp32	93
6	Diskussion	101
6.1	Elektrostatische Eigenschaften von Porinen	101
6.1.1	Der Arginin-Cluster der Konstriktionszone unspezifischer Porine	101
6.1.2	Relevanz der Ergebnisse für die Porine OmpF und PhoE	103
6.1.3	Verwendete Methodik	107
6.1.4	Vergleich mit weiteren Porinen	108
6.2	Poisson-Nernst-Planck-Rechnungen	110
6.2.1	Beitrag zur Verfeinerung der Methodik	110
6.2.2	Ergebnisse an Modell-Ionenkanälen	111
6.3	Der Ionentransfer in Omp32	112
6.3.1	Vergleich mit Dynamikstudien am Porin OmpF	112
6.3.2	Vergleich mit experimentellen Daten	115

6.3.3	Vergleich mit Modelltheorien von Ionenkanälen	119
6.3.4	Verwendete Methodik	121
6.4	Moleküldynamik-Simulationen eines Omp32-Trimers	122
6.4.1	Simulationstechnik	122
6.4.2	Struktur des Omp32-Trimers	123
6.4.3	Substratbindung an Omp32	125
7	Literatur	128

1 Zusammenfassung

Die äußere Membran gramnegativer Bakterien enthält porenbildende integrale Proteine, die Porine, welche die Translokation von Ionen und kleinen hydrophilen Molekülen durch die Membran erlauben. Sie sind entweder spezifisch auf die Bindung von Substratmolekülen ausgerichtet oder dienen als unspezifische Porine mit einem breiten Spektrum an translokationsfähigen Molekülen bzw. Ionen. Die individuellen Eigenschaften unspezifischer Porine, wie z.B. Ionenselektivität und -leitfähigkeit, werden im wesentlichen durch den Einfluß der in den Kanälen in großer Anzahl vorkommenden ionisierbaren Aminosäureseitenketten bestimmt.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Titrationseigenschaften der ionisierbaren Gruppen aller unspezifischen Porine berechnet. Dabei wurde ein in allen Strukturen konserviertes, bisher nicht beschriebenes Stabilisierungsmotiv der Ladung auf dem besonders bedeutenden basischen *Cluster* in der engsten Stelle der Poren gefunden. Die auf dieser Basis berechneten Titrationskurven decken sich gut mit experimentellen Daten und stellen ältere theoretische Arbeiten in Frage. Im Porin Omp32 führt diese Stabilität zu einem deutlich positiven elektrostatischen Potential im gesamten Kanal, welches eine der wichtigsten Grundlagen für die gemessene starke Anionenselektivität dieses Kanals ist.

In einem weiteren Teil der Arbeit wurde die Poisson-Nernst-Planck-Methode zur Berechnung des Ionenflusses in Kanalstrukturen verfeinert, indem Terme für die Desolvatationsenergie und die endliche Ausdehnung der Ionen in die Algorithmen eingebracht wurden. Der neue Algorithmus wurde auf Kanalmodelle angewendet und zeigte eine deutliche Verbesserung der Methodik.

Die theoretische Untersuchung der atomaren dynamischen Eigenschaften der Anionenleitung in Omp32 führte zur Entdeckung eines neuen, eigenständigen Mechanismus der Ionentranslokation durch ein Kanalprotein. Die Ionen werden dabei stufenweise auf einer "Leiter" aus basischen Gruppen durch die Engstelle der Pore geführt, wobei starke Wechselwirkungen zwischen den Anionen und den Basen zu beobachten sind. Das berechnete zugehörige Profil der Freien Energie der Anionenpassage weist Bindungszustände und aktivierte Prozesse des Transfers zwischen den entsprechenden Basen auf und erklärt einige der besonderen Eigenschaften

dieses Porins, die in elektrophysiologischen Experimenten beschrieben wurden.

Schließlich konnten Molekül-Dynamiksimulationen am Gesamtsystem, bestehend aus einem Omp32-Trimer, expliziten Membranmolekülen und Wasser, zeigen, wie effizient das elektrostatische Potential in und um Omp32 Malat als anionisches Substratmolekül in die Engstelle der Pore leitet und es in der Folge von Omp32 gebunden wird. Dabei wurden alle drei Poren innerhalb 1 ns mit Malat-Ionen besetzt.

2 Einleitung

2.1 Die äußere Membran gramnegativer Bakterien

Biologische Zellen grenzen sich gegenüber ihrer Umgebung durch Membranen ab, die hauptsächlich aus einer Doppelschicht von Lipidmolekülen und Membranproteinen bestehen. Durch diese Separierung wird eine regulierte Organisation des zellulären Stoffwechsels ermöglicht.

Bakterielle Zellen können – dem Aufbau ihrer Zellwand entsprechend – in grampositive und gramnegative Organismen eingeteilt werden. Grampositive Zellen besitzen eine Zellmembran, die von einer Schicht aus einem Peptidoglykan-Polymer außen umschlossen wird. Das Membransystem gramnegativer Bakterien umfaßt zwei Lipiddoppelschichten, die innere und die äußere Membran. Im periplasmatischen Raum zwischen diesen zwei Membranen befindet sich eine vergleichsweise dünne Peptidoglykanschicht.

Im Gegensatz zur inneren Membran stellt die äußere Membran eine stark asymmetrische Struktur dar. Die externe Lipidschicht besteht aus den für gramnegative Bakterien charakteristischen Lipopolysaccharidmolekülen (LPS), während die periplasmatische Seite aus den für Zellmembranen üblichen Phospholipiden aufgebaut ist.

Die äußere Membran wird über Lipoproteine, z.B. das Braunsche Protein, an die Peptidoglykanschicht des Periplasmas gebunden oder durch Kontakte zwischen Proteinen der äußeren und inneren Membran immobilisiert (Koronakis, 2003). Ihre mechanische Stabilität wird durch integrale Membranproteine erhöht (Höltje, 1998). Die äußere Membran dient als weiterer Schutzschild gegen überlebenswidrige Bedingungen in der Umgebung des bakteriellen Organismus (wie z.B. ungünstige pH-Werte), Detergenzien wie Gallensäuren und Verdauungsenzyme. Eine weitere Schutz- und Stabilisierungsfunktion können sogenannte *S-Layer* übernehmen, die aus einer zweidimensionalen quasikristallinen Proteinstruktur bestehen und die äußere Zellwandschicht einiger gramnegativer und -positiver Bakterien bilden (Engelhardt und Peters, 1998).

Hydratisierte Lipiddoppelschichten stellen eine schwer überwindbare Barriere sowohl für hydrophile als auch für lipophile Moleküle dar. Die Fähigkeit der Zel-

len, solche Substanzen mit ihrer Umgebung auszutauschen, beruht deswegen auf der Präsenz spezieller Membran-integrierter Kanalproteine. Sie sind entweder spezifisch auf den Austausch bestimmter Klassen von Molekülen oder Proteinen ausgerichtet oder wirken als generelle Diffusionsporen mit einem breiten Substratspektrum.

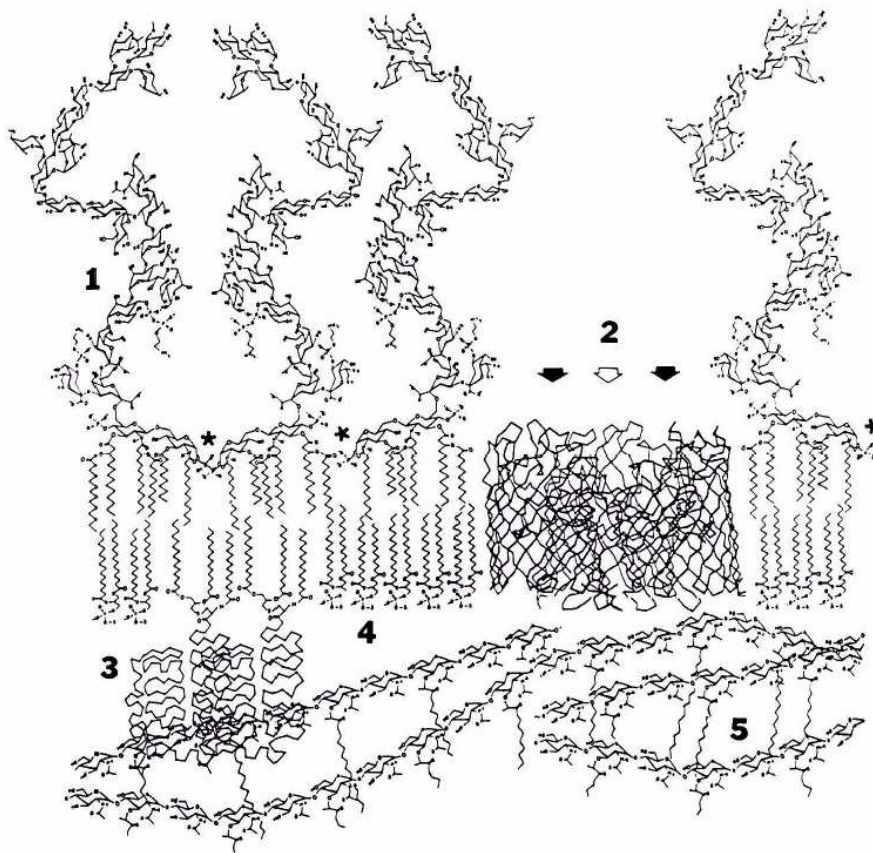


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Aufbaus der äußeren Bakterienmembran von *E. coli*. (1) Lipopolysaccharid. (2) Porintrimer (OmpF). (3) Braunsches Lipoprotein. (4) Phospholipide. (5) Peptidoglykan. (*) Bindungsstellen für zweiwertige Kationen. Aus Hancock *et al.* (1994).

2.2 Proteine der äußeren Membran

Annähernd 50 % der Masse der äußeren Membran kann integralen Membranproteinen und membranverankerten Lipoproteinen zugeschrieben werden (Koebnik *et al.*, 2000). Ihr Reichtum an Poren- bzw. Kanalproteinen führt dazu, daß die äußere Membran wesentlich durchlässiger ist als die innere Membran. Dies resultiert in ihrer Beschreibung als "Sieb mit molekularen Dimensionen" (Nikaido, 1992).

Aufgrund ihrer evolutionären Verwandtschaft teilen Mitochondrien und Chloroplasten höherer Organismen die Doppelmembranstruktur gramnegativer Bakterien. Unter den integralen Proteinen der äußeren Membran befinden sich allgemeine Porine, Komponenten des Proteinexportsystems wie Autotransporter, Proteine des Sekretionsapparates und Enzyme. Äußere Membranproteine von Bakterien spielen außerdem eine Rolle als Rezeptoren für Bakteriophagen.

Alle integralen Proteine bakterieller äußerer Membranen besitzen eine β -*Barrel*-Architektur. Sie bestehen aus einer geraden Anzahl antiparalleler β -Stränge, die zur *Barrel*-Achse verkippt sind. Im Gegensatz dazu bilden die Membranintegrierten Anteile von Proteinen der inneren Membran ausschließlich α -helikale Strukturen aus (Schulz, 2003).

Die β -*Barrel*-Proteine der äußeren Membran exponieren in Richtung des inneren Teils der Membran eine stark hydrophobe Oberfläche. Lange bevor die erste atomare Struktur eines Membranproteins gelöst wurde, wurde angenommen, daß nur reguläre sekundäre Proteinstrukturelemente in der Lage sind, den membran-durchspannenden Teil dieser Proteine aufzubauen. Der Grund hierfür ist, daß ihr Potential, Wasserstoffbrücken zu bilden, maximal abgesättigt ist (Koebnik *et al.*, 2000).

Äußere Membranproteine lassen sich in Strukturen mit 8, 10, 12, 16, 18 und 22 β -Strängen unterteilen. Man kann sie weiter mit Hilfe ihrer Scherzahl klassifizieren, die ein Maß für die Staffelung bzw. Verkipfung der β -Stränge darstellt.

Die Funktion der 8-strängigen β -*Barrel*-Proteine ist bislang noch nicht eindeutig bestimmt worden. Jedoch erscheint für sie eine Rolle in der Zelladhäsion am plausibelsten. 16- und 18-strängige β -*Barrels* dienen als Poren und Kanäle, die den Import und Export kleiner Moleküle durch die Membran ermöglichen. Die Struk-

turen der Eisen-spezifischen Siderophorkanäle sind aus 22 β -Strängen aufgebaut (Ferguson *et al.*, 1998). Dagegen zeigen 12-strängige β -Barrel-Proteine entweder enzymatische Aktivität (z.B. OMPLA-Phospholipase aus *E. coli*), oder sie bilden ebenfalls Membrankanäle (z.B. TolC aus *E. coli*).

Klassen von Proteinen der äußeren Membran

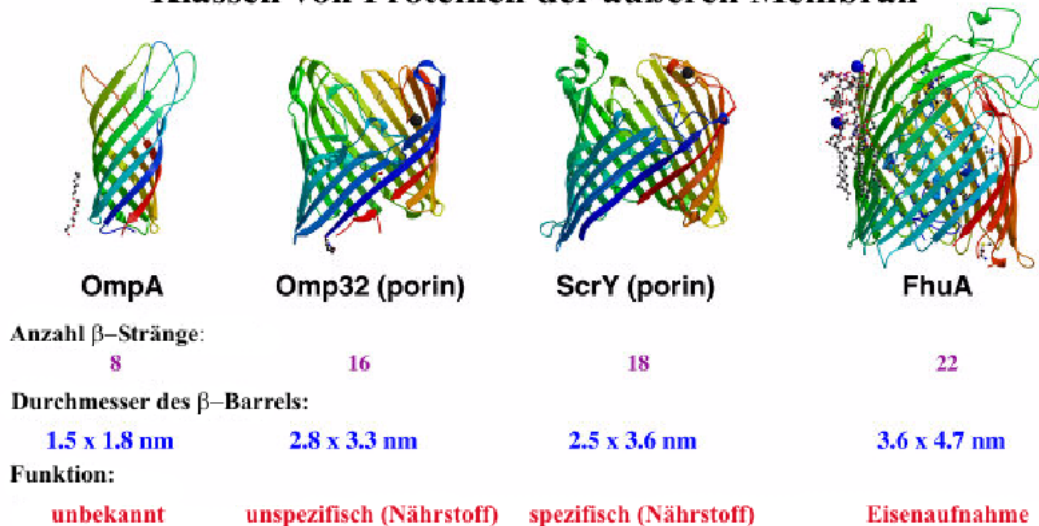


Abbildung 2: Jeweils ein Vertreter vierer Klassen von β -Barrel-Proteinen der äußeren Bakterienmembran. Sie werden anhand der Anzahl ihrer β -Stränge unterschieden. Die Proteine sind, beginnend am N-Terminus, von rot nach blau eingefärbt. Darunter ist die Anzahl der β -Stränge angegeben. Der angegebene Durchmesser wurde als Distanz zweier gegenüberliegender C_{α} -Atome des porenbildenden *Barrels* gemessen. Die Funktion des Proteins ist in der letzten Zeile aufgeführt. Nach Zeth (2000).

2.3 Bakterielle Porine

Äußere Membranen von Bakterien sind besonders reich an 16- und 18-strängigen β -Barrel-Kanälen, den sogenannten Porinen. Sie bilden jeweils Homotrimere in der Membran, deren drei Poren die äußere Membran für die Passage von polaren Verbindungen relativ geringen Molekulargewichts überbrücken. Die 18-strängigen Kanäle zeigen eine Spezifität für die Aufnahme bestimmter Substrate, z.B. Zuckermoleküle (Maltoporin), während die 16-strängigen Porine unspezifisch sind. Un-

spezifische Porine besitzen allerdings in der Regel eine zum Teil erhebliche Selektivität für kationische oder anionische Moleküle.

Die individuelle Geometrie von Porinen wird durch einen oder mehrere extrazelluläre *Loops* bestimmt, die sich in die – durch das β -Barrel-Gerüst gebildete – Kanalöffnung falten (siehe Abb. 3).

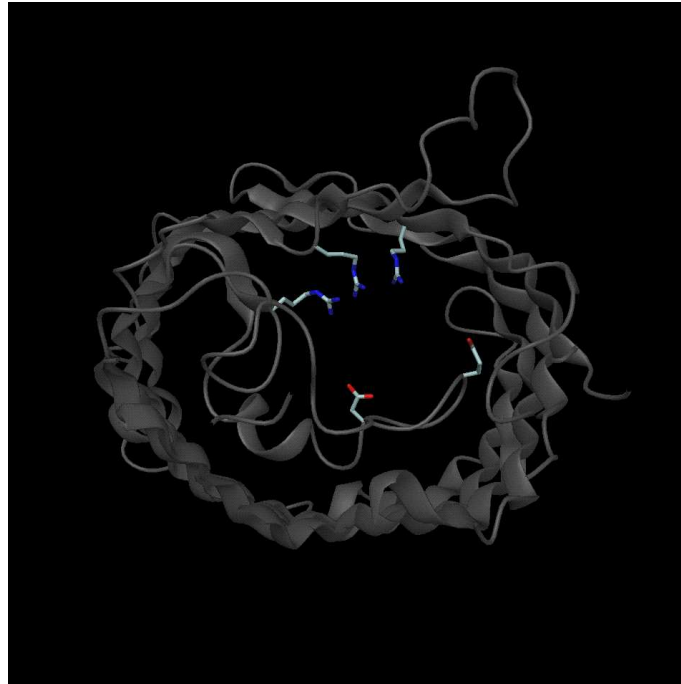


Abbildung 3: Architektur des kationenselektiven Porins OmpF aus *E. coli*. Deutlich wird das β -Barrel-Gerüst und die in das Gerüst hinein gefalteten *Loops*, die die Pore verengen und deren Geometrie bestimmen. Hervorgehoben sind der Arginin-Cluster in der Konstriktionszone und die Säuren auf der gegenüberliegenden Kanalseite, die ein Gegengewicht zu dem basischen Cluster darstellen. Die Struktur entstammt Cowan *et al.* (1992), PDB (Berman *et al.*, 2000) Eintrag: 2OMF. Die Darstellung wurde mit dem molekularen Visualisierungsprogramm DINO produziert (Internet: www.dino3d.org).

Diese *Loops* verengen die Pore in Richtung des Kanalmittelpunkts. Dadurch wird der Pore entlang der Längsachse eine sanduhrartige Form verliehen. Den schmalsten Bereich der Pore etwa auf halber Höhe bezeichnet man als Konstriktionszone. Die funktionellen Eigenschaften der einzelnen Porine werden dem Zu-

sammenspiel zwischen der dreidimensionalen Geometrie des Kanals und dem Effekt funktionell bedeutsamer Aminosäurereste zugeschrieben. Diese sind besonders im Bereich der Konstriktionszone zu finden und haben großen Einfluß auf die elektrostatischen Eigenschaften des Kanals. Hierbei ist insbesondere auf einen *Cluster* von Argininresten hinzuweisen, der in allen unspezifischen Porinen in der Konstriktionszone vorhanden ist (siehe Abb. 3). Unspezifische Porine besitzen generell ein stark polares Kanalinneres. Die Konstriktionszone enthält üblicherweise eine große Anzahl geladener Seitenketten in eng benachbarten Positionen. Ob und wie stark eine Selektivität des Porins für anionische oder kationische Substanzen vorherrscht, scheint im wesentlichen durch den Ladungszustand dieser Kanalregion bestimmt zu werden (Phale *et al.*, 2001).

Die erste Strukturaufklärung eines bakteriellen Porins erfolgte 1992 (Porin aus *Rhodobacter capsulatus*; Weiss *et al.*, 1992). Über die folgenden Jahre wurden die atomaren Strukturen einer Reihe weiterer Porine gelöst. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die bekannten Strukturen unspezifischer Porine und deren Selektivität.

Tabelle 1: Strukturell aufgeklärte unspezifische bakterielle Porine.

Porin	Organismus	MW (Monomer)	Selektivität
OmpF	<i>Escherichia coli</i>	37 kD	moderat kationenselektiv
PhoE ¹	<i>Escherichia coli</i>	37 kD	moderat anionenselektiv
OmpK36 ²	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	38 kD	stark kationenselektiv
Porin	<i>Rhodobacter capsulatus</i>	32 kD	moderat kationenselektiv
Porin ³	<i>Rhodobacter blasticus</i>	31 kD	moderat kationenselektiv
Porin ⁴	<i>Paracoccus denitrificans</i>	38 kD	nahezu unselektiv
Omp32 ⁵	<i>Delftia acidovorans</i>	32 kD	stark anionenselektiv

Bis zur vorliegenden Arbeit waren PhoE und insbesondere OmpF die einzigen unspezifischen Porine, die mit Hilfe theoretischer Modellrechnung im Hinblick auf ihre elektrostatischen Eigenschaften (Karshikoff *et al.*, 1994) sowie einige Aspekte

¹OmpF und PhoE: Cowan *et al.* (1992).

²Dutzler *et al.* (1999).

³Kreusch und Schulz (1994).

⁴Hirsch *et al.* (1997).

⁵Zeth *et al.* (2000).

ihrer Dynamik und Ionenleitfunktion untersucht worden waren (Im und Roux, 2002a, 2002b; Schirmer und Phale, 1999; Tieleman und Berendsen, 1998; Suenaga *et al.*, 1998; Im *et al.*, 2000).

Bisher sind zwei atomare Strukturen spezifischer Porine bekannt: Maltoporin (Schirmer *et al.*, 1995) und ScrY (Forst *et al.*, 1998), beide aus *Salmonella typhimurium*. Der Mechanismus und das Profil der potentiellen Energie der Zuckermolekül-Translokation in Maltoporin wurde ebenfalls mit einer theoretischen Methode untersucht (Dutzler *et al.*, 2002a).

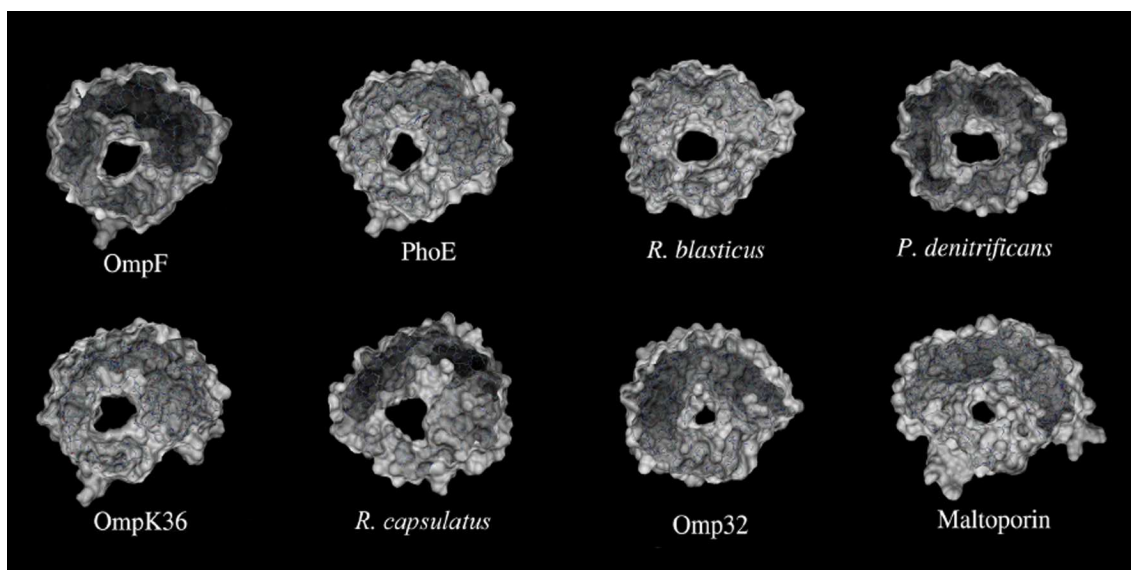


Abbildung 4: Vergleich der Porengröße einiger strukturell bekannter bakterieller Porine. Besonders hinzuweisen ist auf den geringen Porenquerschnitt in Omp32, der den der anderen unspezifischen Porine deutlich unterschreitet und deshalb eher mit dem eines spezifischen Porins, z.B. Maltoporin, vergleichbar ist. Daher wird eine zumindest partielle Spezifität für organische Säuren von Omp32 postuliert.

2.4 Das Porin Omp32

Omp32 (Zeth *et al.*, 2000) ist das dominierende Protein in der äußeren Membran von *Delftia acidovorans*, ehemals *Comamonas acidovorans*, einem Mitglied der β -Untergruppe der Proteobakterien (Gerbl-Rieger *et al.*, 1992). *D. acidovorans* ist

ein Organismus, der besonders im Boden und in Süßwasserseen vorkommt und bevorzugt auf organischen Säuren (insbesondere Äpfelsäure) als Substrat wächst (Willems *et al.*, 1992). Er kann jedoch – als fakultativ pathogenes Bakterium – ebenfalls als Verursacher opportunistischer Infektionen auftreten (Bofill *et al.*, 1996).

Das Porin Omp32 ist ein besonders gut geeignetes Objekt, um die Beziehung zwischen den strukturellen und funktionellen Eigenschaften der Porine besser verstehen zu lernen, da es eine Reihe von Besonderheiten aufweist:

- Omp32 zeigt von allen unspezifischen Porinen die höchste Selektivität für Anionen (Mathes und Engelhardt, 1998)
- die Pore von Omp32 enthält als einzige keine Solvens-exponierten sauren Seitenketten als Ausgleich für den basischen *Cluster* (s.u.)
- Omp32 besitzt mit einer minimalen Querschnittsfläche von 25 \AA^2 den engsten Kanal unter den unspezifischen Porinen (siehe Abb. 4).

Alle unspezifischen Porine zeigen ein Schließverhalten beim Anlegen transmembraner Spannungen über 100 – 200 mV. Eine widerspruchsfreie Erklärung der Funktion und des Mechanismus dieses spannungsabhängigen *Gatings* ist bislang noch nicht erzielt worden, obwohl sich bereits einige Publikationen mit diesem Thema beschäftigten und darin eine Reihe von Modellen vorgeschlagen wurden (z.B. in Brunen und Engelhardt, 1995; Björkstén *et al.*, 1994; Watanabe *et al.*, 1997). Omp32 stellt hier erneut einen Sonderfall dar, da es die ersten Schließvorgänge bereits bei transmembranen Spannungen von nur 50 mV zeigt (siehe Abb. 5).

Der geringe Porenquerschnitt in Omp32 legt die Vermutung nahe, daß in diesem Porin besonders ausgeprägte Wechselwirkungen zwischen Ionen bzw. Nährstoffmolekülen und den Aminosäureresten im Kanal auftreten. So weist Omp32 in elektrophysiologischen Experimenten Eigenschaften auf, die bisher von anderen Porinen nicht beschrieben wurden. Wird eine variable Potentialdifferenz an eine Omp32 enthaltende künstliche Lipidmembran angelegt, so zeigen sich stark von der üblichen Linearität abweichende Strom-Spannungs-Kurven (Mathes und Engelhardt, 1998). Diese Abweichung ist besonders im Bereich geringer Elektrolyt-Ionenstärken deutlich ausgeprägt (3 – 100 mM KCl). Daneben ist die Leitfähigkeit

von Omp32 stark asymmetrisch in bezug auf die Polarität der angelegten Spannung. Außerdem zeigt Omp32 im Verhältnis zu reinen Elektrolytlösungen eine stark abweichende Abhängigkeit der Leitfähigkeit von der Salzkonzentration.

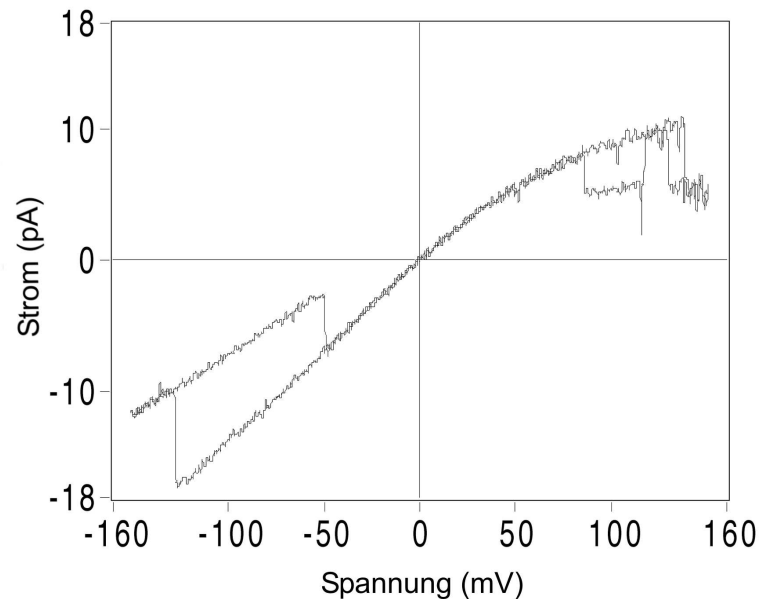


Abbildung 5: Strom-Spannungs-Charakteristik von Omp32, eingebettet in eine planare Membran. Deutlich erkennbar sind die erhebliche Asymmetrie und Nicht-linearität der Kurve. Schließ- und Öffnungsereignisse treten u.a. bei -50 und -130 mV sowie bei +80 und +120 mV auf und sind an den Stufen der Kurve erkennbar. Die Messung wurde in 10 mM KCl-Lösung durchgeführt. Nach Mathes und Engelhardt (1998).

Alle Phänomene lassen auf – in Porinen bisher unbekannte – Interaktionen zwischen Ionen und Protein zurückschließen, die die reine Diffusion durch den Proteinkanal stören. Aufgrund des besonders geringen Porenquerschnitts ist es auch vorstellbar, daß größere (geladene) Nährstoffmoleküle spezifische Wechselwirkungen eingehen. Da *D. acidovorans* gut auf organischen Säuren wächst und Omp32 stark anionenselektiv ist, wäre besonders eine Spezifität für (im ionisierten Zustand vorliegende) Carbonsäuren wie Malat plausibel.

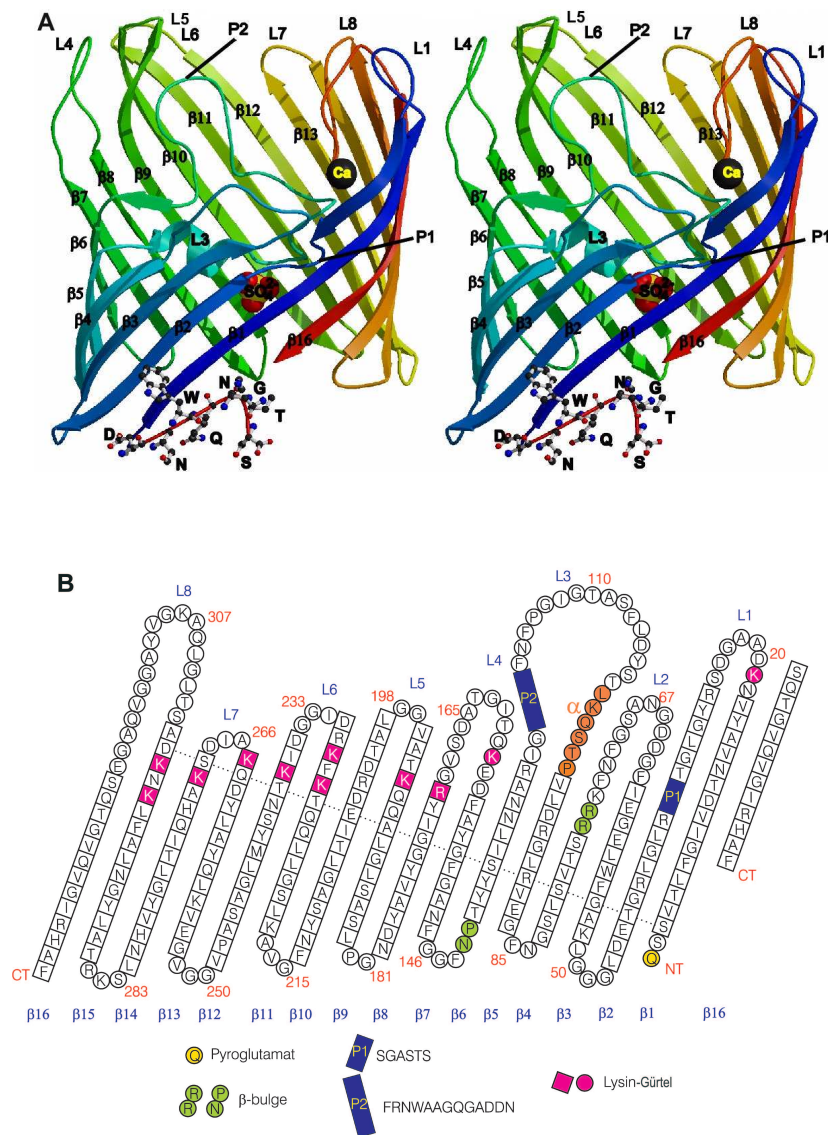


Abbildung 6: (A) Stereobild der Faltung eines Monomers von Omp32. Am periplasmatischen Rand des Monomers (unten) ist ein Teil eines Peptids dargestellt, das *in vivo* an Omp32 assoziiert ist. Die Farbgebung beginnt mit blau am N-Terminus und endet mit rot am C-Terminus. Die β -Stränge sind mit $\beta 1 - \beta 16$ gekennzeichnet, die extrazellulären Loops mit L1 - L8. Bei L5 - L7 handelt es sich eigentlich um β -Turns. P1 ist eine *Protrusion* in der Mitte von β -Strang 3, die in Richtung des Kanals zeigt. P2 ist eine *Protrusion* von L3, die zur äußeren Oberfläche des Porins weist. Ein kurzer Teil von L3 ist α -helikal. Das gebundene Ca^{2+} -Ion ist schwarz dargestellt. In der Kristallstruktur befindet sich ein gebundenes Sulfat-Ion im Kanal (SO_4^{2-}). (B) Faltungsmodell und Aminosäuresequenz von Omp32. Aus Zeth *et al.*, 2000.

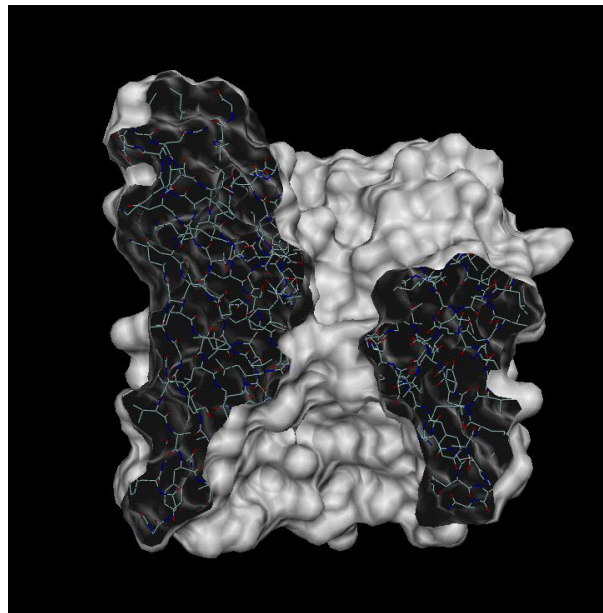


Abbildung 7: Solvenz zugängliche Oberflächendarstellung der Struktur eines Monomers von Omp32. Deutlich wird die lange und schmale Konstriktionszone, die das mittlere Drittel der Pore entlang der Längsachse einnimmt. Der obere, extrazelluläre Eingangsbereich wird durch eine starke Asymmetrie gekennzeichnet, die einen breiten Eingangstrichter auf der extrazellulären Seite im Trimer schafft. Die Struktur entstammt Zeth *et al.*, 2000; PDB-Datei: 1E54.

Zeth *et al.* (2000) lösten die Kristallstruktur von Omp32 (Abb. 6 A und 7). Das Faltungsmodell von Omp32 ist in Abb. 6 B dargestellt. Auf der Basis der atomaren Struktur sollte in dieser Arbeit versucht werden, durch theoretische Modellrechnungen Erklärungen für die ungewöhnlichen meßbaren Eigenschaften dieses Porins zu finden und seine strukturellen Besonderheiten mit der Funktion in Beziehung zu setzen.

2.5 Zielsetzung und Fragestellung

Die einzige Möglichkeit, den Zeitverlauf dynamischer Prozesse in Ionenkanälen auf atomarem Niveau zu verfolgen, besteht in der Anwendung von Computersimulationen. Insbesondere die Moleküldynamik-Simulation liefert eine vollständige Beschreibung der Freiheitsgrade aller Teilchen im System. Ein Nachteil ist die lange Rechenzeit für solche Studien, die kaum mehr als einen Produk-

tionslauf ermöglicht. Schränkt man das System auf die für die Funktion wesentlichen Freiheitsgrade ein, so können wiederholte Simulationsläufe erfolgen und z.B. die Energetik des Ionendurchgangs über stückweise Fenster-Simulationen berechnet werden.

Diese Ergebnisse können dazu dienen, makroskopisch meßbare Eigenschaften der Ionenkanäle auf atomarer Basis zu erklären. Um die Simulationen von einem korrekten Datensatz aus zu starten, müssen zunächst die Ladungszustände der ionisierbaren Gruppen des Proteins mit Elektrostatikrechnungen bestimmt werden, wenn z.B. die Größe oder Struktur des Proteins eine experimentelle Bestimmung beispielsweise durch NMR-, IR- oder Mutationsstudien nicht erlaubt. Die Berechnung des elektrostatischen Potentials in Ionenkanälen liefert weitere wichtige Informationen zur Erklärung der Ionenselektivität und Leitfähigkeitseigenschaften.

Erfolge in der Annäherung an die zentrale Frage der Strukturbiologie, der Beziehung zwischen molekularer Struktur und biologischer Funktion, wurden in den letzten Jahren durch Anwendung von Computersimulationen und Elektrostatikrechnungen häufig erzielt (siehe Karplus und McCammon, 2002; Tieleman *et al.*, 2001; Sansom *et al.*, 2000). Auf dem Gebiet der Kanalproteine sind hierzu v.a. Arbeiten zum Mechanismus der Wasser- und Glycerintranslokation in Aquaporinen und Aquaglyceroporinen (de Groot und Grubmüller, 2001; Jensen *et al.*, 2001) und die Berechnung des Energieprofils und der elektrostatischen Eigenschaften der Kalium-Ionenleitung im KcsA-Kanal (Roux und MacKinnon, 1999; Bernèche und Roux, 2000) zu nennen.

Neben einem verbesserten grundlegenden Verständnis der Funktion von Kanalproteinen können Studien an bakteriellen Porinen mittelfristig dazu dienen, wirkungsvollere Medikamente gegen pathogene Mikroorganismen zu entwickeln. Die Porine von *Bordetella pertussis*, *Neisseria gonorrhoeae* und *Neisseria meningitidis*, den Verursachern schwerer Infektionskrankheiten, sind mit dem untersuchten Omp32 aus *D. acidovorans* eng verwandt. Eine Reihe von Stämmen hat Resistenzen gegen bestimmte Antibiotika entwickelt, indem Mutationen auf dem *Loop 3* auftraten, der die Konstriktionszone der strukturell bekannten Porine hauptsächlich formt (Achouak *et al.*, 2001). Das Potential rechnerischer Methoden zur Aufklärung der Bindung von Chemotherapeutika an Porine wird z.B. in Mafe *et al.* (2003) und

Nestorovich *et al.* (2002) herausgestellt.

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war, die kurz vorher gelöste Kristallstruktur des Porins Omp32 mittels theoretischer biophysikalischer Techniken zu untersuchen. Dafür mußten besonders die elektrostatischen Verhältnisse in und um die Pore von Omp32 und ihre Wirkung auf Ionenleitfähigkeit und -selektivität, auch im Vergleich mit anderen Porinstrukturen, geklärt werden. Hierzu sollten Poisson-Boltzmann-Rechnungen zur Bestimmung der Titrationseigenschaften der ionisierbaren Gruppen und des Potentials von Omp32 durchgeführt werden.

Die einzigartigen Eigenschaften von Omp32 in elektrophysiologischen Experimenten legten daneben eine Untersuchung des Mechanismus und des Energieprofils der Ionenleitung in diesem Kanal mit Hilfe von Moleküldynamik-Simulationen unter besonderer Berücksichtigung der engen Konstriktionszone nahe. Das Gesamtsystem, bestehend aus Solvens, trimerem Omp32 und expliziten Membranzmolekülen sollte zudem in bezug auf Dynamik, Stabilität und seine Wechselwirkungen mit den bevorzugten Substratmolekülen von *D. acidovorans* (Malat-Ionen) mittels Moleküldynamik-Simulationen untersucht werden.

Die vor dieser Arbeit veröffentlichten Poisson-Nernst-Planck-(PNP)-Elektrodiffusionsmethoden zur Berechnung des Ionenflusses in Kanalstrukturen berücksichtigten die partielle Desolvatation der Ionen in engen Kanälen nicht ausreichend. Neue Entwicklungen zur Kombination schneller PNP-Algorithmen mit gleichzeitiger Behandlung von Desolvatationseffekten wurden deswegen insbesondere durch den geringen Querschnitt der Pore von Omp32 erfordert.

3 Theoretische Grundlagen

3.1 Poisson-Boltzmann-Elektrostatikrechnungen

Proteine enthalten in der Regel eine Vielzahl ionisierbarer Gruppen, deren Ladungszustand eng mit den funktionellen Eigenschaften dieser Moleküle verknüpft ist. Die pK_a -Werte von titrierbaren Aminosäuren im Protein unterscheiden sich z.T. deutlich von in Lösung gemessenen Werten. Poisson-Boltzmann-Rechnungen werden angewendet, um das Titrationsverhalten ionisierbarer Gruppen in Proteinen sowie ihr elektrostatisches Potential zu bestimmen.

3.1.1 Die Kontinuum-Methode

Im Rahmen der Poisson-Boltzmann-Theorie und anderer Kontinuum-Methoden werden das Protein und sein umgebendes Solvens als Medien behandelt, die durch ihre makroskopische Dielektrizitätskonstante gekennzeichnet sind. Die klassische Poisson-Boltzmann-Methodik betrachtet das Protein als starre Struktur mit kleiner Dielektrizitätskonstante (üblich sind Werte von $\epsilon_p = 2 - 20$), die von einer wässrigen Lösung mit hoher Dielektrizitätskonstante ($\epsilon_s \approx 80$) umgeben wird. Die Grenze zwischen diesen Bereichen wird auf der Basis einer atomaren Struktur des Proteins oder eines Proteinmodells berechnet, wobei man die van-der-Waals-Radien der Proteinatome und einen modellhaften Solvensradius benutzt. Als weiterer Parameter wird die Ionenstärke des Solvens verwendet. An der dielektrischen Grenzoberfläche kann eine Solvensschicht definiert werden, in die keine gelösten Ionen eintreten können (Stern-Schicht).

Die Poisson-Gleichung setzt den Gradienten des elektrostatischen Potentials $\phi(\vec{r})$ mit der Ladungsdichte $\rho(\vec{r})$ in einem System veränderlicher Dielektrizitätskonstanten $\epsilon(\vec{r})$ in Beziehung. Die Ladungsdichte setzt sich hier aus der Verteilung ortsfester Ladungen des Proteins $\rho_p(\vec{r})$ und der Verteilung der Ladung freier Ionen der Lösung $\rho_s(\vec{r})$ zusammen:

$$-\nabla(\epsilon(\vec{r})\nabla\phi(\vec{r})) = 4\pi(\rho_p(\vec{r}) + \rho_s(\vec{r})) \quad (1)$$

Für Ionenstärken größer als Null muß die Mobilität der Ionen zusätzlich in Betracht gezogen werden, d.h. ihre Fähigkeit, sich an Orten mit günstiger potentieller Energie anzusammeln. Es kann angenommen werden, daß die mobilen Ionen mit ihren Ladungen $z_i e$ eine Boltzmann-Verteilung einhalten (z_i ist dabei die Ionenwertigkeit, e die Elementarladung). Setzt man diese Ladungsverteilung in die Poisson-Gleichung (1) ein, so erhält man die Poisson-Boltzmann-Gleichung (PBE):

$$-\nabla(\epsilon(\vec{r})\nabla\phi(\vec{r})) = 4\pi\rho_p(\vec{r}) + 4\pi\sum_i c_i z_i e \cdot \exp\left(\frac{-z_i e\phi(\vec{r})}{kT}\right) \quad (2)$$

Die Summe erfolgt über alle Ionentypen i ; die Ionenkonzentrationen in der Elektrolytlösung sind c_i , k ist die Boltzmann-Konstante. Die Poisson-Boltzmann-Gleichung ist eine nichtlineare Differentialgleichung, deren Lösung erhebliche mathematische Schwierigkeiten aufwirft. Zudem sind die elektrostatischen Potentiale, die man durch ihre Lösung erhält, nicht-additiv, d.h. das elektrostatische Potential des Gesamtsystems kann nicht als Summe der Potentiale der einzelnen im System vorhandenen Ladungen bestimmt werden.

Aus diesem Grund wird die Poisson-Boltzmann-Gleichung im allgemeinen linearisiert, indem der Exponentialterm in Gleichung (2) durch das lineare Glied seiner Reihenentwicklung approximiert wird. Ein weiterer Faktor, der Debyesche Abschirmungsparameter κ , wird eingeführt, um den Abschirmungseffekten einer Ionenladung durch Gegenionen in Elektrolytlösungen Rechnung zu tragen. κ wird definiert als:

$$\kappa^2 = \frac{8\pi N_A e^2 I}{1000\epsilon_s kT} \quad (3)$$

$I = 1/2\sum c_i z_i^2$ ist die Ionenstärke der Elektrolytlösung, N_A die Avogadro-Konstante. Die Linearisierung und die Einführung von κ ergibt die lineare Poisson-Boltzmann-Gleichung (oft abgekürzt als LPBE):

$$\nabla(\epsilon(\vec{r})\nabla\phi(\vec{r})) - \kappa^2\epsilon_s\phi(\vec{r}) + 4\pi\rho_p(\vec{r}) = 0 \quad (4)$$

Eine detailliertere Ableitung der LPBE ist in Tanford (1961) zu finden. Es kann gezeigt werden, daß die nicht-lineare und die lineare PBE in der Praxis zu annäherd gleichen Resultaten führen, besonders im Rahmen physiologisch relevanter Ionenstärken (Zhou, 1994). Die Potentiale als Lösungen der LPBE sind additiv, und es existieren effiziente Rechenalgorithmen zur Lösung der LPBE.

3.1.2 Lösung der Poisson-Boltzmann-Gleichung über finite Differenzen

Eine analytische Lösung der LPBE ist nur in solchen Fällen möglich, in denen das Protein als Körper mit einer einfachen, regulären Form modelliert werden kann, z.B. als Kugel. Die komplizierte dreidimensionale Geometrie von Proteinen erfordert jedoch im allgemeinen eine numerische Lösung der LPBE. Hierzu wurden verschiedene Lösungsverfahren entwickelt. Die am häufigsten – so auch in dieser Arbeit – verwendete Methode ist dabei die Lösung über finite Differenzen (Warwicker und Watson, 1982).

Dazu wird das System diskretisiert, d.h. alle das System beschreibenden Parameter werden auf ein kubisches Gitter übertragen. Jedem Gitterpunkt werden Werte für Ladung, Dielektrizitätskonstante und Debye-Parameter zugeordnet. Dabei ist der Debye-Parameter Null für Gitterpunkte innerhalb des Proteins. Die Verteilung der partiellen bzw. integralen Ladungen der Systematome auf die acht nächstliegenden Gitterpunkte erfolgt meist entsprechend ihrer jeweiligen Entfernung von den einzelnen Punkten. Mit Hilfe der Diskretisierung reduziert sich das Problem, $\phi(\vec{r})$ für das gesamte System zu finden, auf die Berechnung von ϕ_i für jeden Gitterpunkt. Die Differentialoperatoren können in dieser Form durch Differenzen der den Gitterpunkten zugeteilten Werte ersetzt werden. Beim Übergang zu einem System diskreter Punkte werden die Größen an den Punkten i durch Integration über den Raum erhalten, der Punkt i umgibt, d.h. jede Größe ist ein Mittelwert für das betreffende Volumen. Ein Volumenelement ist dabei ein Würfel mit Seitenlänge h (Gitterabstand). Integriert man die LPBE über ein Volumenelement, so erhält man:

$$\iiint \nabla(\epsilon(\vec{r})\nabla\phi(\vec{r}))d^3x - \iiint \kappa^2\epsilon_s\phi(\vec{r})d^3x + 4\pi \iiint \rho_p(\vec{r})d^3x = 0 \quad (5)$$

Das zweite Integral kann durch $\kappa_i^2 \epsilon_s \phi_i h^3$ angenähert werden. κ_i ist der dem Gitterpunkt i zugeordnete Debye-Hückel-Parameter. Das dritte Integral geht in $4\pi q_i$ über, wobei q_i die gesamte Ladung im Volumenelement umfaßt. Der erste Term wird zunächst zu einem Oberflächenintegral (mit dem Gaußschen Theorem) und in Finiter-Differenz-Form zu:

$$\iint \epsilon(\vec{r}) \nabla \phi(\vec{r}) \cdot d\vec{A} = \sum_{j=1}^6 \epsilon_j (\phi_j - \phi_i) h \quad (6)$$

$d\vec{A}$ ist der Normalenvektor, der die Oberfläche des Würfels repräsentiert. ϕ_j sind die elektrostatischen Potentiale der sechs nächsten Nachbarn des jeweiligen Gitterpunkts, ϵ_j der Wert der Dielektrizitätskonstante *in der Mitte* zwischen den Gitterpunkten i und j . Somit wird Gleichung (5) zu:

$$h \sum_{j=1}^6 \epsilon_j (\phi_j - \phi_i) - h^3 \kappa_i^2 \epsilon_s \phi_i + 4\pi q_i = 0 \quad (7)$$

Durch Auflösen nach ϕ_i ergibt sich die LPBE in Finiter-Differenz-Form als (FD-LPBE):

$$\phi_i = \left[\frac{\sum_{j=1}^6 \epsilon_j \phi_j + 4\pi q_i / h}{\sum_{j=1}^6 \epsilon_j + (\kappa_i h)^2 \epsilon_s} \right] \quad (8)$$

Für die Ableitung von (8) siehe auch Klapper *et al.* (1986).

Die Gitterpunkte an der Oberfläche des Systems haben nicht in alle Richtungen Nachbarn. Infolgedessen müssen ihnen feste Grenzbedingungen zugeordnet werden. Damit wird aus der FD-LPBE ein Satz linearer Gleichungen mit einer eindeutigen Lösung für einen Satz gegebener Randbedingungen. Die Genauigkeit der Lösung wird durch die Wahl geringer Gitterpunkt-Abstände (hoher Punktzahlen) und einer großen Distanz zwischen System-Rand und interessierenden Regionen des Proteins verbessert. Dadurch wird allerdings der rechnerische Aufwand erhöht. Derzeit sind ca. 65 – 201 Gitterpunkte pro Seitenlänge des kubischen Systems üblich.

Mittels der *Focusing*-Technik kann die Effizienz von FD-LPBE-Rechnungen verbessert werden. Dafür wird eine Serie von Potentialberechnungen durchgeführt, in

denen das untersuchte Protein einen immer größeren Anteil des Gitters einnimmt. Die Gesamtzahl der Gitterpunkte bleibt dabei erhalten. Als Randbedingungen werden die jeweils vorher erhaltenen Lösungen für das Potential an den neuen Grenzen verwendet.

Die Lösung der FD-LPBE-Gleichungen erfolgt iterativ. Das aus Gleichung (8) resultierende Iterationsschema kann hier dargestellt werden als:

$$\vec{\Phi}^{(m+1)} = \mathbf{T}\vec{\Phi}^m + \vec{Q} \quad (9)$$

$\vec{\Phi}$ ist der zu findende Vektor der Potentiale an allen Gitterpunkten, \vec{Q} ist ein Vektor, \mathbf{T} eine Matrix, die die übrigen Größen aus Gleichung (8) zusammenfassen. m steht für den jeweiligen Iterationsschritt. Die Projektion von Gleichung (8) in den Vektorraum ist nicht-trivial. Für Details siehe Nicholls und Honig (1991).

Gleichung (9) konvergiert für $\lambda_T < 1$, wobei λ_T der Spektralradius ist, d.h. der absolut größte Eigenwert von \mathbf{T} . Die iterative Lösung nähert sich der exakten Lösung dabei exponentiell mit zunehmender Zahl von Iterationsschritten an. Gleichung (9) kann am effizientesten mit der Methode der sukzessiven Überrelaxation (SOR) gelöst werden (andere Möglichkeiten sind Gauß-Seidel- oder Jacobi-Relaxation, siehe Nicholls und Honig, 1991; Hadjidimos, 2000). Hierfür wird ein sogenannter Überrelaxationsparameter ω in die Gleichungen eingeführt:

$$\vec{\Phi}^{(m+1)} = \omega\mathbf{T}\vec{\Phi}^m + \omega\vec{Q} + (1 - \omega)\vec{\Phi}^m \quad (10)$$

Für $\omega > 1$ konvergiert (10) schneller als die anderen zwei Relaxationsmethoden, wobei bei geeigneter Wahl von ω für Gitter von ca. 100^3 Punkten eine Beschleunigung um den Faktor 100 erreicht werden kann. Der optimale Relaxationsparameter ist dabei gegeben durch:

$$\omega_{opt} = \frac{2}{1 + \sqrt{1 - \lambda_T}} \quad (11)$$

Eine ausführliche Behandlung der Methoden zur iterativen Lösung von (9) erfolgt in Nicholls und Honig (1991).

3.1.3 Berechnung von Titrationskurven in Proteinen

Eingebettet in die Umgebung eines Proteins, unterscheidet sich der pK_a -Wert der Seitenkette einer ionisierbaren Aminosäure von dem, den sie als Modellverbindung in freier wässriger Lösung hat. Dabei spielen die Auswirkungen der geringeren Dielektrizitätskonstante des Proteins, von partiellen Ladungen und Wechselwirkungen mit den Ladungen anderer titrierbarer Gruppen eine Rolle. Als Born-Haber-Kreisprozeß können die entsprechenden Protonierungsgleichgewichte wie in Abb. 8 dargestellt werden. Aus diesem Zyklus geht hervor, daß die gesuchte Freie Energie, die mit der Deprotonierung der titrierbaren Gruppe im Protein verbunden ist, aus den jeweiligen Freien Energien des Transfers der protonierten und deprotonierten Form der Modellverbindung von der Lösung in das Protein und dem Protonierungsgleichgewicht in freier Lösung berechnet werden kann (Ullmann und Knapp, 1999; Yang *et al.*, 1993).

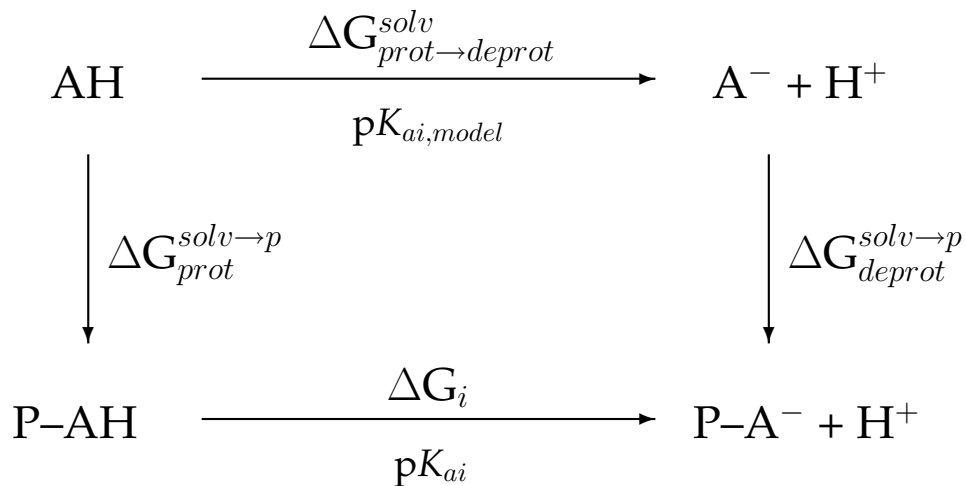


Abbildung 8: Born-Haber-Kreisprozeß zur Berechnung der pK_a -Werte von ionisierbaren Gruppen in Proteinen. P steht für das Protein bzw. die Proteinumgebung, *solv* für die Umgebung der gelösten Modell-Aminosäure; A-H ist die titrierbare Aminosäure.

Damit kann die gesuchte Freie Energie ΔG_i formuliert werden als:

$$\Delta G_i = \Delta G_{prot \rightarrow deprot}^{solv} + \Delta G_{deprot}^{solv \rightarrow p} - \Delta G_{prot}^{solv \rightarrow p} \quad (12)$$

$\Delta G_{prot \rightarrow deprot}^{solv}$ wird durch den pK_a -Wert der Modellverbindung ausgedrückt. Die Differenz der Transferenergien $\Delta G_{deprot}^{solv \rightarrow p} - \Delta G_{prot}^{solv \rightarrow p}$ wird als Summe dreier elektrostatischer Beiträge $\Delta G_{i,sol} + \Delta G_{i,pc} + \Delta G_{i,titr}$ geschrieben. Infolgedessen ist die Freie Energie der Deprotonierung der i -ten titrierbaren Gruppe des Proteins:

$$\Delta G_i = RT \ln 10 (pK_{ai,model} - pH) + \Delta G_{i,sol} + \Delta G_{i,pc} + \Delta G_{i,titr} \quad (13)$$

Der Beitrag der Desolvatationsenergie $\Delta G_{i,sol}$ beruht auf der Differenz der Reaktionsfeldenergie von elektrischen Ladungen in Medien unterschiedlicher Dielektrizitätskonstante, da Ladungen in polaren Medien stärker stabilisiert werden. $\Delta G_{i,sol}$ wird folgendermaßen berechnet:

$$\Delta G_{i,sol} = \frac{1}{2} \sum_{k \in \{i\}} \left[(\phi^p(\rho_{i,d}, k) - \phi^s(\rho_{i,d}, k)) q_{i,d}(k) - (\phi^p(\rho_{i,p}, k) - \phi^s(\rho_{i,p}, k)) q_{i,p}(k) \right] \quad (14)$$

Die Summe geht über alle Atome k der titrierbaren Gruppe i mit den partiellen Ladungen $q_{i,d}(k)$ und $q_{i,p}(k)$, entsprechend dem deprotonierten und protonierten Zustand der Gruppe mit den Ladungsverteilungen $\rho_{i,d}$ und $\rho_{i,p}$. $\phi(\rho, k)$ ist das elektrostatische Potential an den Positionen der Atome k , das durch die Ladungsverteilung erzeugt wird. Die oberen Indizes s und p stehen für die Solvens- bzw. Proteinumgebung. $\Delta G_{i,sol}$ wird auch Born-Energie genannt.

Die Freie Energie der Wechselwirkung der titrierbaren Gruppe mit den permanenten Partialladungen des Proteins (z.B. dem Peptid-Backbone) kann über die folgende Summe erhalten werden:

$$\Delta G_{i,pc} = \sum_{k \in \{pc\}} (\phi^p(\rho_{i,d}, k) - \phi^p(\rho_{i,p}, k)) q_{pc}(k) \quad (15)$$

k steht hier für alle Atome mit nicht-titrierbaren permanenten Partialladungen $q_{pc}(k)$. Die benötigten Potentiale werden über die SOR-Lösung (10) der FD-LPBE (8) erhalten.

Die Verschiebung des pK_a -Wertes durch die Desolvatationsenergie und die Wechselwirkung mit den permanenten Proteinladungen alleine führt zur Definition des intrinsischen pK_a -Wertes einer titrierbaren Gruppe. Er ist pH-unabhängig.

$$pK_{ai,int} = pK_{ai,model} + (RT \ln 10)^{-1} (\Delta G_{i,sol} + \Delta G_{i,pc}) \quad (16)$$

Der intrinsische pK_a ist derjenige pK_a -Wert, den die betreffende Gruppe hat, wenn alle anderen ionisierbaren Aminosäuren im Protein in ihrem elektrisch neutralen Zustand sind, was selbstverständlich einem völlig hypothetischen Zustand entspricht.

Der Term $\Delta G_{i,titr}$ in Gleichung (13) beschreibt die Wechselwirkung zwischen einzelnen titrierbaren Gruppen. Diese Energie hängt vom Protonierungszustand aller titrierbaren Gruppen – und damit vom pH-Wert – ab. Die paarweise Wechselwirkungsenergie zwischen Gruppe i und j in den Zuständen x_i und x_j kann definiert werden als

$$W_{ix_i,jx_j} = \sum_{k \in \{i\}} \phi(\rho_{jx_j}, k) q_{ix_i}(k) \quad (17)$$

für $i \neq j$ (die Zustände x_i und x_j können entweder protoniert oder unprotoniert sein).

Da ein Protein normalerweise eine Vielzahl titrierbarer Aminosäuren enthält, ist die korrekte Lösung für die pK_a -Werte aller Gruppen nur über die Anwendung von statistischer Thermodynamik erhältlich. N titrierbare Gruppen führen dabei zu 2^N Protonierungszuständen. Der Gesamtprotonierungszustand des Proteins wird mit dem Vektor $\vec{x} = (x_1, x_2, \dots, x_N)$ beschrieben. x_i ist dabei entweder 0 oder 1, je nachdem, ob die Gruppe protoniert oder deprotoniert ist. Die Freie Energie eines bestimmten Protonierungszustandes kann ausgedrückt werden als:

$$\Delta G(\vec{x}, \text{pH}) = RT \ln 10 \sum_i x_i (pK_{i,int} - \text{pH}) + \frac{1}{2} \sum_i \sum_{j \neq i} W_{ix_i,jx_j} \quad (18)$$

Der Protonierungsgrad Θ_i einer betrachteten Gruppe in Abhängigkeit vom pH, gleichbedeutend mit ihrer Titrationskurve, ist durch den statistischen Mittelwert von x_i gemäß der Boltzmann-Verteilung gegeben (Bashford und Karplus, 1990):

$$\Theta_i(\text{pH}) = \langle x_i \rangle = \frac{\sum_{n=1}^{2^N} x_i \cdot \exp[-\Delta G(\vec{x}, \text{pH})/RT]}{\sum_{n=1}^{2^N} \exp[-\Delta G(\vec{x}, \text{pH})/RT]} \quad (19)$$

In der Praxis kann Gleichung (19) häufig nicht über exakte statistische Mittelung ausgewertet werden, da die erforderliche Rechenzeit exponentiell mit der Anzahl der titrierbaren Gruppen anwächst. Für mehr als ca. 30 Gruppen werden deshalb Näherungsverfahren angewendet. Gruppen mit einem intrinsischen $\text{p}K_a$, der sehr weit von dem interessierenden pH-Bereich entfernt ist, können mit hoher Wahrscheinlichkeit als entweder geladen oder nicht geladen angenommen und somit aus der statistischen Summe entfernt werden.

Wenn keine stark wechselwirkenden Gruppen vorhanden sind, ist es möglich, das iterative Tanford-Roxby-Schema zu verwenden (Tanford und Roxby, 1972). Darin wird angenommen, daß der $\text{p}K_a$ -Wert einer bestimmten Gruppe durch Wechselwirkung mit der mittleren Ladung auf allen anderen titrierbaren Gruppen vom intrinsischen $\text{p}K_a$ verschoben wird.

$$\text{p}K_{ai} = \text{p}K_{ai,int} + \Delta\text{p}K_{ai,titr} \quad (20)$$

Für einen gegebenen pH-Wert ist der mittlere Protonierungsgrad einer Gruppe i , deren $\text{p}K_a$ -Wert dem intrinsischen $\text{p}K_a$ entspricht, gegeben durch:

$$\frac{\Theta_i}{1 - \Theta_i} = \text{p}K_{ai,int} - \text{pH} \quad (21)$$

Die Ladung auf i ist damit $q_i(\text{pH}) = q_{i,0} + \Theta_i$ ($q_{i,0}$ ist die Ladung von i im unprotonierten Zustand, d.h. $q_{i,0} = 0$ für Basen und $q_{i,0} = -1$ für saure Gruppen). Somit wird der Korrekturterm $\Delta\text{p}K_{ai,titr}$ zu:

$$\Delta\text{p}K_{ai,titr} = -\frac{1}{RT} \sum_{j \neq i}^N q_j(\text{pH}) \phi_i(\vec{r}_j) \quad (22)$$

$\phi_i(\vec{r}_j)$ ist das Potential, das durch die Ladung auf i am Ort der Gruppe j erzeugt wird.

Der erste Iterationsschritt ist dadurch gekennzeichnet, daß der mittlere Protonierungsgrad dem intrinsischen pK_a und dem pH-Wert der Lösung entsprechend berechnet wird. Für jeden weiteren Iterationsschritt m gilt:

$$pK_{ai}^m = \frac{1}{2}(pK_{ai,int} + \Delta pK_{ai,titr} + pK_{ai}^{m-1}) \quad (23)$$

Im allgemeinen reichen ca. fünf Zyklen aus, um selbstkonsistente Lösungen zu erhalten.

Für stark wechselwirkende Gruppen bzw. als Alternative zur vollen statistischen Mittelwertbildung wird oft ein Monte-Carlo-Sampling der Protonierungszustände des Proteins durchgeführt (Beroza *et al.*, 1991). Hierbei kommt der Metropolis-Algorithmus zum Einsatz (Metropolis *et al.*, 1953). Ausgehend von einem bestimmten Gesamtprotonierungszustand des Proteins (meist mit der Tanford-Roxby-Methode berechnet) wird der Zustand einer zufällig gewählten Gruppe verändert. Der neue Gesamtzustand wird – nach einer bestimmten Anzahl von Äquilibrierungsschritten – in die statistische Summe aufgenommen, wenn seine Freie Energie geringer ist als die des vorangehenden Schrittes. Ist die Energie höher, so wird der Zustand nur mit einer geringeren Wahrscheinlichkeit, die seiner Boltzmannverteilung relativ zum vorhergehenden Zustand entspricht, gezählt.

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Berechnungen von Titrationskurven an Omp32 wurde eine Rechenprozedur verwendet, in der zunächst die Tanford-Roxby-Methode auf das gesamte Protein angewendet wurde. Im Falle stark wechselwirkender Gruppen konvergiert die Tanford-Roxby-Iteration nicht, also können diese Gruppen leicht identifiziert werden. Die Titrationskurven dieser Gruppen wurden mit Monte-Carlo-Sampling und der statistischen Mittelwertbildung erhalten (Karshikoff, 1995).

Der pK_a einer bestimmten Gruppe kann aus der Titrationskurve erhalten werden, sofern sie die reguläre sigmoide Henderson-Hasselbalch-Form einhält. Dabei entspricht der pK_a -Wert demjenigen pH-Wert, bei der die Gruppe zu 50 % protoniert ist. Für stark gekoppelte Gruppen ergeben sich oft signifikante Abweichungen der Titrationsgleichgewichte vom Henderson-Hasselbalch-Gesetz. In solchen

Fällen kann die Definition eines eindeutigen pK_a -Wertes nicht erfolgen, und die gesamte Titrationskurve muß in Betracht gezogen werden (siehe Bashford und Karplus, 1990).

3.2 Dreidimensionale Poisson-Nernst-Planck-Theorie der Elektrodiffusion (3D-PNP)

Neben den direkten Methoden (Moleküldynamiksimulation und Brownian-Dynamics-Simulation) spielt die weniger rechenaufwendige Methode PNP eine Rolle in der Berechnung der Elektrodiffusion von Ionen durch Ionenkanäle. Es handelt sich hierbei, wie bei den Poisson-Boltzmann-Rechnungen, um einen Kontinuum-Ansatz (siehe Abschnitt 3.1.1). Das Protein und die Membran werden als starr betrachtet, und die verschiedenen Teile des Systems durch ihre makroskopischen Dielektrizitätskonstanten beschrieben. Im Vergleich zur Poisson-Boltzmann-Methode kommen hier noch ortsabhängige Ionenkonzentrationen hinzu, und der Fluß der Ionen wird berechnet. Desweiteren kann ein Spannungsgradient, also ein elektrisches Feld, an die Membran angelegt werden. Kurnikova *et al.* (1999) führten erstmals einen dreidimensionalen Poisson-Nernst-Planck-Algorithmus zur Berechnung des Ionenstroms in unregelmäßig geformten Proteinkanälen ein.

Die zeitliche Entwicklung durch Diffusion bzw. Elektrodiffusion veränderlicher Ionenkonzentrationen wird durch die Smoluchowski-Gleichung beschrieben:

$$\frac{\partial c(\vec{r}, t)}{\partial t} = -\nabla j(\vec{r}, t) \quad (24)$$

Der Fluß der Teilchen, $j(\vec{r}, t)$, ist dabei gegeben durch:

$$\vec{j}(\vec{r}, t) = -D(\vec{r})(\nabla c(\vec{r}, t) + (kT)^{-1}c(\vec{r}, t)\nabla U(\vec{r})) \quad (25)$$

$U(\vec{r})$ repräsentiert die potentielle Energie eines Teilchens am Ort \vec{r} , d.h. $\nabla U(\vec{r})$ ist die externe Kraft, die auf das Ion durch das elektrische Feld ausgeübt wird. Der Ionenfluß wird hier durch die Summe zweier Terme bestimmt, die für den jeweiligen Beitrag der Diffusion und der Drift durch den Potentialgradienten stehen.

Nach einer kurzen Zeitspanne, die zur Einstellung von Gleichgewichtsbedingungen notwendig ist, wird ein Zustand stabiler Konzentrationen erzielt, d.h. für alle Orte gilt $\partial c(\vec{r}, t)/\partial t = 0$. Dadurch wird der Ionenfluß zeitunabhängig ($\nabla j(\vec{r}, t) = 0$). Somit ergibt sich folgende Differentialgleichung:

$$\nabla(\nabla c(\vec{r}) + (kT)^{-1}\nabla U(\vec{r})c(\vec{r})) = 0 \quad (26)$$

Gleichung (26) hat eine eindeutige Lösung für $c(\vec{r})$, wenn geeignete Randbedingungen vorgegeben werden. Verwendet man diese Lösung, können Werte für den Ionenfluß an allen Orten des Systems erhalten werden. Multipliziert man die Werte des Ionenflusses $\vec{j}(\vec{r})$ mit $z_i e$ und integriert über die Querschnittsflächen der Kanäle, so ergibt sich der elektrische Strom I . Die zeitunabhängige Smoluchowski-Gleichung (26) wird oft auch als Nernst-Planck-Gleichung bezeichnet.

Das Problem der Ionendiffusion durch biologische Kanäle wird dadurch komplizierter, daß die langreichweitige elektrostatische Wechselwirkung mit anderen geladenen Spezies eingeschlossen werden muß. Zudem sind normalerweise mehr als eine Ionensorte im System vorhanden. Da die PNP-Methode eine *Mean-Field*-Näherung ist, wird die Korrelation zwischen der Bewegung einzelner Teilchen nicht berücksichtigt. So kann die potentielle Energie für die Ionensorte i ausgedrückt werden als:

$$U_i(\vec{r}) = U_i^{el}(\vec{r}) + U_i^{rest}(\vec{r}) \quad (27)$$

$U_i^{rest}(\vec{r})$ ist eine potentielle Energie, die nicht-elektrostatische Wechselwirkungen mit dem Ionenkanal und der Membranoberfläche beschreibt. In allen bisherigen Implementierungen der PNP-Theorie wurde $U_i^{rest}(\vec{r})$ als identisch für alle Ionensorten betrachtet. $U_i^{el}(\vec{r}) = z_i e \phi(\vec{r})$ resultiert aus dem elektrostatischen Potential $\phi(\vec{r})$. $\phi(\vec{r})$ hängt dabei von der Ladungsverteilung im System, vom Profil der Dielektrizitätskonstante ϵ und den gewählten Grenzbedingungen ab. Diese Grenzbedingungen können so gewählt werden, daß sie eine externe Spannung darstellen, die an das System (die Membran) angelegt wird.

Für die vorliegende Arbeit wurde die potentielle Energie für Ionen vom Typ i am Ort \vec{r} erweitert, indem ein zusätzlicher Term aufgenommen wurde, der die

ionische Solvatationsenergie repräsentiert:

$$U_i(\vec{r}) = U_i^{el}(\vec{r}) + U_i^{rest}(\vec{r}) + U_i^{sol}(\vec{r}) \quad (28)$$

Um die endliche Ausdehnung der Ionen widerzuspiegeln, wurde $U_i^{rest}(\vec{r})$ als *Hard-Core-Potential* modelliert. Es stellt somit eine Näherung zur van-der-Waals-Wechselwirkung dar. Ein Potential dieser Art ist hier zum ersten Mal in den PNP-Algorithmus aufgenommen worden.

Der Wert von $\phi(\vec{r})$ wird bestimmt, indem man die Poisson-Gleichung für alle Ladungen im System löst. Die Dichte der Ladungen beweglicher Ionen hängt dabei von der Lösung der zeitunabhängigen Smoluchowski-Gleichung (26) ab, welche im Gegenzug abhängig ist von der Lösung für das elektrostatische Potential. Aus diesem Grund muß der Satz von Gleichungen ebenfalls iterativ gelöst werden. Die zeitunabhängige Smoluchowski-Gleichung (26) kann, ähnlich wie die Poisson-Boltzmann-Gleichung, mit dem Modell der finiten Differenzen und SOR (siehe Abschnitt 3.1.2) numerisch gelöst werden. Für Details zum Algorithmus siehe Koumanov *et al.* (2003), Cardenas *et al.* (2000) und Kurnikova *et al.* (1999).

3.3 Moleküldynamik-Simulationen

3.3.1 Lösung der Bewegungsgleichungen

Das Grundprinzip von Moleküldynamik-Simulationen (MD-Simulationen) ist relativ einfach: Die Newtonschen Bewegungsgleichungen werden für ein System mit N wechselwirkenden Teilchen gelöst. Die Integration der Gleichungen liefert aufeinanderfolgende Konfigurationen des Systems, d.h. eine Trajektorie der Teilchenpositionen und -impulse über eine gewisse Zeitspanne.

Das zweite Newtonsche Gesetz lautet:

$$m_i \frac{\partial^2 \vec{r}_i}{\partial t^2} = \vec{F}_i, \quad i = 1, \dots, N \quad (29)$$

m_i ist die Masse des Teilchens i , r_i der Teilchenort. Die Kräfte \vec{F}_i sind die negativen Ableitungen einer empirischen Potentialfunktion $V(\vec{r}_1, \dots, \vec{r}_N)$. Diese wird auch als Kraftfeld bezeichnet (siehe Abschnitt 3.3.2).

$$\vec{F}_i = -\frac{\partial V}{\partial \vec{r}_i} \quad (30)$$

Die Lösung von Gleichung (29) erfolgt wieder mittels eines Finite-Differenz-Ansatzes. Die zentrale Idee ist die Festlegung eines endlichen Integrationszeitschrittes Δt . Der Kraftvektor wird während Δt als konstant angenommen. Die zeitliche Entwicklung der Teilchenpositionen (und -geschwindigkeiten) wird mit einer Reihenentwicklung approximiert.

$$\vec{r}_i(t + \Delta t) = \vec{r}_i(t) + \Delta t \vec{v}_i(t) + \frac{1}{2} \Delta t^2 \vec{a}_i(t) + \dots \quad (31)$$

$\vec{v}_i(t)$ sind die Partikelgeschwindigkeiten $\partial \vec{r}_i / \partial t$; $\vec{a}_i(t)$ die Partikelbeschleunigungen $\partial^2 \vec{r}_i / \partial t^2$. Der Verlet-Algorithmus verwendet außerdem die Teilchenpositionen des vorhergehenden Schrittes (Verlet, 1967):

$$\vec{r}_i(t - \Delta t) = \vec{r}_i(t) - \Delta t \vec{v}_i(t) + \frac{1}{2} \Delta t^2 \vec{a}_i(t) - \dots \quad (32)$$

Gleichungen (31) und (32) werden addiert und ergeben so bis zum *kubischen* Term:

$$\vec{r}_i(t + \Delta t) = 2\vec{r}_i(t) - \vec{r}_i(t - \Delta t) + \Delta t^2 \vec{a}_i(t) \quad (33)$$

Der Verlet-Algorithmus leidet unter einem gewissen Grad an Ungenauigkeit und dem Fehlen eines Geschwindigkeits-Terms. In dieser Arbeit wurde für alle Moleküldynamik-Simulationen eine Abwandlung des Verlet-Algorithmus verwendet, der *Leap-Frog-Algorithmus* (Hockney, 1970). Er ist exakter und erlaubt die direkte Berechnung der Partikelgeschwindigkeiten, basierend auf den folgenden zwei Gleichungen:

$$\vec{r}_i(t + \Delta t) = \vec{r}_i(t) - \Delta t \vec{v}_i(t + \frac{1}{2} \Delta t) \quad (34)$$

$$\vec{v}_i(t + \frac{1}{2} \Delta t) = \vec{v}_i(t - \frac{1}{2} \Delta t) + \Delta t \vec{a}_i(t) \quad (35)$$

Zuerst werden die Geschwindigkeiten zur Zeit $t + \frac{1}{2} \Delta t$ berechnet, aus ihnen werden dann die neuen Positionen bestimmt.

Soll die Wechselwirkung eines Moleküls mit den Lösungsmittelmolekülen seiner Umgebung implizit einbezogen werden, verwendet man Langevin-Dynamik. In den Langevinschen Bewegungsgleichungen findet sich zusätzlich ein Term, der die Reibung mit dem Lösungsmittel beschreibt und eine stochastische Kraft \vec{F}_S , die für zufällige Stöße mit den Lösungsmittelpartikeln steht.

$$m_i \frac{\partial^2 \vec{r}_i}{\partial t^2} = \vec{F}_i - \gamma \frac{\partial \vec{r}_i}{\partial t} m_i + \vec{F}_S \quad (36)$$

γ ist der Reibungskoeffizient. Für weitere Details zu MD-Algorithmen siehe Leach (2001).

Da die Integrationszeit Δt sehr klein gewählt werden muß, wenn man die hochfrequenten Streckschwingungen von Wasserstoffatomen, die an Schweratome gebunden sind, berücksichtigt, werden diese Bindungslängen oft mit dem SHAKE-Algorithmus (Ryckaert *et al.*, 1977) konstant gehalten. Man geht davon aus, daß die Vernachlässigung dieser Freiheitsgrade das Verhalten des Gesamtsystems nicht wesentlich beeinflusst. Das Festhalten der Bindungslängen auf bestimmte Werte wird über holonome Einschränkungen und Lagrange-Multiplikatoren in die Bewegungsgleichungen eingeführt, die dann unter diesen Bedingungen gelöst werden.

Die Wahl eines korrekten Ensembles ist ein fundamentales Konzept der statistischen Thermodynamik. Um die Systemtemperatur konstant zu halten, wird sehr häufig Berendsen-Temperaturkopplung eingesetzt (Berendsen *et al.*, 1984). Die Teilchengeschwindigkeiten werden bei jedem Schritt mit dem Faktor λ skaliert, für den gilt (van der Spoel *et al.*, 2002):

$$\lambda = \sqrt{1 + \frac{t}{\tau_T} \left[\frac{T_0}{T(t - \frac{\Delta t}{2})} - 1 \right]} \quad (37)$$

T_0 ist die gewünschte, T die aktuelle Temperatur zum Zeitpunkt t ; τ_T ist mit der Zeitkonstante der Temperaturkopplung verbunden, beschreibt also die Abklingzeit einer Temperaturabweichung von T_0 .

Als Alternative zum Algorithmus nach Berendsen kann Nosé-Hoover-Temperaturkopplung verwendet werden (Nosé und Klein, 1983; Hoover, 1985).

Dabei wird ein korrektes kanonisches N,V,T -Ensemble simuliert, anstatt die Partikelgeschwindigkeiten zu skalieren. Die Newtonschen Bewegungsgleichungen werden um ein thermisches Reservoir und einen Reibungsterm erweitert. Die Reibungskraft ist dabei proportional zum Produkt aus der Teilchengeschwindigkeit und dem Reibungsparameter ζ .

$$\frac{\partial^2 \vec{r}_i}{\partial t^2} = \frac{\vec{F}_i}{m_i} - \zeta \frac{\partial \vec{r}_i}{\partial t} \quad (38)$$

ζ ist eine dynamische Größe und besitzt eine eigene Bewegungsgleichung; ihre zeitliche Ableitung wird aus der Differenz der aktuellen und der Referenztemperatur berechnet:

$$\frac{d\zeta}{dt} = \frac{1}{Q}(T - T_0) \quad (39)$$

Die Kopplungsstärke wird durch die Konstante Q bestimmt, die auch "Massenparameter" genannt wird (bezogen auf die Masse des Temperaturreervoirs).

3.3.2 Das Kraftfeld

Zur Berechnung der Teilchenbeschleunigungen muß die Kraft, die auf das Partikel i wirkt, bekannt sein. Diese Kraft wird aus einer empirischen Potentialfunktion für das gesamte System berechnet (van Gunsteren und Berendsen, 1990). Dabei werden harmonische Potentiale für Schwingungen um Bindungslängen und -winkel chemischer Bindungen verwendet. Torsionsterme für Rotationen um Diederwinkel werden für Atome, die über drei chemische Bindungen miteinander verknüpft sind, als Cosinus-Reihenentwicklung formuliert. Harmonische *Improper*-Torsionsterme sorgen für die Einhaltung planarer Geometrien oder der korrekten Stereochemie an chiralen Zentren (Gl. 40). Die Kraftkonstanten, Bindungslängen und Bindungs- bzw. Diederwinkel der harmonischen oder torsionellen Potentiale entstammen heute hauptsächlich quantenchemischen Rechnungen an Modellverbindungen.

$$\begin{aligned}
 V(\vec{r}_1, \dots, \vec{r}_N) = & \sum_{\text{Bind.}} \frac{1}{2} k_b (b - b_0)^2 + \sum_{\text{Wink.}} \frac{1}{2} k_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{\text{Tors.}} k_\phi [1 + \cos(n\phi - \delta)] \\
 & + \sum_{\text{Impr.}} \frac{1}{2} k_\zeta (\zeta - \zeta_0)^2 + \sum_{i,j} \left[\frac{C_{12}(i,j)}{r_{ij}^{12}} - \frac{C_6(i,j)}{r_{ij}^6} \right] + \sum_{i,j} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 \epsilon_r r_{ij}}
 \end{aligned} \tag{40}$$

Neben diesen Potentialen gibt es nichtbindende Wechselwirkungen zwischen den Atomen. Die van-der-Waals-Wechselwirkung wird hier als jeweils Paar-additives Lennard-Jones-Potential geschrieben (Term 5 in Gl. 40). Besondere Aufmerksamkeit erfordert die Berechnung der elektrostatischen Wechselwirkungen, da die betreffenden Energien hoch sind und die Bewegung der Teilchen maßgeblich beeinflussen. Für kurzreichweitige Wechselwirkungen wird im allgemeinen ein Coulombpotential zwischen jeweils zwei Teilchen verwendet (Term 6, Gl. 40). Die Partialladungen der Atome werden ebenfalls meist quantenchemisch bestimmt. Da die Berechnung der Paarwechselwirkungen aufwendig ist und mit der Teilchenzahl im Quadrat ansteigt, wird die Bestimmung der van-der-Waals- und der Coulombpotentiale oft ab einer bestimmten Teilchendistanz abgebrochen (*“Cutoff Distance”*). Um den Übergang an der Grenze vom Bereich berechneter Potentiale zum Gebiet des Nullpotentials zu glätten, werden *Shift*- oder *Switch*-Funktionen verwendet. *Shift*-Funktionen verschieben das Potential vertikal, so daß an der Abbruchgrenze der Wert Null erzielt wird. *Switch*-Funktionen führen das Potential in einem definierten Volumenbereich vor Erreichen der Grenze kontinuierlich auf Null zurück, ohne den Wert des Potentials davor zu beeinflussen.

Um Artefakte durch Vernachlässigung der langreichweitigen Ladungswechselwirkung bei Verwendung eines *Cutoffs* zu vermeiden, kann diese mit einer Ewald-Summe modelliert werden (Ewald, 1921). Dafür muß das System periodisch vorliegen, d.h. als sich unendlich in alle Raumrichtungen fortsetzender *“Kristall”*. Die Ladungsverteilung im System ist dann ein unendlicher Satz von Punktladungen, d.h. von Deltafunktionen.

$$\rho_i(\vec{r}) = q_i \delta(\vec{r} - \vec{r}_i) \tag{41}$$

Für die Ewald-Summe wird davon ausgegangen, daß diese Punktladungen jeweils von einer isotropen Gaußschen Ladungsverteilung gleicher Größe und umgekehr-

ten Vorzeichens umgeben sind, die die Wechselwirkung zwischen den Punktladungen abschirmt:

$$\rho_i^G(\vec{r}) = -q_i \left(\frac{\alpha}{\sqrt{\pi}} \right)^3 \exp(-\alpha^2 |\vec{r} - \vec{r}_i|^2) \quad (42)$$

α ist die Breite der Gauß-Verteilung. Die Wechselwirkung zwischen den abgeschirmten Ladungen ist dann formulierbar als:

$$E^S = \frac{1}{2} \sum_{\vec{n}=0}^{\infty} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 |\vec{r}_{ij} + \vec{n}|} \operatorname{erfc}(\alpha |\vec{r}_{ij} + \vec{n}|) \quad (43)$$

\vec{n} ist der kubische Gitterpunkt mit den Koordinaten $(n_x L, n_y L, n_z L)$, (n_x, n_y, n_z) sind ganze Zahlen, L die Kantenlänge).

$\operatorname{erfc}(x)$ ist die komplementäre Fehlerfunktion $\operatorname{erfc}(x) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_x^{\infty} \exp(-a^2) da$. Sie fällt mit der Entfernung schnell ab und somit konvergiert die Gittersumme besser als eine Summe von Coulombwechselwirkungen zwischen Punktladungen. Die rein Gaußsche Ladungsverteilung muß wieder abgezogen werden, um die elektrische Neutralität zu erhalten. Die Wechselwirkung zwischen diesen zwei Gauß-Verteilungen wird als Gittersumme im reziproken Raum abzüglich einer Selbstkorrektur berechnet:

$$E^G = \frac{1}{2\epsilon_0} L^{-3} \sum_{\vec{k} \neq \vec{0}}^{\infty} k^{-2} \exp \left[\frac{-k^2}{4\alpha^2} \left| \sum_{j=1}^N q_j \exp(-i\vec{k} \cdot \vec{r}_j) \right|^2 \right] - \frac{1}{4\pi^{3/2}\epsilon_0} \alpha \sum_{j=1}^N q_j^2 \quad (44)$$

\vec{k} sind dabei die reziproken Gittervektoren $\vec{k} = 2\pi\vec{n}/L^2$. Aufgrund der exponentiellen Faktoren kann diese unendliche Gittersumme gut durch eine endliche angenähert werden.

Da sich die beiden Ladungsverteilungen im realen Raum neutralisieren, reduziert sich das Problem auf eine Summation von Fehlerfunktionen im reziproken Raum. In der *Particle-Mesh-Ewald-Methode* (PME) (Essmann *et al.*, 1995) werden die Ladungen über eine *Spline*-Interpolation auf ein Gitter im Realraum übertragen. Dieses Gitter wird mit einer dreidimensionalen *Fast-Fourier-Transformation* (FFT) in den reziproken Raum transformiert, wo die Summation stattfindet.

Neben den Moleküldynamik-Simulationen spielt die Energieminimierung des Systems eine Rolle, besonders in der Vorbereitung der Simulationsläufe. Dafür wird die Konfiguration aller Atome systematisch geändert, um den Wert der gesamten potentiellen Energie zu verringern.

Im *Steepest-Descent*-Algorithmus wird der $3N$ -dimensionale Vektor aller Teilchenpositionen im System abschnittsweise entlang der Richtung des maximalen Abfalls der Potentialfunktion verschoben. Dieser Algorithmus ist besonders für die Anfangsphase einer Energieminimierung geeignet, wenn die Struktur sich noch weit von einem lokalen Energieminimum entfernt befindet. Für striktere Geometrieverfeinerungen wird z.B. die Newton-Raphson-Methode oder ihre Abwandlungen verwendet. Darin geht auch die Matrix der zweiten Ableitungen, also die Krümmung der Energiefunktion ein.

3.3.3 Berechnung der Freien Energie über *Umbrella Sampling* sowie Kraftspektroskopie-Simulationen

Das *Potential of Mean Force* (PMF) W eines Teilchens an einer Stelle im System entspricht der reversiblen thermodynamischen Arbeit, die nötig ist, das Teilchen auf adiabatische Weise aus dem Vakuum an diesen Ort zu bringen. Sein Gradient ist die negative *mittlere* Kraft, die auf dieses Teilchen von allen anderen Partikeln im System ausgeübt wird.

$$\langle \vec{F} \rangle = -\nabla W \quad (45)$$

Das PMF stellt eine Freie Energie dar. Im kanonischen Ensemble (konstante Teilchenzahl N , konstantes Volumen V , konstante Temperatur T) entspricht das PMF der Helmholtzschen Freien Energie A .

Ein Spezialfall existiert dann, wenn die interessierende Änderung im System als Bewegung auf einer Reaktionskoordinate betrachtet werden kann (Beveridge und DiCapua, 1989). Der statistisch-thermodynamische Ausdruck für die Freie Energie,

$$A = -kT \ln Z \quad (46)$$

(wobei Z die Zustandssumme des Systems ist), kann in diesem Fall mit der Verteilungsfunktion $g(r)$ auf der Reaktionskoordinate formuliert werden:

$$A(r) = -kT \ln[g(r)] + C \quad (47)$$

C steht für eine Konstante, die mit der Teilchenzahl des Systems korreliert. In der Simulation wird $g(r)$ als Verhältnis der Wahrscheinlichkeit, die Koordinate r zu finden, zur Größe des Volumenelements, das mit der Reaktionskoordinate zusammenhängt, berechnet.

$$g(r) = p(r)/V(r) \quad (48)$$

Ist r eine interatomare Distanz, so ist z.B. $V(r) = 4\pi r^2$. Da die Verteilungsfunktion exponentiell mit der Energie des betreffenden Zustands auf der Koordinate r abnimmt, gehen Zustände hoher Energie nicht stark in $g(r)$ ein, d.h. der Konfigurationsraum wird um Energiebarrieren herum nicht ausreichend abgedeckt.

Torrie und Valleau (1977) führten erstmals ein Wichtungspotential B ein, das die Potentialfunktion erweitert und besonders Zustände hoher Energie stabilisiert. B nimmt normalerweise die Form eines harmonischen Potentials an und wird auch *Umbrella-Potential* genannt.

$$V'(\vec{r}^N) = V(\vec{r}^N) + B(\vec{r}^N) \quad (49)$$

$$B(\vec{r}^N) = k_W(\vec{r}^N - \vec{r}_0^N)^2 \quad (50)$$

k_W ist eine effektive Kraftkonstante, die Bewegungen von \vec{r}_0^N fort behindert. Die aus Simulationen unter Verwendung eines Wichtungspotentials hervorgehende Verteilung entspricht nicht mehr der Boltzmann-Verteilung. Sie ist ihr gegenüber verbreitert, deshalb wird diese Technik auch als *Umbrella Sampling* bezeichnet (da sie die Verteilung wie einen Schirm aufspannt). Der Wert, den jede Größe im System bei einer Boltzmann-Verteilung der Zustände hätte, kann jedoch aus der gewichteten Simulation über

$$\langle A \rangle = \frac{\langle A(\vec{r}^N) \exp[\frac{B(\vec{r}^N)}{kT}] \rangle_B}{\langle \exp[\frac{B(\vec{r}^N)}{kT}] \rangle_B} \quad (51)$$

berechnet werden (Kottalam und Case, 1988). Der Index B weist darauf hin, daß der Mittelwert aus einer Verteilung unter Verwendung des Wichtungspotentials erhalten wurde.

Führt man eine Reihe von Simulationen durch, bei dem das *Umbrella*-Potential um je einen Abschnitt auf der Reaktionskoordinate verschoben wird, so kann durch Zusammenfügen der PMF-Teile ein Profil der Freien Energie für den gesamten Reaktionsweg erhalten werden.

In Kraftspektroskopiesimulationen wird ein Teilchen oder ein Molekül von einer virtuellen Spitze, die über ein harmonisches Federpotential mit diesem verbunden ist, mit konstanter Geschwindigkeit in eine Richtung gezogen. Damit wird das Prinzip der AFM-Kraftspektroskopie am Computer nachvollzogen. Die Kräfte, die z.B. mit der Bindung eines Moleküls an ein Protein verbunden sind, werden aus der Dehnung bzw. Stauchung der Zugfeder berechnet. (Grubmüller *et al.*, 1996; Heymann und Grubmüller, 2001; Robertson und Tieleman, 2002).

$$F = k_F(r - r_0)^2 \quad (52)$$

k_F ist die Federkonstante. Mit dieser Methode kann man z.B. Reaktionen langer Zeitdauer auf für Moleküldynamik-Simulationen zugängliche Zeitskalen beschleunigen, da hohe Energiebarrieren durch die Zugkraft überwunden werden. Zudem können AFM-Experimente nachmodelliert und gemessene Kraftkurven so auf eine atomare Basis gestellt werden.

4 Einzelheiten der Simulationen

4.1 Elektrostatik-Rechnungen

Die Rechnungen zur Elektrostatik von Omp32 basieren auf der Grundlage des in Abschnitt 3.1.1 beschriebenen Kontinuum-Modells. Eine Variation dieses Modells ist nötig, um Membranproteine korrekt zu behandeln. Dazu wurde das Medium, das das Protein umgibt, in mehrere Bereiche verschiedener Dielektrizitätskonstante aufgeteilt.

Die bakterielle äußere Membran wurde als Schicht unendlicher xy -Ausdehnung modelliert, die ein Omp32-Monomer rechtwinklig zur Porenlängsachse z umschließt. Die Gesamtdicke der Membran in z -Richtung beträgt 36 Å. Sie besteht entlang z aus drei Unterschichten. Zwei Schichten mit den Dicken 10 Å (extrazelluläre Seite) und 7 Å (periplasmatische Seite) repräsentieren die Bereiche der polaren und hydratisierten Kopfgruppen der Membranlipide und Lipopolysaccharide mit einer intermediären Dielektrizitätskonstante von $\epsilon = 40$. In der Mitte dieser Schichten befindet sich eine Unterschicht mit $\epsilon = 4$, die den stark hydrophoben Membrankern darstellt (19 Å). Die Dielektrizitätskonstante der Lösung beträgt $\epsilon = 78$ (Hamer, 1971). In der Membran wurde ein zylindrisches Loch ausgespart, in das das Porinmonomer eingefügt wurde. Angrenzende Bereiche der anderen zwei Untereinheiten wurden mit in das Modell aufgenommen, um die zylindrische Form vollständig auszufüllen ("Modell des erweiterten Monomers"). Dem Protein wurde eine Dielektrizitätskonstante von $\epsilon = 4$ zugeschrieben. Damit wird – über die reine elektronische Polarisierbarkeit hinaus – einer begrenzten Reorganisationsfähigkeit der Proteinatome als Antwort auf den Einfluß von Ladungen *implizit* Rechnung getragen. Dieselbe Argumentation gilt somit für das Membraninnere. Zur fortgeführten kontroversen Diskussion über einen angemessenen Wert für ϵ in Kontinuumsdarstellungen von Proteinen siehe z.B. Harvey (1989), Gilson (1995) oder Voges und Karshikoff (1998).

Der periplasmatische und extrazelluläre Bereich wurden als wässrige Lösungen mit einer Dielektrizitätskonstante von $\epsilon = 78$ modelliert. Als Ionenstärke wurde für beide Bereiche sowie für die Pore ein Wert von $I = 0.12$ M verwendet. Die Dielektrizitätskonstante des Porenbereichs wurde zwischen Werten von $\epsilon = 78, 40, 30$ und

20 variiert. Theoretische Arbeiten an verschiedenen Kanalformen und Wassereinschlüssen in Nano-Kavitäten kamen zu dem Ergebnis, daß die Einschränkung der Bewegungsfreiheit von Wassermolekülen in diesen Strukturen eine Verringerung der Reorganisationsfähigkeit und damit der effektiven Dielektrizitätskonstante zur Folge hat (Partenskii und Jordan, 1992; Senapati und Chandra, 2001). Ein Wert von $\epsilon_{eff} \approx 40$ wird in Sansom *et al.* (1997) für das Solvens in β -Barrel-Poren vorgeschlagen.

Die partiellen Ladungen aller Proteinatome wurden in den Rechnungen berücksichtigt. Sie wurden dem Parametersatz PARAM22 des Moleküldynamik-Programmpakets CHARMM entnommen (MacKerrel *et al.*, 1998). Die verwendeten van-der-Waals-Radien der Atome entstammen Rashin *et al.* (1986), als Solvensradius wurde ein Wert von 1,4 Å benutzt. Die Proteingeometrie von Omp32 wurde seiner Kristallstruktur entsprechend verwendet, deren Auflösung 2,1 Å beträgt (Eintrag in der PDB-Proteindatenbank: 1E54; Zeth *et al.*, 2000). Mit der HBUILD-Routine von CHARMM (Brünger und Karplus, 1988) wurden die Positionen der Wasserstoffatome berechnet.

Eine gewisse konformationelle Freiheit im Protein wurde mit der Bestimmung alternativer Positionen für polare Wasserstoffatome in den Rechnungen berücksichtigt (z.B. Rotamere von Hydroxyl-Gruppen, tautomere Protonierung des N_δ und N_ϵ in Histidin, alternative Protonierung der Carboxyl-Sauerstoffatome in Aspartat und Glutamat; siehe Koumanov *et al.*, 2002). Dabei wurde zwischen polaren und titrierbaren Gruppen unterschieden. Für die Zuordnung der alternativen Wasserstoffpositionen wurden die Positionen freier Elektronenpaare der Donoren bzw. Akzeptoren gemäß ihrer Definition in HBUILD verwendet. Die jeweiligen protonierten Zustände wurden in eine Anzahl von Mikrozuständen aufgeteilt und entsprechend Spassov und Bashford (1998) behandelt. Die Einbringung weiterer konformationeller Freiheitsgrade von Seitenketten konnte pK_a -Rechnungen bisher nicht substantiell verbessern (Alexov und Gunner, 1997).

Die linearisierte Poisson-Boltzmann-Gleichung (4) wurde mit der Finite-Differenz-Technik gelöst (siehe Abschnitt 3.1.2), wobei das SOR-Iterationsschema (Gl. 10) verwendet wurde. Das kubische Gitter hatte dabei Dimensionen von 96^3 Gitterpunkten. Der anfängliche Gitterpunktabstand betrug 0,94 Å. In zwei darauf-

folgenden *Focusing*-Schritten wurde der Abstand auf 0,42 Å bzw. 0,21 Å reduziert.

Zur Berechnung der Titrationskurven wurde die Gesamtzahl der titrierbaren Gruppen in zwei *Cluster* eingeteilt. Der eine enthält die schwach untereinander wechselwirkenden Gruppen, die mittels Tanford-Roxby-Iteration behandelt wurden (siehe Abschnitt 3.1.3). Im anderen *Cluster* befinden sich stark miteinander gekoppelte Gruppen, deren mittlerer Protonierungsgrad über die statistische Summe bestimmt wurde. Sie wurde jeweils mit 100000 Metropolis-Monte-Carlo-Schritten angenähert. Die Temperatur des Systems entsprach 293 K. Alle Rechnungen erfolgten mit einem Programm, das von A. Karshikoff und Mitarbeitern entwickelt wurde (Altobelli *et al.*, 2001; Miteva *et al.*, 1997; Karshikoff, 1995; Karshikoff *et al.*, 1994). Sie wurden auf einem Prozessor einer DEC-Workstation im Zentrum für strukturelle Biochemie des Karolinska-Instituts, Huddinge bei Stockholm, durchgeführt.

Für die Porine OmpF (PDB-Datei: 2OMF, Auflösung 2,4 Å; Cowan *et al.*, 1992) und PhoE (PDB-Datei: 1PHO, Auflösung 3,0 Å; Cowan *et al.*, 1992) aus *E. coli* wurde eine analoge Vorgehensweise verfolgt. Zusätzlich wurden die Ergebnisse für Omp32, OmpF und PhoE mit dem Programm MEAD (Bashford, 1997) nachgerechnet. Dabei wurde für alle Gruppen die statistische Summe mit 100000 Monte-Carlo-Schritten berechnet. Die Porine von *R. capsulatus* (PDB-Datei: 2POR, Auflösung 1,8 Å; Weiss *et al.*, 1992), *R. blasticus* (PDB-Datei: 1PRN, Auflösung 2,0 Å; Kreuzsch und Schulz, 1994) und *P. denitrificans* (Kristallstruktur: W. Welte, unveröffentlichte Daten) und OmpK36 (PDB-Datei: 1OSM, Auflösung 3,2 Å; Dutzler *et al.*, 1999) wurden ausschließlich mit MEAD behandelt. Die MEAD-Rechnungen erfolgten auf je einem Prozessor des MPI-eigenen Beowulf-Linuxclusters *sally* (1,6 GHz Prozessor-takt).

Das Profil der Querschnittsfläche von Omp32 in Abb. 12 wurde mit dem Programm CROSS (A. Philippsen, Biozentrum Basel) mit einem Solvens-Modellradius von 1,5 Å auf einer SGI-Workstation der Abteilung Molekulare Strukturbiologie des MPI für Biochemie berechnet.

4.2 PNP-Modellrechnungen

Das Kontinuum-Modell, das für die PNP-Rechnungen verwendet wurde, ist dem Modell der Poisson-Boltzmann-Rechnungen ähnlich. Die Aufteilung des Systems in die Bereiche Protein, Poreninneres und zwei Solvens-Reservoirregionen wurde auf identische Weise vorgenommen. Die Verteilung der Dielektrizitätskonstanten erfolgte für diese Bereiche entsprechend Abschnitt 4.1, mit der Ausnahme, daß sowohl für den Reservoir- als auch für den Porenbereich des Solvens ein Wert von $\epsilon = 80$ verwendet wurde. Die Membran wurde nicht in drei Schichten unterteilt, sondern als einheitlicher Block von 36 Å Dicke mit einer Dielektrizitätskonstante von $\epsilon = 4$ modelliert.

Allerdings wird der Solvensbereich hier zusätzlich durch die räumliche Verteilung der Konzentrationen der Ionensorten i ($i = 1, \dots, n$), $c_i(\vec{r})$ gekennzeichnet. Den einzelnen Ionensorten werden die Parameter Ionenladung $z_i e$, Diffusionskoeffizient D_i und Ionenradius R_i zugeordnet. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Ionentypen mit den Ladungen $+1e$ und $-1e$ verwendet. Ihre Ionenradien wurden zu je 1,5 Å angenommen. Als Diffusionskoeffizient D_i wurde für beide Ionentypen ein einheitlicher Wert von $1 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ verwendet. Die Reservoirkonzentration der Ionen betrug in den in Abschnitt 5.2 dargestellten Rechnungen auf beiden Seiten der Membran 10 mM. Der Solvens-Modellradius wurde zu 1,4 Å festgelegt.

Die PNP-Gleichungen wurden in einem kubischen Gitter von 121 Punkten mit je 0,8 Å Abstand pro Seitenlänge gelöst. In je einem folgenden *Focusing*-Schritt wurde der Abstand auf 0,4 Å reduziert.

4.3 Moleküldynamik-Rechnungen zum Ionentransfer durch Omp32

Für die Simulationen wurde die Kristallstruktur eines Monomers von Omp32 verwendet (Zeth *et al.*, 2000; PDB-Datei: 1E54). Die Konstriktionszone und der extrazelluläre sowie periplasmatische Eingangsbereich der Pore wurden mit Wassermolekülen des TIP3P-Modells (Jorgensen *et al.*, 1983) gefüllt. Die hydrophilen extrazellulären und periplasmatischen Außenwände des β -Barrels wurden mit zwei Wasser-Boxen von 35 Å bzw. 25 Å Dicke umgeben. Damit sollte die breitere pola-

re Region auf der Seite der Lipopolysaccharid-Kopfgruppen widergespiegelt werden. Um die innere Region der Membran mit niedriger Dielektrizitätskonstante zu repräsentieren, wurde dieser Bereich von Wassermolekülen befreit (Dicke 20 Å). Die Teilchen im System, die in einem Zylinder mit 15 Å Radius und halbkugelförmigen Enden mit 58 Å Gesamtlänge entlang der Porenachse lagen, wurden frei beweglich simuliert, während das restliche System – vergleichbar stochastischen Randbedingungen – fixiert wurde. Das Simulationssystem umfaßte somit eine Gesamtzahl von 3739 – 3740 freien Atomen (2030 Proteinatome, 1699 Wasseratome und 1 – 2 Chloridionen) und 21136 fixierten Atomen. Der Ionisationszustand des Proteins wurde aus den Ergebnissen der vorangegangenen Elektrostatik-Rechnungen übernommen (Zachariae *et al.*, 2002). Eine Ausnahme hiervon bildet die Gruppe Glu 158, von der angenommen wurde, daß sie wegen der Interaktion mit einem Calcium-Ion im Trimer geladen ist. Simulationen von OmpF im trimeren Zustand mit expliziter Repräsentierung der Membranumgebung im System ergaben, daß die externe Gerüststruktur des β -Barrels sehr unflexibel ist (Tieleman und Berendsen, 1998; Im und Roux, 2002b). Das vereinfachte Modell wurde deshalb gewählt, um den Blick auf die Bewegungen der Atome der inneren Porenwand zu richten, die offenbar die wichtigsten Freiheitsgrade in bezug auf die Ionenbewegung in der Pore darstellen. Durch diese Beschränkung des Simulationssystems wurde es möglich, eine Reihe von Multinanosekunden-Simulationen durchzuführen. Dies erschien insbesondere durch experimentelle Daten begründet, die zeigten, daß die Translokation von Anionen durch den Kanal von Omp32 auf einer Zeitskala von bis zu 32 ns verläuft (Mathes und Engelhardt, 1998). Auf diese Weise war es ebenfalls möglich, die Ionenbewegung unter verschiedenen Bedingungen zu simulieren, d.h. unter Einwirkung verschiedener elektrischer Feldstärken, mit unterschiedlichen Anfangspositionen des Ions und mit einem zusätzlichen Ion im Kanal. Schließlich konnte so auch die Berechnung eines Energieprofils der Ionentranslokation durch die Konstriktionszone in Omp32 erfolgen.

Nach 30 ps Vor-Äquibrierungszeit wurden die Chlorid-Ionen an verschiedenen Stellen des Kanals in der Nähe des exo- bzw. periplasmatischen Eingangsbereichs plaziert. Die z -Koordinate entsprach dabei ca. 16 bzw. -16 Å, wobei der Referenzpunkt ($z = 0$ Å) dem Ort mit der geringsten Porenquerschnittsfläche in

der Kristallstruktur zugeordnet wurde (nahe der Seitenkette von Arg 75). Manche Simulationen gingen von einer Startstruktur aus, in der ein Anion bereits an bestimmte Basen im Bereich der Konstriktionszone gebunden war, insbesondere solche, in denen ein zweites Chlorid-Ion eingesetzt wurde.

100 Schritte *Steepest-Descent*- und 200 Schritte ABNR-Minimierung wurden berechnet, um die Ionen in das System einzupassen. Danach wurden die Produktionsläufe mit einer Anfangstemperatur von 250 K gestartet und kontinuierlich auf 310 K erwärmt (dies entspricht der physiologischen Temperatur; *D. acidovorans* ist fakultativ pathogen). Die Simulationen wurden bei einer Temperatur von 310 K fortgeführt, die durch Berendsen-Kopplung mit einer Zerfallszeit von 15 ps konstant gehalten wurde (Berendsen *et al.*, 1984). Die anfängliche Äquilibrationsphase umfaßt die ersten ca. 50 ps jeder Simulation.

Die Simulationsläufe wurden mit der Version 28b2 des *Molecular-Modelling*-Programmpakets CHARMM durchgeführt (Brooks *et al.*, 1983). Dazu wurde der Parametersatz PARAM22 verwendet (unter expliziter Berücksichtigung aller Wasserstoffatome; MacKerrel *et al.*, 1998). Für die nichtbindenden Wechselwirkungen wurde ein *Cutoff*-Radius von 14 Å benutzt. Alle Bindungslängen wurden mit Hilfe des SHAKE-Algorithmus konstant gehalten (Ryckaert *et al.*, 1977). Der Zeitschritt für die Integration der Newtonschen Bewegungsgleichungen betrug 2 fs.

Alle Rechnungen erfolgten mit parallelisiertem CHARMM-Code auf 8 – 16 Prozessoren der MPI-eigenen Beowulf-Linuxcluster *cathy* und *sally* (1 – 1,6 GHz Prozessortakt).

4.4 *Umbrella-Sampling*- und Kraftspektroskopie-Simulationen

Das Simulationssystem entsprach dem in Abschnitt 4.3 beschriebenen. Die Berechnungen des *Potential of Mean Force* erfolgten mit der *Umbrella-Sampling*-Technik (Torrìe und Valleau, 1977). Dafür wurde das UMBRELLA-Modul des Programmpakets CHARMM verwendet. Insgesamt wurden 41 voneinander unabhängige "Fenster"-Simulationen mit je einer Länge von 110 ps durchgeführt. Die Startgeometrien dieser Simulationen wurden einer Trajektorie des Verlaufs der Ionenbewegung entnommen, die aus einem der vorher erfolgten Simulationsläufe ohne Wich-

tungspotential entstammte. Die Äquilibrierungszeit im neuen Wichtungspotential betrug jeweils 10 ps.

Dieses *Umbrella*-Potential beschränkte die Bewegung des Chlorid-Ions auf die Nachbarschaft von Flächen, die parallel zur xy -Ebene des Systems lagen. Seine Kraftkonstante betrug $10 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{Å}^{-2}$. Für jedes neue Simulationsfenster wurde das Zentrum des Potentials in z -Richtung um $0,5 \text{ Å}$ verschoben. Jedes Fenster umfaßte ca. $1,2 \text{ Å}$ Durchmesserbereich in z -Richtung. Aufgrund dieses weiten Überlappungsbereiches erwies sich die Zusammensetzung der einzelnen PMF-Fragmente zu einem kontinuierlichen Profil als unproblematisch. Um ein ausreichendes *Sampling* des Konfigurationsraumes zu gewährleisten, wurde die Berechnung der PMF-Oberfläche auf einen Bereich von ca. 20 Å um die Kanal-Engstelle herum beschränkt. In dieser Region ist die Pore ausreichend schmal, um einen eindeutig definierten Transferpfad für das Anion zu gewährleisten. Die Verteilungsfunktion wurde jeweils über Bereiche von $0,05 \text{ Å}$ Breite gemittelt.

Die Kraftspektroskopie-Simulationen (Grubmüller *et al.*, 1996) wurden mit dem CONS-Modul von CHARMM durchgeführt. Dabei wurde eine Federkonstante von $4,2 \text{ N/m}$ für die virtuelle Feder zwischen der AFM-Spitze und dem Chlorid-Ion verwendet. Die Spitze wurde mit $0,00625 \text{ Å/ps}$ entlang 25 Å der inneren Pore von Omp32 gezogen.

4.5 Simulationen von Omp32 mit expliziter Membran

4.5.1 Aufbau des Simulationssystems

Der Aufbau eines Simulationssystems aus Protein, Membranmolekülen, Wasser und Substrat wurde entlang der Leitlinien von T. Woolf, B. Roux und Mitarbeitern vorgenommen (Woolf und Roux, 1994, 1996; Im und Roux, 2002a). Ein Omp32-Trimer wurde aus der Kristallstruktur (Zeth *et al.*, 2000) und den in der PDB-Datei (1E54) angegebenen Symmetrieoperatoren erzeugt. Die Porenlängsachsen sind entlang der z -Achse des Systems angeordnet. Ein Referenzwert von $z = 0 \text{ Å}$ wurde der Äquatorialfläche des Trimers zugeordnet. Er unterscheidet sich um ca. 4 Å in Richtung des periplasmatischen Raums von dem Referenzpunkt der Simulationen in Abschnitt 4.3 und 4.4.

Im ersten Schritt des Konstruktionsschemas wurde die Querschnittsfläche, die neben dem Proteintrimer im System für die Belegung mit Lipidmolekülen bleibt, bestimmt. Als Lipide wurden Dimyristoylphosphatidylcholin-Moleküle (DMPC) verwendet. Die erforderliche Anzahl an Lipiden muß genau berechnet werden, um eine stabile Membranstruktur in den Simulationen sicherzustellen. Dabei wurde eine durchschnittlich benötigte Fläche von 64 \AA^2 pro DMPC-Molekül (Kopfgruppe) angenommen. Die jeweilige Position der Lipidkopfgruppen wurde bestimmt, indem sie zuerst als 162 van-der-Waals-wechselwirkende Kugeln mit 64 \AA^2 Querschnittsfläche modelliert wurden (77 auf der extrazellulären Seite, 85 in Richtung Periplasma – aufgrund der dort etwas geringeren Ausdehnung von Omp32). Die z -Positionen der Kugeln wurden durch harmonische *Constraint*-Flächenpotentiale auf Werte von -17 \AA und $+17 \text{ \AA}$ beschränkt. Ihre xy -Positionen wurden durch ein Schema wiederholter Energieminimierungen und einer Langevin-Dynamiksimulation optimiert.

Die Modell-Kugeln wurden danach durch vollständige DMPC-Moleküle ersetzt. Diese entstammten einem vor-äquilibrierten und hydratisierten System aus 2000 Lipidmolekülen (Venable *et al.*, 1993). Durch eine Abfolge von Translationen in der xy -Ebene und Rotationen um die z -Achse wurden die Überlappungsbereiche der Lipide reduziert und ihre Kontakte optimiert. Verbleibende ungünstige Geometrien wurden durch weitere Energieminimierungszyklen beseitigt. Im nächsten Schritt wurde das System durch die Hinzunahme von Wassermolekülen aus einer vor-äquilibrierten Wasser-Box ober- und unterhalb der Membran sowie im Porenbereich des Omp32-Trimers vervollständigt. Dabei waren ca. 20 Wassermoleküle pro Lipid an die Kopfgruppenregion assoziiert.

Um die elektrische Neutralität des Systems zu bewahren, wurden für die Äquilibrierungsphase 12 Chlorid-Ionen zum Solvens addiert (Omp32 hat eine Gesamtladung von $+12e$ im Trimer inklusive 3 Ca^{2+}).

Dieses System wurde durch eine Serie von *Steepest-Descent*- und ABNR-Minimierungszyklen energieminiert. Danach erfolgten insgesamt 250 ps Langevin-Dynamiksimulation mit einem Reibungskoeffizienten von 3 ps^{-1} . Der Integrationszeitschritt betrug dabei 1 fs. Im Verlauf der Simulation wurde das System graduell von Einschränkungen befreit, die die Bewegungsfreiheit des

Proteins zunächst begrenzen. Alle Proteinatome wurden anfänglich festgesetzt. Danach wurden verschiedene starke Einschränkungen auf Seitenketten und *Backbone*-Atome verwendet, die im Laufe der Äquilibrierungsphase immer weiter reduziert und zum Schluß aufgehoben wurden. Diese Prozedur wurde verfolgt, um Verzerrungen der Protein-Kristallstruktur durch eine Umorientierung der Membranmoleküle am Anfang der Äquilibrierungsphase zu vermeiden. Die Lipidkopfgruppen wurden weiterhin auf z -Positionen um -17 \AA bzw. $+17 \text{ \AA}$ beschränkt. Das Eindringen von Wassermolekülen in das Membraninnere wurde während dieser Phase durch die Anwendung von Abstoßungspotentialen im Bereich der aliphatischen Ketten der Lipide verhindert. Die Wassermoleküle im Bereich der inneren Poren wurden dabei ortsfest gehalten. Im nächsten Schritt wurde eine Energieminimierung des gesamten periodischen Systems durchgeführt und 25 ps Moleküldynamiksimulation im CPTA-Ensemble (siehe Abschnitt 4.5.2) gerechnet, in der auch diese Einschränkungen aufgehoben wurden. Der Integrationszeitschritt wurde bei 1 fs belassen. Die 12 Chlorid-Ionen wurden durch sechs Malat-Ionen ausgetauscht (entsprechend einer Konzentration von ca. 25 mM). Je drei von ihnen wurden im extrazellulären und periplasmatischen Wasserbereich mit ausreichend Abstand über und unter den Poreneingängen plaziert, wobei Überlappungen mit Wassermolekülen beseitigt wurden, indem insgesamt 56 Wassermoleküle aus dem System entfernt wurden. Im Anschluß wurde die Energie des neuen Systems minimiert. Die Schwerpunkte der Malat-Ionen wurden zu Beginn auf z -Positionen von $+38,1 \text{ \AA}$ und $-25,1 \text{ \AA}$ festgelegt. Danach wurden weitere 8 ps Äquilibrierung berechnet, bevor mit dem eigentlichen Produktionslauf begonnen wurde. Die ersten 100 ps des Produktionslaufs sind zusätzlich noch der Äquilibrierungsphase zuzurechnen.

Die Äquilibrierung wurde auf 8 Prozessoren des MPI-eigenen Beowulf-Linuxclusters *sally* unter Verwendung parallelen CHARMM-*Codes* (je 1,6 GHz Prozessortakt) durchgeführt.

4.5.2 Simulationsbedingungen der Produktionsphase

Die verwendete Methode lehnt sich an die Technik zur Simulation des OmpF-Porins in einer expliziten Membran von Im und Roux (2002a) an. Das Gesamt-

system wurde unter hexagonalen periodischen Randbedingungen simuliert. Die Zentren der Omp32-Trimere waren in der xy -Ebene jeweils 99,88 Å voneinander entfernt. Die Membran breitet sich in xy -Richtung aus, die Porenachsen liegen in z -Richtung. In der z -Richtung betrug die anfängliche Entfernung zwischen zwei Trimeren 87 Å. Die Translationsdistanz in z war aufgrund des verwendeten Simulationsalgorithmus, der konstante Druckverhältnisse modelliert, variabel. Das System umfaßte das Proteintrimer mit 996 Aminosäureresten und drei Protein-gebundenen Calcium-Ionen (14574 Atome), 162 DMPC-Lipidmoleküle in der Membran (19116 Atome), 14323 TIP3P-Wassermoleküle und sechs Malat-Ionen, somit insgesamt 76737 Atome. Für die Simulation der Malatmoleküle wurden drei R-(D-) und drei S-(L-)Enantiomere verwendet.

Alle Simulationen erfolgten mit dem Programmpaket CHARMM. Dabei wurde der PARAM22-Parametersatz benutzt (s.o.). Die partiellen Ladungen auf den Atomen der Malat-Ionen wurden quantenchemisch mit der semiempirischen Methode MNDO (Dewar und Thiel, 1977) und Mulliken-Populationsanalyse bestimmt. Die Protonierungszustände der ionisierbaren Gruppen wurden analog zu dem in Abschnitt 4.3 beschriebenen System zugeordnet. Nach erfolgter Äquilibrierung wurde eine Trajektorie von (bislang) ca. 1,75 ns Dauer berechnet. Das Gesamtsystem wurde dabei unter CPTA-Bedingungen simuliert, d.h. mit konstantem Normaldruck (1 atm), konstanter Temperatur (330 K) und konstanter Oberfläche in der xy -Ebene. Die Temperatur wurde dabei mit dem Algorithmus von Nosé und Hoover konstant gehalten (Nosé und Klein, 1983; Hoover, 1985). Der entsprechende thermische Massenfaktor betrug $5000 \text{ kcal} \cdot \text{ps}^2$. Die erhöhte Temperatur wurde gewählt, um eine flüssig-kristalline Phase der DMPC-Lipide zu gewährleisten.

Alle Bindungslängen zwischen Wasserstoff- und Schweratomen wurden mit dem SHAKE-Algorithmus festgesetzt. Die langreichweitigen elektrostatischen Wechselwirkungen wurden mit der *Particle-Mesh-Ewald*-Methode (Essmann *et al.*, 1995) berechnet. Die *Fast-Fourier-Transformation* erfolgte auf einem Gitter der Dimension $100 \cdot 100 \cdot 72$ und mit einer *Spline*-Interpolation sechster Ordnung. Der Faktor, der die Breite der Gauß-Verteilung festlegt, betrug $0,32 \text{ Å}^{-1}$. Der *Cutoff*-Radius für die Berechnung der van-der-Waals-Wechselwirkung war 10 Å. Dabei wurde die Liste der wechselwirkenden Partner Atom-basiert erstellt und ab einer

Distanz von 12 Å abgebrochen. Eine *Shift*-Funktion wurde eingesetzt, um Diskontinuitäten im Bereich des *Cutoffs* zu vermeiden. Einer Verschiebung des Porintrimers in der Membran in *xy*-Richtung wurde durch die Anwendung eines zylindrischen harmonischen *Constraint*-Potentials entgegengewirkt.

Die Simulation erfolgte auf 8 – 16 Prozessoren des MPI-eigenen Beowulf-Linuxclusters *sally* (je 1,6 GHz Prozessortakt) unter Verwendung parallelisierter CHARMM-*Codes*. Koordinatendatensätze wurden alle 125 Integrationsschritte ausgegeben, die einer simulierten Zeitspanne von 200 fs entsprechen. Für je 5 ps simulierte Zeit wurden durchschnittlich etwa 10 Stunden Rechenzeit benötigt.

5 Ergebnisse

5.1 Studien zu den elektrostatischen Eigenschaften von Porinen

Die funktionellen Eigenschaften der Porine, d.h. ihre Ionenselektivität, Leitfähigkeit und der Mechanismus der Substrattranslokation werden aller Voraussicht nach stark durch den Zustand der ionisierbaren Gruppen im Kanal und in der Nähe der Eingänge beeinflusst (Eppens *et al.*, 1997, van Gelder *et al.*, 1996; Benz *et al.*, 1979). Ihr jeweiliger Ladungszustand spielt folglich eine wichtige Rolle in der Aufklärung der Struktur-Funktions-Beziehungen dieser Kanalproteine. Es wird im allgemeinen angenommen, daß insbesondere die titrierbaren Aminosäuren der Konstriktionszone die größte Bedeutung für die funktionellen Eigenschaften der un-spezifischen Porine haben (Phale *et al.*, 2001).

In einer grundlegenden Arbeit über die elektrostatischen Eigenschaften der Porine OmpF und PhoE aus *E. coli* wurden die Titrations-eigenschaften der ionisierbaren Gruppen dieser Proteine mit der Poisson-Boltzmann-Methode berechnet (Karshikoff *et al.*, 1994). In dieser Studie wurde ein Titrationsverhalten der funktionell wichtigen ionisierbaren Gruppen der Konstriktionszone und die partielle Deprotonierung des Arginin-Clusters auf +2 (OmpF) bzw. +1,5 (PhoE) Ladungen um pH = 7 berechnet. Als Grund der Entladung wurde die räumliche Nähe der drei Argininingruppen und weiterer basischer Aminosäuren in der Konstriktionszone genannt.

5.1.1 Die elektrostatischen Eigenschaften von Omp32

Aufgrund der besonders starken Selektivität von Omp32 für Anionen ergab sich die Frage, ob der Arginin-Cluster in der Konstriktionszone von Omp32 auf eine ähnliche Weise partiell deprotoniert wird. Ein Verlust an positiver Ladung hätte ungünstige Auswirkungen auf diese Selektivität.

Das Titrationsverhalten aller ionisierbaren Aminosäuren in Omp32 wurde deshalb mit einer Poisson-Boltzmann-Technik (siehe Abschnitte 3.1 und 4.1) berechnet, die der in Karshikoff *et al.* (1994) verwendeten ähnlich war. Allerdings wurden in

der vorliegenden Studie alle Protein-Partialladungen in den Rechnungen berücksichtigt und alternative Positionen für polare Wasserstoffatome als Näherung eines gewissen Grades an konformationeller Freiheit verwendet.

Konstriktionszone von Omp32

Diese Rechnungen ergaben für Omp32 überraschende Ergebnisse, die in deutlichem Widerspruch zu den früheren Arbeiten an den strukturell vergleichbaren Arginin-Clustern von OmpF und PhoE stehen.

Die Tatsache, daß sich die drei Arginin-Seitenketten in nächster Nachbarschaft zueinander befinden, mit Distanzen von nur 3.5 Å (Arg 38-N_{η1} – Arg 75-N_{η1}) und 3.4 Å (Arg 75-N_{η2} – Arg 133-N_{η2}) in der Kristallstruktur, wirkt sich offenbar nicht substantiell auf den Protonierungszustand dieser drei Gruppen aus. Die Rechnungen ergaben, daß alle drei Seitenketten im Bereich von pH = 7 protoniert vorliegen (Abb. 10). Am bemerkenswertesten ist dabei die Tatsache, daß die mittlere Base des Clusters, Arg 75, bis zu einem pH-Wert von 12 im protonierten Zustand verbleibt. Es war zu erwarten gewesen, daß sich hier die ungünstigen Effekte des Ladungs-Stackings am stärksten auswirken würden. Die flankierenden Gruppen, Arg 38 und Arg 133, beginnen nach diesen Rechnungen erst ab pH 9 bis 10 deprotoniert zu werden. Der berechnete pK_a-Wert von Arg 38 beträgt 13,0, derjenige von Arg 133 11,1. Der destabilisierende Effekt der benachbarten Ladungen besonders auf Arg 75 wird durch andere Wechselwirkungen kompensiert (s.u.).

Ein Grund für das geringe Ausmaß der Destabilisierung sind die relativ moderaten Werte der Desolvatationsenergie (Born-Energie) für die Arginin-Gruppen, die weit in die mit Wasser gefüllte Pore hineinreichen (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Born-Energien im Arginin-Cluster von Omp32 für $\epsilon_s = 78$ im Kanal.

Gruppe	Born-Energie (kcal/mol)
Arg 38	5,0
Arg 75	3,0
Arg 133	4,8

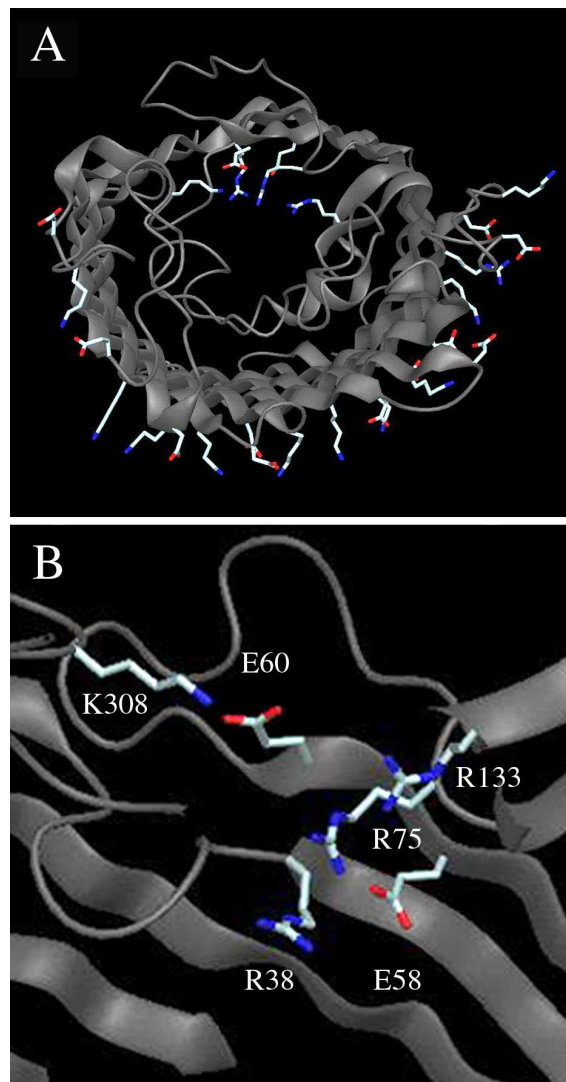


Abbildung 9: Regionen mit einer hohen Dichte an geladenen Aminosäuren in Omp32. (A) Ansicht von der exoplasmatischen Seite. Der basische Cluster besteht aus drei Arginin-Resten gegenüber Loop 3. Zwei Glutamatgruppen befinden sich dahinter. Loop 3 verengt den Kanal in Omp32 zusammen mit Loop 8 und einer Protrusion aus β -Strang 3. Der Ladungsgürtel an der Außenseite des β -Barrels besteht hauptsächlich aus Lysin- und Aspartatresten. (B) Nahansicht des Ladungs-Clusters in der Konstriktionszone. Die Konformation von Loop 8 wird durch die Salzbrücke zwischen Lys 308 und Glu 60 stabilisiert. Glu 58 bildet Salzbrücken mit Arg 75 und Arg 38 und stabilisiert den Arginin-Cluster. Die Glutamatreste reichen nicht in den wassergefüllten Kanalbereich. Aus Zachariae *et al.* (2002).

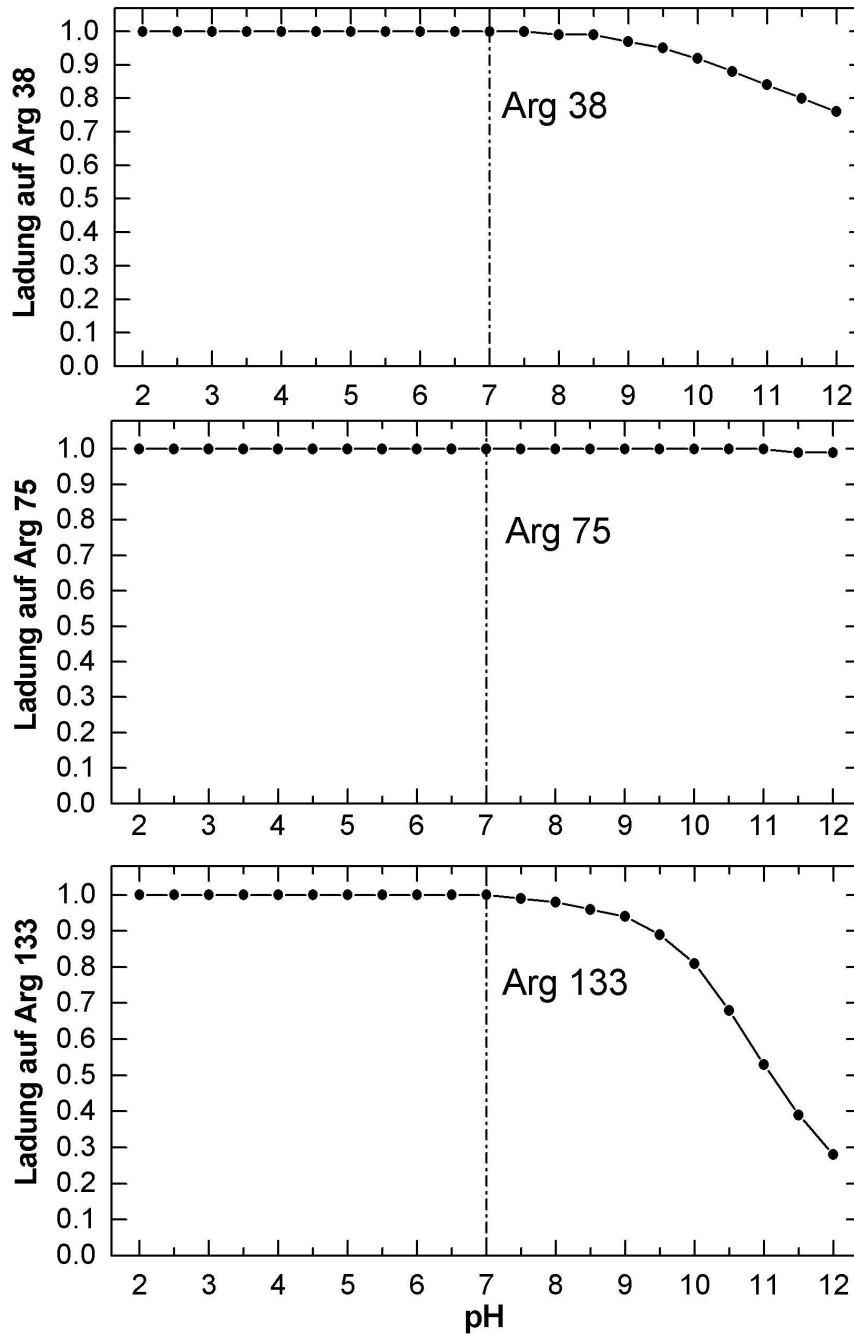


Abbildung 10: Berechnete Titrationskurven des Arginin-Clusters in der Konstriktionszone von Omp32. Die Guanidiniumgruppen von Arg 38, Arg 75 und Arg 133 sind bei pH = 7 vollständig geladen. Insbesondere die Ladung auf Arg 75 bleibt über den gesamten in den Rechnungen abgedeckten pH-Bereich erhalten. Arg 38 und Arg 133 titrieren ab ca. pH = 9,5 bzw. pH = 9 aufwärts.

Es werden nach wie vor Diskussionen über den Wert der Dielektrizitätskonstante geführt, der in Kontinuum-Rechnungen für Wasser in Kanalstrukturen verwendet werden sollte (siehe Abschnitt 4.1). Deswegen wurden die Berechnungen der Titrationsgleichgewichte auch mit Solvens-Dielektrizitätskonstanten von $\epsilon_s = 40$, 30 und 20 durchgeführt. Bei neutralem pH ergeben sich Gesamtprotonierungsraten des Arginin-Clusters von 97% ($\epsilon_s = 40$), 92% ($\epsilon_s = 30$) und 76% ($\epsilon_s = 20$). Dabei bleibt Arg 75 in allen Fällen über den gesamten in den Rechnungen abgedeckten pH-Bereich von 2 – 12 vollständig protoniert.

Der wesentliche Beitrag zur Stabilisierung der protonierten Zustände von Arg 38 und Arg 75 stammt von der Ladungswchselwirkung zwischen den zwei Basen und ein bis zwei Glutamatseitenketten, die nicht solvensexponiert sind. Sie befinden sich zwischen dem β -Barrel-Gerüst und dem Arginin-Cluster (siehe Abb. 9). Die Carboxyl-Gruppen von Glu 58 und Glu 60 (beide Teil von β -Strang 3) liegen knapp hinter den Ladungen der Guanidinium-Gruppen der Cluster-bildenden Arginine und wechselwirken stark mit ihnen (Glu 58 wesentlich mehr als Glu 60). Die kürzeste Distanz zwischen dem am stärksten wechselwirkenden Paar beträgt 2,55 Å (Arg 75-N _{η 1} – Glu 58-O_{e1}). Zwischen Arg 38-N _{η 1} und Glu 58-O_{e1} mißt die Entfernung 3,94 Å in der Kristallstruktur. Tabelle 3 zeigt die berechneten Wechselwirkungsenergien der am Ladungs-Cluster beteiligten Aminosäuren.

Tabelle 3: Paarweise Ladungswchselwirkungsenergien der zentralen elektrostatischen Triade des Arginin-Clusters aus Omp32 (kcal/mol) bei pH = 7 und $\epsilon_s = 78$ in der Pore.

Gruppe	Arg 38	Arg 75	Glu 58
Arg 38	–	2,1	-3,4
Arg 75	2,1	–	-7,7
Glu 58	-3,4	-7,7	–

Bei einem pH-Wert von 7 beträgt die Wechselwirkungsenergie der Ladungen auf Glu 58 und Arg 75 -7,7 kcal/mol und stabilisiert beide Ladungen. Dabei wird für Arg 75 vor allem die Summe aus Desolvatationsenergie und Wechselwirkung mit Arg 38 kompensiert.

Ein weiteres erstaunliches Resultat ist, daß Arg 133 mit weniger als 2 kcal/mol mit den übrigen geladenen Gruppen des *Clusters* wechselwirkt und nicht durch eine Säure stabilisiert wird. Hier wird die Desolvatationsenergie durch Wechselwirkung mit festen Partialladungen der Proteinumgebung kompensiert, besonders mit dem *Backbone*-Sauerstoffatom von Arg 75 (-2,8 kcal/mol). Die Wechselwirkung mit Partialladungen spielt auch für Arg 38 eine große Rolle. Dort beträgt die Interaktionsenergie mit dem *Backbone*-Sauerstoffatom von Thr 36 -3,5 kcal/mol, ist also von gleicher Größe wie die gegenseitige Destabilisierung der Ladungen auf Arg 38 und Arg 75. Die geladene Form von Glu 60 stabilisiert die Ladung auf Arg 75 zusätzlich mit -1,6 kcal/mol. Dieser Beitrag ist zwar geringer, verdient aber aufgrund der enormen Stabilisierung der protonierten Form von Arg 75 bis weit in den basischen Bereich hinein Erwähnung.

Lysin-Gürtel von Omp32

Auf der äußeren Seite des β -*Barrels* von Omp32 befindet sich eine stark hydrophile Region ionisierbarer Aminosäuren. Sie bildet eine ringartige Struktur in der Nähe des exoplasmatischen *Barrel*-Endes und zeigt in Richtung der polaren LPS-Kopfgruppen der Membran (siehe Abb. 9 A). Deswegen wird ihr eine *Linker*-Funktion zu diesem Membranteil zugeschrieben (Zeth *et al.*, 2000). Dieser Ring ist in der Mehrzahl der Porine vorhanden, jedoch im Falle von Omp32 besonders ausgeprägt und kontinuierlich. Insgesamt enthält der Ladungs-Gürtel 10 Lysinreste und ein Arginin, die von 10 Aspartaten und einem Glutamat umgeben sind.

Die elektrostatischen Rechnungen zeigten, daß sieben der Lysine und das Arginin bei pH-Werten um 7 vollständig protoniert vorliegen, während drei Lysine zu mehr als 50 % protoniert sind. Dies ist – erneut – vor allem deswegen ein interessantes Ergebnis, weil hier eine große Anzahl von geladenen Seitenketten dicht nebeneinander liegt. Die Akkumulation von positiven Ladungen kann – neben der stabilisierenden Wechselwirkung mit den Partialladungen der Proteinumgebung – nur mit der hohen Zahl von Lys – Asp-Salzbrücken erklärt werden, die den Ladungszustand des Lysin-Gürtels durch erhebliche pK_a -Verschiebungen stabilisieren. Tab. 4 enthält die pK_a -Werte der Basen im Gürtel und deren wesentliche Stabilisierungsfaktoren durch Salzbrücken.

Tabelle 4: pK_a -Werte und Ladungswechselwirkungen des Lysin-Gürtels von Omp32. Wechselwirkungsenergien $<2,0$ kcal/mol wurden nicht berücksichtigt.

Base	pK_a	wechselwirkende Gruppe	Energie (kcal/mol)
Lys 19	12,6	Glu 319	-3,2
Lys 159	11,0	-	-
Arg 170	$>13,0$	Asp 157	-7,7
Lys 193	$>13,0$	Asp 202	-7,2
Lys 227	11,8	Asp 235	-4,6
Lys 229	$>13,0$	Asp 202/Asp 204	-4,7/-3,8
Lys 237	7,7	-	-
Lys 265	12,9	Asp 263	-5,3
Lys 270	11,0	Asp 263	-3,8
Lys 296	8,0	-	-
Lys 298	8,8	-	-

Aus der Auflistung geht deutlich hervor, daß die pK_a -Werte der Lysine beim Fehlen von Salzbrücken um den Neutralpunkt liegen (Lys 237, Lys 296, Lys 298). Dies unterstreicht die Bedeutung der Salzbrücken für die Stabilisierung der Ladung auf dem Lysin-Gürtel.

Die besondere Architektur wirkt sich auf das elektrostatische Potential um den Gürtel aus. Obwohl die basischen Gruppen von einer gleich großen Zahl saurer Gruppen umgeben sind, ist das Potential stark positiv in Richtung der Lipopolysaccharid-Kopfgruppen der Membran. Grund hierfür ist, daß die langen Seitenketten der Lysine ihre geladenen ϵ -Aminogruppen zur Membran hin exponieren, während die vergleichsweise kurzen Aspartat-Seitenketten näher am Protein-*Backbone* anliegen. So können sie die Ladungen der Basen zwar stabilisieren, haben aber keinen wesentlichen Einfluß auf das Potential auf der Außenseite des Lysin-Gürtels. Dies ist wichtig für die Stabilisierung des Membran-Protein-Komplexes, da so die Wechselwirkung mit dem negativ geladenen LPS durch ein nach außen stark positives elektrostatisches Potential maximiert wird (siehe Abb. 11).

Salzbrücken mit struktureller Bedeutung in Omp32

Es konnte eine Reihe von Salzbrücken identifiziert werden, die die Struktur von Omp32 – zusätzlich zu den in Zeth *et al.* (2000) beschriebenen – stabilisieren. Darunter sind die Ionenpaare Glu 60 – Lys 308, Arg 92 – Asp 128 sowie Lys 100 – Asp 179 die strukturell bedeutendsten.

Lys 308 liegt nahe der Spitze von *Loop* L8, der sich in Richtung der Pore faltet und zur Verengung des Kanals in der Konstriktionszone beiträgt. Die geladenen Seitenketten von Glu 60 und Lys 308 sind nur 2,7 Å voneinander entfernt, was die hohe Wechselwirkungsenergie von -8,0 kcal/mol zwischen den beiden Gruppen erklärt (siehe Abb. 9 B). Die anderen zwei Salzbrücken stabilisieren die Faltungsgeometrie des *Loops* L3 in der Pore. Die Interaktion zwischen Lys 100 und Asp 179 dient dazu, den kurzen α -helikalen Teil von L3 auf der periplasmatischen Seite des Kanals zu immobilisieren. Das Ionenpaar Arg 92 – Asp 128 stabilisiert auf analoge Weise die Position der *Protrusion* von L3 in der Nähe des exoplasmatischen Poreneingangs (in Zeth *et al.*, 2000, als *Protrusion 2* bezeichnet).

Das elektrostatische Potential von Omp32

Die Darstellung des Potentials in der Pore und um Omp32 (Abb. 11) zeigt, daß der Einfluß der drei eng benachbarten positiven Ladungen des zentralen Arginin-*Clusters* und die Verteilung von weiteren positiv geladenen Resten in der Pore dem gesamten Kanal ein stark positives Potential verleihen. Die negativen, den Arginin-*Cluster* stabilisierenden Ladungen von Glu 58 und Glu 60 wirken sich dabei nicht auf das Potential in der Pore aus, da sie nicht Teil der Kanaloberfläche sind. Entlang der Porenängsachse, betrachtet von der extrazellulären zur periplasmatischen Seite, ist die potentielle Energie, die eine negative Testladung erfahren würde, ca. 5 Å von der Engstelle der Konstriktionszone in Richtung Periplasma entfernt am geringsten (siehe Abb. 12). Das Potentialminimum befindet sich damit zwischen den Seitenketten der Gruppen Arg 75 und Arg 38. Die potentielle elektrostatische Energie der Testladung beträgt an diesem Ort ca. -3,6 kcal/mol, was etwa 6,1 *kT* entspricht.

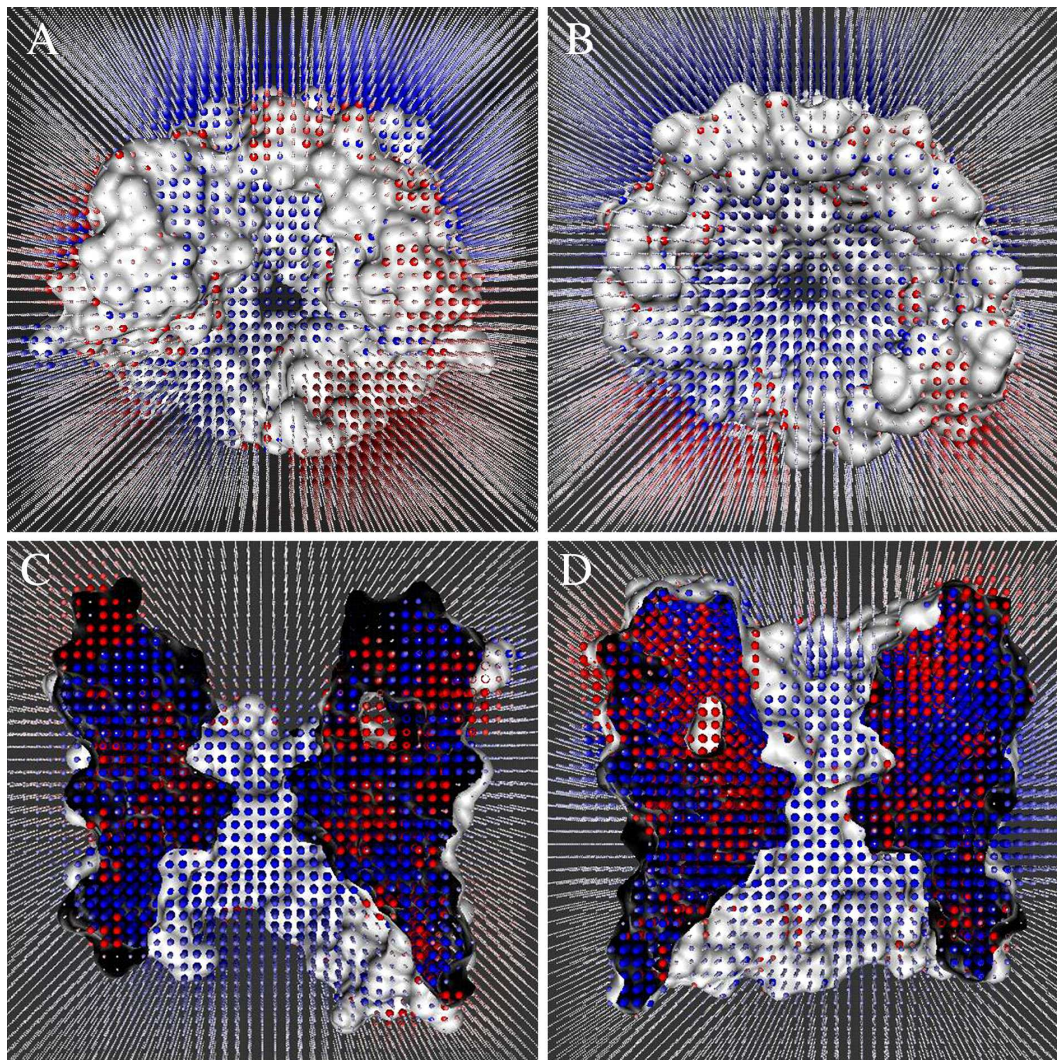


Abbildung 11: Darstellung des elektrostatischen Potentials im Kanal und in der Umgebung eines Omp32-Monomers. Die Berechnung erfolgte unter Verwendung der vorher erhaltenen pK_a -Werte bei $\text{pH} = 7$ und einer Ionenstärke von 0.12 M. Die Größe und die Farben der Punkte stehen für Potentialwerte an den betreffenden Stellen. Die Grenzwerte sind dabei $-2,5$ kcal/mol (rot) und $2,5$ kcal/mol (blau). (A) Ansicht von der exoplasmatischen Seite. (B) Ansicht von der periplasmatischen Seite. (C) Längsansicht in Richtung des Arginin-Clusters. (D) Längsansicht in Richtung der membran zugewandten Seite. Das stark positive Potential auf der oberen Seite in (A) und (B) geht vom Lysingürtel aus, der kleinere Bereich negativen Potentials deutet die Trimer-Kontaktregion an. Aus Zachariae *et al.*, 2002.

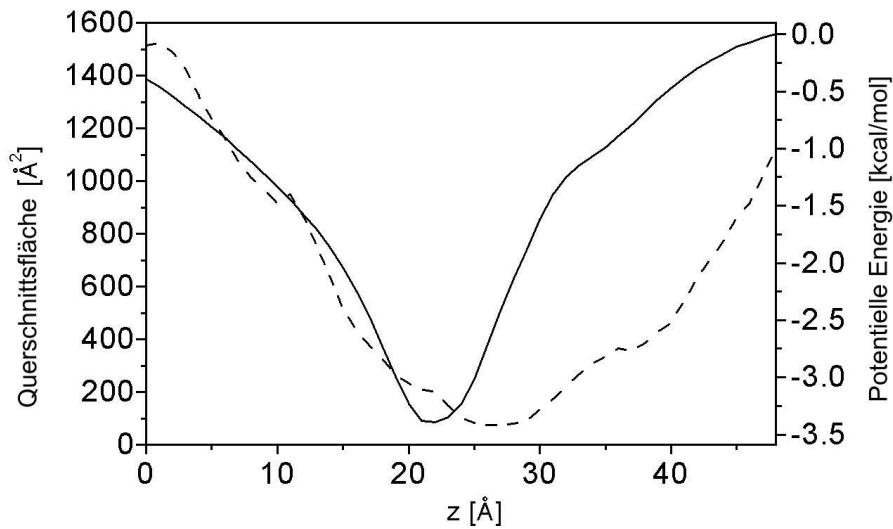


Abbildung 12: Profil der potentiellen Energie einer negativen Elementarladung entlang der Poren­längsachse von Omp32 (durchgezogene Linie). Vergleich mit dem Profil der Porenquerschnittsfläche (im Trimer) entlang des Kanals (gestrichelte Linie). Die Querschnittsfläche wurde als solvenszugängliche Fläche für einen Wasser-Modellradius von 1,5 Å berechnet. Die Position auf der z -Achse wird vom periplasmatischen Eingang zur exoplasmatischen Seite gerechnet.

Das Potential in den exoplasmatischen und periplasmatischen Eingangsbereichen des Kanals ist ebenfalls durchgehend positiv. Eine Anzahl basischer Gruppen an den jeweiligen Poreneingängen tragen hierzu bei (Arg 92, Arg 119, Arg 230 und Lys 74 auf der exoplasmatischen Seite; Arg 42, Arg 76, Arg 89, Arg 329, Lys 100, Lys 218, und Lys 284 auf der periplasmatischen Seite).

Die extrazelluläre Region um den Poreneingang weist eine Potentialisofläche in Form eines zweifachen Trichters auf, der sich auf den Eingang zu zentriert (Abb. 13). Dieses doppeltrichterförmige elektrostatische Feld dirigiert Anionen aus der Umgebung der Pore in Richtung des Kanals (siehe Abschnitt 5.4).

Die einzige Region von Omp32, die ein negatives Oberflächenpotential besitzt, ist ein Teil der Kontaktregion der Trimere am Rand des Periplasmas. Diese Kontaktzone enthält jedoch *in vivo* komplexierte Calcium-Ionen und ist im nativen Porintrimer im wesentlichen abgeschirmt (Zeth *et al.*, 2000).

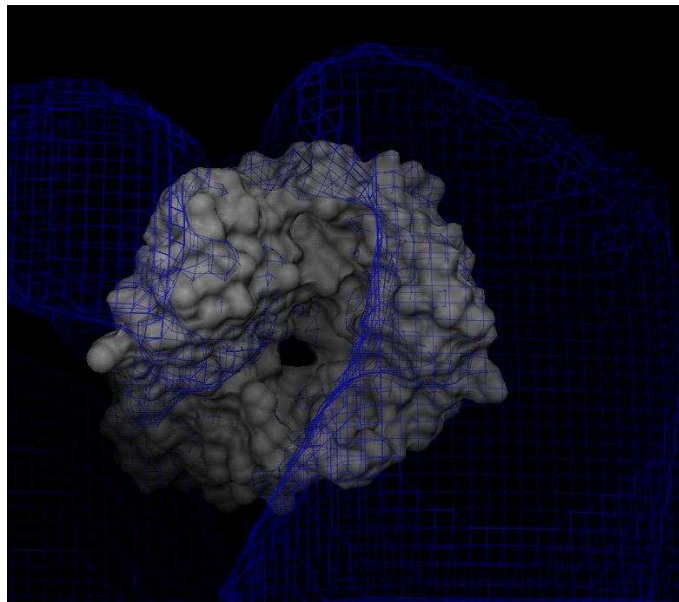


Abbildung 13: Doppeltrichterförmige Potentialisofläche über dem extrazellulären Poreneingang von Omp32. Dargestellt ist die Fläche mit ca. $\phi = 0.01$ V, so daß die Bereiche mit positivem Potential oder Nullpotential frei von Gitternetzlinien sind. Die Berechnung erfolgte für pH = 7 und eine Ionenstärke von I = 0,12 M.

5.1.2 Titrationskurven mit funktioneller Bedeutung in den Porinen OmpF und PhoE

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, daß hinter dem *Cluster* verborgene Glutamatreste in der Lage sind, die Protonierung des Arginin-*Clusters* in Omp32 zu stabilisieren. Dieses Erkenntnis warf die Frage auf, ob homologe Porinstrukturen eine ähnliche funktionelle Konstruktion besitzen. Dafür wurden zunächst die Strukturen und elektrostatischen Eigenschaften von OmpF und PhoE aus *E. coli* neu untersucht. Der Arginin-*Cluster* stellt eine in allen Porinen konservierte Struktur dar. Die entsprechenden Positionen in OmpF und PhoE sind Arg 42, Arg 82 und Arg 132¹.

Die Akkumulierung basischer Reste in der Konstriktionszone wird in OmpF

¹Hierzu ist anzumerken, daß die Numerierung in PhoE derjenigen in OmpF angeglichen wurde; die wahren Sequenzpositionen in PhoE sind Arg 37, Arg 75 und Arg 126.

durch Lys 16 und Lys 80 und in PhoE durch Lys 16, Lys 18, Lys 80 und Lys 131 erweitert. In den Strukturen von OmpF und PhoE befindet sich der Rest Glu 62 in einer vergleichbaren Position relativ zu Arg 82 wie die Gruppe Glu 58 zu Arg 75 in Omp32. Eine weitere wichtige strukturelle Eigenschaft ist die Nähe der Gruppe Glu 71, die auf dem *Latching Loop* L2 der *benachbarten* Untereinheit liegt, sowohl zu Arg 100 (Distanz: 2,7 Å in der Kristallstruktur) als auch zur Gruppe Arg 132 des *Clusters* (2,9 Å). Der *Latching Loop* eines Monomers verbindet jeweils zwei der drei Untereinheiten miteinander. So wird die Lücke zwischen den zylinderförmigen β -*Barrels* in den Trimeren von OmpF und PhoE geschlossen.

Die Salzbrücke zwischen Glu 71 und Arg 100 wurde in früheren Arbeiten erwähnt (Phale *et al.*, 1998), während der für die Funktion der Porine potentiell bedeutenden Wechselwirkung zwischen Glu 71 und Arg 132 keine ausreichende Aufmerksamkeit geschenkt wurde.

Die in der vorliegenden Arbeit ausgeführten Rechnungen zeigten, daß die Wechselwirkung zwischen Glu 62 und Arg 82 in OmpF und PhoE eine entsprechende stabilisierende Wirkung auf den Arginin-*Cluster* hat, wie sie in Omp32 vorliegt. Die Wechselwirkungsenergie der Salzbrücke Glu62 – Arg 82 beträgt in OmpF -8,1 kcal/mol und in PhoE -8,3 kcal/mol. Weiterhin wurde deutlich, daß die Wechselwirkungsenergie in der elektrostatischen Triade zwischen den Gruppen Glu 71 und Arg 132 mit der Interaktionsenergie zwischen Glu 71 und Arg 100 in OmpF und PhoE vergleichbar ist. Die Salzbrücke zwischen Glu 71 und Arg 132 stabilisiert den protonierten Zustand auf Arg 132 über den gesamten untersuchten pH-Bereich (2 – 12) mit einer Energie von -11,0 kcal/mol in OmpF und -9,2 kcal/mol in PhoE. Diese Werte entsprechen pK_a -Verschiebungen von 6,5 – 8 pK-Einheiten. Testrechnungen, in denen der *Latching Loop* des angrenzenden Monomers mit Glu 71 nicht in die Berechnungen der Protonierungsgleichgewichte aufgenommen wurden, ergaben, daß in diesen Fällen Arg 132 schon ab ca. pH 8 in OmpF bzw. ab ca. pH 6 in PhoE deprotoniert wurde. In PhoE wird die ungünstige Wechselwirkung zwischen den positiven Ladungen auf Arg 42 und Arg 82 (2,1 kcal/mol) für Arg 42 von der Interaktion mit Glu 64 (-3,5 kcal/mol) und Glu 62 (-2,2 kcal/mol) überkompensiert. In OmpF stabilisieren permanente Partialladungen der Umgebung die protonierte Form von Arg 42.

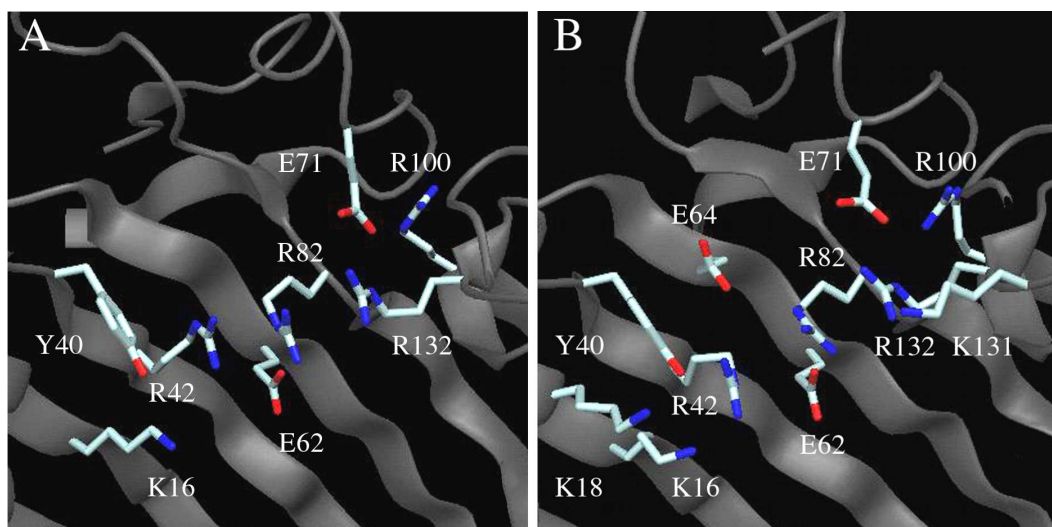


Abbildung 14: Architektur der Arginin-Cluster in den Konstriktionszonen der Porine OmpF (A) und PhoE (B) aus *E. coli*. Der Arginin-Cluster wird in diesen Strukturen jeweils durch Lysine erweitert. Die Säuren Glu 62 und Glu 71 (vom Loop 2 des benachbarten Monomers) bilden Salzbrücken mit Arg 82 und Arg 100/Arg 132 in OmpF und PhoE. Aus Zachariae *et al.* (2002).

So ergibt sich bei korrekter Berücksichtigung der Ladungswechselwirkungen des jeweiligen Arginin-Clusters, daß dieser sowohl in OmpF als auch in PhoE bei physiologischen pH-Werten – und darüber hinaus – vollständig geladen ist. Diese Resultate stehen in krassem Gegensatz zu den früheren Ergebnissen von Karshikoff *et al.* (1994) an OmpF und PhoE. Sie reflektieren jedoch experimentelle Befunde an OmpF und PhoE weitaus besser als die dort publizierten Daten.

Nach den Rechnungen von Karshikoff *et al.* (1994) besitzt Lys 80, das sich in der Nähe des Arginin-Clusters in OmpF befindet, einen pK_a -Wert von 6,89. Somit würde Lys 80 um den neutralen pH titrieren, und OmpF dementsprechend zwischen pH = 5 und pH = 8 eine positive Ladung in der Konstriktionszone verlieren. In Karshikoff *et al.* (1994) wurde damit eine Titration meßbarer Eigenschaften wie Ionenselektivität und Leitfähigkeit in diesem pH-Bereich postuliert. Diese Annahme wurde nie experimentell bestätigt; dagegen fand man im Bereich zwischen pH = 5 und pH = 9 in verschiedenen Studien gleichbleibende Werte für Selektivität und Leitfähigkeit in OmpF (Nestorovich *et al.*, 2003; Schirmer und Phale, 1999;

Benz *et al.*, 1979). OmpF verändert seine Ionenselektivität im Experiment zwischen $\text{pH} = 5,5$ und $\text{pH} = 2,5$ drastisch (Nestorovich *et al.*, 2003). Genau in dieser pH -Region wurde in der hier vorliegenden Arbeit ein Titrationsverhalten der Säuren Asp 113 und Glu 117, die den Arginin-Cluster auf der gegenüberliegenden Kanal-seite ausgleichen, berechnet. Die experimentelle Beobachtung kann somit der zunehmenden Protonierung dieser zwei Gruppen mit sinkenden pH -Werten zugeschrieben werden. Veränderungen im Protonierungszustand des Arginin-Clusters spielen dafür offenbar keine Rolle.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, daß Lys 16 in OmpF beginnt, ab ca. $\text{pH} = 9$ zu deprotonieren. Ab einem pH -Wert von 10 titriert zusätzlich Lys 80. Diese Ergebnisse stimmen sehr gut mit den experimentellen Daten von Nestorovich *et al.* (2003) überein, in denen eine Veränderung der Selektivität und Leitfähigkeit von OmpF im pH -Bereich von 9 – 12 gemessen wurde.

Für die Lysine in der Konstriktionszone von PhoE wurde berechnet, daß Lys 131 bis etwa $\text{pH} = 12$ protoniert bleibt, während Lys 18 und Lys 80 über ca. $\text{pH} = 9$ sowie Lys 16 zwischen $\text{pH} = 5$ und $\text{pH} = 8$ deprotoniert werden (siehe Abb. 16). Für das im Vergleich zu OmpF zu niedrigeren pH -Werten verschobene Titrationsverhalten von Lys 16 ist vor allem die Interaktion mit der zusätzlichen Base Lys 18 verantwortlich. Die insgesamt stärker positiv geladene Umgebung führt auch dazu, daß die zwei Säuren Asp 113 und Glu 117 erst bei geringeren pH -Werten als in OmpF mit einer Deprotonierung beginnen. Insbesondere sind hierfür die Wechselwirkungen mit Lys 18 (Glu 117) und Lys 131 (Asp 113) verantwortlich. Asp 113 beginnt unter $\text{pH} = 4$ protoniert zu werden, während die Gruppe Glu 117 bis $\text{pH} = 2$ fast vollständig im geladenen Zustand verbleibt. Tyr 40 wurde in PhoE und OmpF als durchgehend ungeladen berechnet.

Die gemessene Titration des Selektivitätsfaktors für Anionen von ca. 3 auf ca. 12 zwischen $\text{pH} = 6$ und $\text{pH} = 3$ in PhoE (Benz *et al.*, 1984) kann qualitativ mit der berechneten Protonierung von Lys 16 erklärt werden. Die erneute Veränderung des Selektivitätsfaktors zu $\text{pH} = 9$ hin wird durch die Titration von Lys 18 bedingt. Die Differenz von etwa 1 – 1,5 pK -Einheiten zu den experimentellen Daten von Benz *et al.* (1984) liegt im Rahmen der üblichen Genauigkeit von Poisson-Boltzmann-Rechnungen.

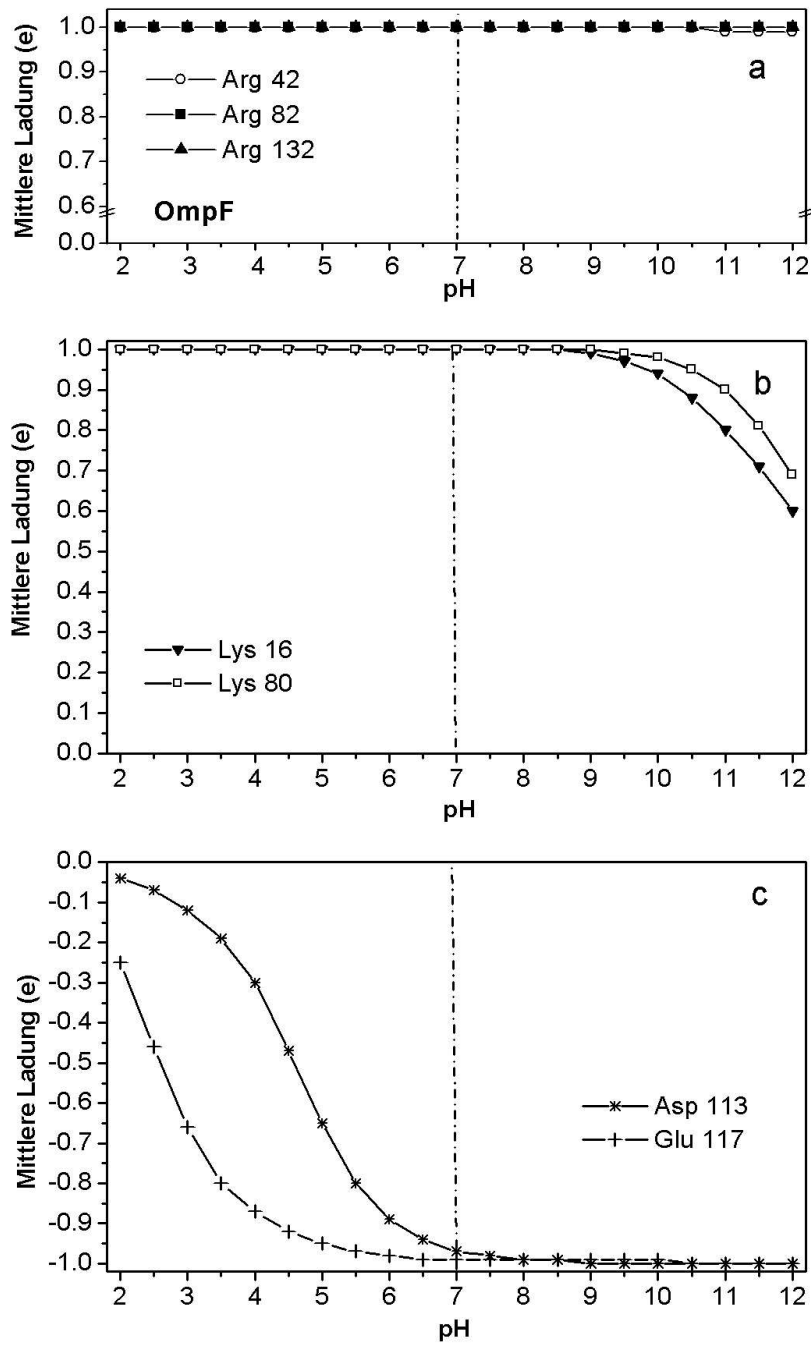


Abbildung 15: Titrationskurven der ionisierbaren Gruppen in der Konstriktionszone von OmpF. (A) Der Arginin-Cluster bleibt vollständig geladen im Bereich pH = 2 bis pH = 12. (B) Weitere Basen der Konstriktionszone. (C) Säuren auf der gegenüberliegenden Porenwand.

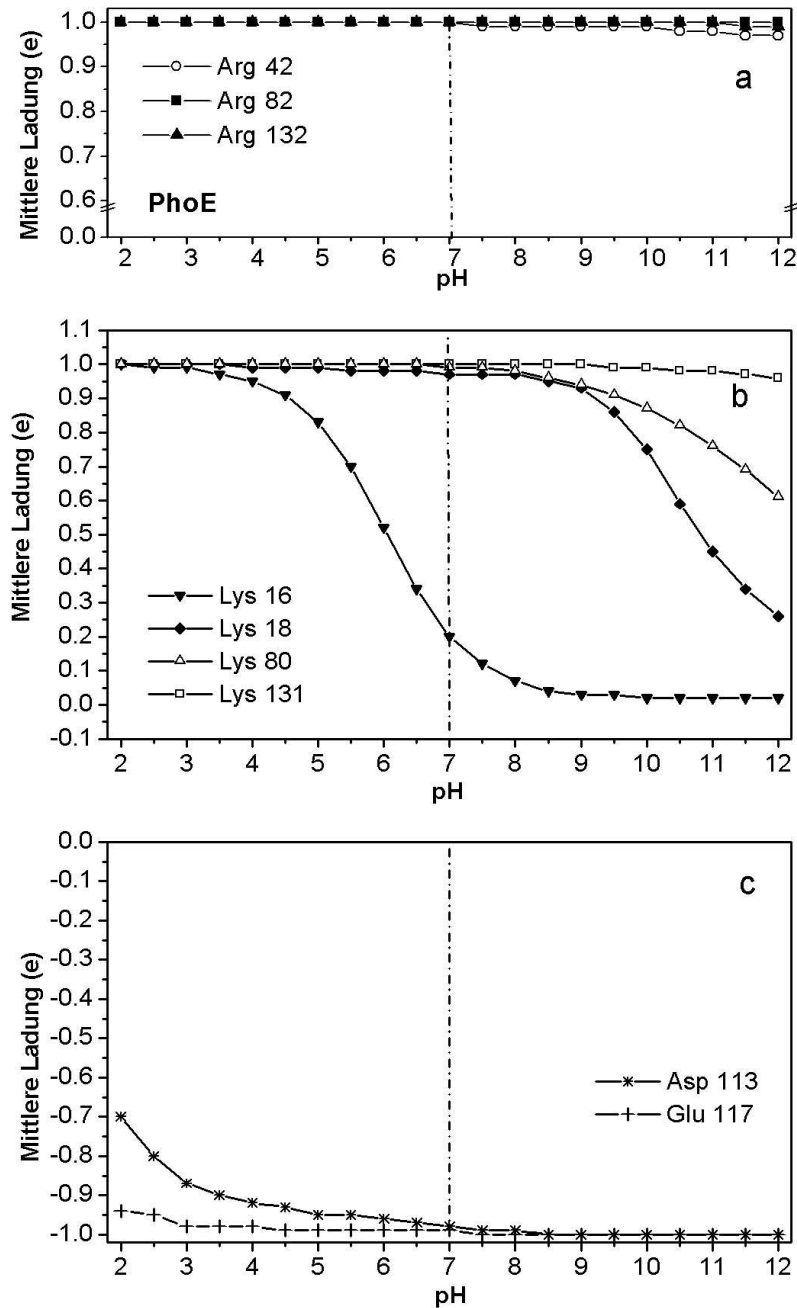


Abbildung 16: Titrationskurven der ionisierbaren Gruppen in der Konstriktionszone von PhoE. (A) Der Arginin-Cluster ist auch in PhoE zwischen pH = 2 und pH = 12 vollständig geladen. (B) Weitere Basen der Konstriktionszone. (C) Säuren auf der gegenüberliegenden Porenwand.

5.1.3 Der Arginin-Cluster in Porin-Aminosäuresequenzen

Wenn man davon ausgeht, daß die stabilisierende Rolle, die Glu 58 in Omp32 und die strukturell homologen Säuren in OmpF und PhoE für die Arginin-Cluster spielen, von genereller funktioneller Bedeutung für Porine sind, sollten sich entsprechende Anordnungen von Säuren und Basen auch in anderen Porinstrukturen wiederfinden.

Sequenz-Alignierungen von Porinen aus der β - und γ -Untergruppe der Proteobakterien ergaben die größten Übereinstimmungen in der Region zwischen β -Strang 2 und β -Strang 4. Sequenzen von Porinen der α -Untergruppe alignieren nicht gut mit ihnen und wurden hier nicht berücksichtigt. Abb. 17 zeigt, daß die Cluster-bildenden Gruppen Arg 38/Arg 42 und Arg 75/Arg 82 hochkonservierte Reste darstellen. Sie werden nur in wenigen Porinen durch Lysinreste ersetzt. Unter den negativen Resten ist ausschließlich Glu 58/Glu 62 invariabel in den Sequenzen und ist nicht durch Aspartat oder andere Aminosäuren ausgetauscht. Dies untermauert die wichtige Funktion der Glutamatreste für die Stabilisierung des Arginin-Clusters. Für Glu 71 gilt in Porinen der γ -Untergruppe der Proteobakterien eine analoge Schlußfolgerung, da auch diese Aminosäure durchgehend konserviert ist.

5.1.4 Die Titrationseigenschaften weiterer proteobakterieller Porine

Die Untersuchung der Titrationseigenschaften der übrigen strukturell bekannten Porine bot sich als naheliegende Erweiterung der bisherigen Studien an. Die Konservierung der RER-Triade in allen unspezifischen Porinen führte dabei zu der Erwartung, daß ähnliche Effekte gegenseitiger elektrostatischer Stabilisierung in diesen Strukturen auftreten. In den Porinen aus *Rhodobacter capsulatus* und *Paracoccus denitrificans* aus der α -Untergruppe der Proteobakterien sind Aspartatgruppen in der Nähe des Arginin-Clusters so angeordnet, daß sie eine stabilisierende Rolle spielen könnten. Zusätzlich befinden sich in beiden Strukturen Tyrosin-Reste in Salzbrückendistanz zu Arg 30. An diesen Porinen, sowie zusätzlich an OmpK36 und dem Porin aus *Rhodobacter blasticus*, wurden Poisson-Boltzmann-Rechnungen durchgeführt.

5.1 Studien zu den elektrostatischen Eigenschaften von Porinen

Acc.No.	Porin	Species	AA No.	$\beta 2$	$\beta 3$	Loop 2	$\beta 4$	
Proteobacteria β group								
A38528	Omp32	<i>Delftia acidovorans</i> *	37	<u>S</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>F</u> <u>W</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>G</u> <u>E</u> <u>I</u> <u>F</u> <u>G</u> <u>D</u> <u>D</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>F</u> <u>N</u> <u>---</u> <u>F</u> <u>K</u> <u>R</u> <u>R</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>N</u>				
S16480	porin	<i>Bordetella pertussis</i>		<u>S</u> <u>R</u> <u>W</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>Q</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>F</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>F</u> <u>N</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>S</u> <u>A</u> <u>Q</u> <u>D</u> <u>G</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>---</u> <u>F</u> <u>G</u> <u>R</u> <u>Q</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>Q</u> <u>S</u> <u>E</u>				
I39570	ORF9	<i>Ralstonia eutropha</i>		<u>S</u> <u>R</u> <u>F</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>M</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>N</u> <u>G</u> <u>F</u> <u>D</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>Q</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>---</u> <u>F</u> <u>G</u> <u>R</u> <u>Q</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>V</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>N</u>				
JC6314	OpcP1	<i>Burkholderia cepacia</i>		<u>S</u> <u>R</u> <u>F</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>I</u> <u>F</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>F</u> <u>N</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>N</u> <u>G</u> <u>M</u> <u>---</u> <u>F</u> <u>N</u> <u>Q</u> <u>A</u> <u>F</u> <u>V</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>Q</u>				
AF051542	PorA	<i>Neisseria meningitidis</i>		<u>S</u> <u>F</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>F</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>D</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>W</u> <u>W</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>Q</u> <u>D</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>Q</u> <u>W</u> <u>---</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>R</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>F</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>E</u>				
L19963	P.IA	<i>N. gonorrhoeae</i>		<u>S</u> <u>K</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>F</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>Q</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>I</u> <u>W</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>Q</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>Y</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>N</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>W</u> <u>---</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>Q</u> <u>S</u> <u>F</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>G</u>				
AF090822	P.I	<i>N. gonorrhoeae</i>		<u>S</u> <u>K</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>F</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>Q</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>I</u> <u>W</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>Q</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>Y</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>N</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>W</u> <u>---</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>Q</u> <u>S</u> <u>F</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>G</u>				
P30688	class3	<i>N. meningitidis</i>		<u>S</u> <u>K</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>F</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>Q</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>I</u> <u>W</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>Q</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>D</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>W</u> <u>---</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>Q</u> <u>S</u> <u>F</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>G</u>				
P18195	P.IB	<i>N. gonorrhoeae</i>		<u>S</u> <u>K</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>F</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>Q</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>W</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>Q</u> <u>Q</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>N</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>W</u> <u>---</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>Q</u> <u>S</u> <u>F</u> <u>V</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>G</u>				
P30692	P.IB	<i>N. sicca</i>		<u>S</u> <u>R</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>F</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>H</u> <u>E</u> <u>H</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>N</u> <u>N</u> <u>L</u> <u>N</u> <u>A</u> <u>I</u> <u>W</u> <u>Q</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>Q</u> <u>N</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>D</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>W</u> <u>---</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>R</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>F</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>G</u> <u>G</u>				
P30691	P.IB	<i>N. lactamica</i>		<u>S</u> <u>K</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>F</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>Q</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>F</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>I</u> <u>W</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>Q</u> <u>S</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>N</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>W</u> <u>---</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>Q</u> <u>S</u> <u>F</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>G</u>				
Y09309	porin	<i>N. polysaccharea</i>		<u>S</u> <u>K</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>F</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>Q</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>I</u> <u>W</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>Q</u> <u>S</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>N</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>W</u> <u>---</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>Q</u> <u>S</u> <u>F</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>G</u>				
AF121873	porin	<i>N. flava</i>		<u>S</u> <u>R</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>F</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>H</u> <u>E</u> <u>H</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>N</u> <u>N</u> <u>L</u> <u>N</u> <u>A</u> <u>I</u> <u>W</u> <u>Q</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>Q</u> <u>R</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>D</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>F</u> <u>---</u> <u>A</u> <u>N</u> <u>R</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>F</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>G</u> <u>G</u>				
AF121874	porin	<i>N. denitrificans</i>		<u>S</u> <u>R</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>F</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>H</u> <u>E</u> <u>H</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>N</u> <u>L</u> <u>N</u> <u>A</u> <u>I</u> <u>W</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>Q</u> <u>N</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>N</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>W</u> <u>---</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>R</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>F</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>G</u> <u>G</u>				
Y09311	porin	<i>N. flavescens</i>		<u>S</u> <u>R</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>F</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>H</u> <u>E</u> <u>H</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>N</u> <u>L</u> <u>N</u> <u>A</u> <u>I</u> <u>W</u> <u>Q</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>Q</u> <u>K</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>D</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>F</u> <u>---</u> <u>A</u> <u>N</u> <u>R</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>F</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>G</u> <u>G</u>				
AF121872	porin	<i>N. mucosa</i>		<u>S</u> <u>R</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>F</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>H</u> <u>E</u> <u>H</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>N</u> <u>A</u> <u>I</u> <u>W</u> <u>Q</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>Q</u> <u>N</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>D</u> <u>N</u> <u>G</u> <u>W</u> <u>---</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>R</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>F</u> <u>V</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>G</u> <u>G</u>				
BAA11106	porin	<i>Eikenella corrodens</i>		<u>S</u> <u>Y</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>F</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>I</u> <u>W</u> <u>Q</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>R</u> <u>V</u> <u>D</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>K</u> <u>D</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>P</u> <u>R</u> <u>G</u> <u>F</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>D</u> <u>S</u> <u>F</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>G</u> <u>G</u>				
Proteobacteria γ group								
P02931	OmpF	<i>Escherichia coli</i>	41	<u>A</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>F</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>E</u> <u>T</u> <u>Q</u> <u>I</u> <u>N</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>Y</u> <u>G</u> <u>Q</u> <u>W</u> <u>E</u> <u>Y</u> <u>N</u> <u>F</u> <u>O</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>N</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>D</u> <u>A</u> <u>Q</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>---</u> <u>K</u> <u>T</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>F</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>Y</u> <u>A</u>				
Q56110	OmpS1	<i>Salmonella typhi</i>		<u>A</u> <u>R</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>F</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>E</u> <u>T</u> <u>Q</u> <u>I</u> <u>N</u> <u>D</u> <u>M</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>Y</u> <u>G</u> <u>Q</u> <u>W</u> <u>E</u> <u>Y</u> <u>N</u> <u>I</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>N</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>E</u> <u>G</u> <u>E</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>N</u> <u>S</u> <u>---</u> <u>W</u> <u>T</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>F</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>F</u> <u>G</u>				
P77747	OmpN	<i>E. coli</i>		<u>A</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>F</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>E</u> <u>T</u> <u>Q</u> <u>I</u> <u>N</u> <u>D</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>Y</u> <u>G</u> <u>Q</u> <u>W</u> <u>E</u> <u>Y</u> <u>N</u> <u>I</u> <u>Q</u> <u>A</u> <u>N</u> <u>N</u> <u>T</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>K</u> <u>N</u> <u>Q</u> <u>S</u> <u>---</u> <u>W</u> <u>T</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>F</u> <u>A</u>				
A51339	PhoE	<i>E. coli</i>	41*	<u>I</u> <u>A</u> <u>R</u> <u>F</u> <u>G</u> <u>F</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>E</u> <u>T</u> <u>Q</u> <u>I</u> <u>N</u> <u>D</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>Y</u> <u>G</u> <u>R</u> <u>W</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>F</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>Q</u> <u>Q</u> <u>---</u> <u>K</u> <u>T</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>F</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>Y</u> <u>K</u>				
P30705	PhoE	<i>Salmonella typhimurium</i>		<u>V</u> <u>R</u> <u>F</u> <u>G</u> <u>F</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>E</u> <u>T</u> <u>Q</u> <u>I</u> <u>N</u> <u>D</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>Y</u> <u>G</u> <u>R</u> <u>W</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>F</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>N</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>Q</u> <u>Q</u> <u>---</u> <u>K</u> <u>T</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>F</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>K</u>				
Q56119	PhoE	<i>S. typhi</i>		<u>V</u> <u>R</u> <u>F</u> <u>G</u> <u>F</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>K</u> <u>T</u> <u>Q</u> <u>I</u> <u>N</u> <u>D</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>Y</u> <u>G</u> <u>R</u> <u>W</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>Q</u> <u>Q</u> <u>---</u> <u>K</u> <u>T</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>F</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>K</u>				
X68021	PhoE	<i>Citrobacter freundii</i>		<u>I</u> <u>A</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>F</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>E</u> <u>T</u> <u>Q</u> <u>I</u> <u>N</u> <u>D</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>Y</u> <u>G</u> <u>R</u> <u>W</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>F</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>S</u> <u>N</u> <u>Q</u> <u>Q</u> <u>---</u> <u>K</u> <u>T</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>F</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>K</u>				
Q47490	PhoE	<i>Enterobacter cloacae</i>		<u>V</u> <u>R</u> <u>F</u> <u>G</u> <u>F</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>E</u> <u>T</u> <u>Q</u> <u>I</u> <u>N</u> <u>D</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>Y</u> <u>G</u> <u>R</u> <u>W</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>F</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>Q</u> <u>Q</u> <u>---</u> <u>K</u> <u>T</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>F</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>K</u>				
P30704	PhoE	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		<u>V</u> <u>R</u> <u>F</u> <u>G</u> <u>I</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>E</u> <u>T</u> <u>Q</u> <u>I</u> <u>N</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>Y</u> <u>G</u> <u>R</u> <u>W</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>F</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>K</u> <u>T</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>Q</u> <u>Q</u> <u>---</u> <u>K</u> <u>T</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>F</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>V</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>K</u>				
Q01606	PhoE	<i>K. oxytoca</i>		<u>V</u> <u>R</u> <u>F</u> <u>G</u> <u>I</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>E</u> <u>T</u> <u>Q</u> <u>I</u> <u>N</u> <u>D</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>Y</u> <u>G</u> <u>R</u> <u>W</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>F</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>K</u> <u>T</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>Q</u> <u>Q</u> <u>---</u> <u>K</u> <u>T</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>F</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>V</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>K</u>				
D25647	NmpC	<i>E. coli</i>		<u>A</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>F</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>E</u> <u>T</u> <u>Q</u> <u>I</u> <u>N</u> <u>D</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>F</u> <u>G</u> <u>Q</u> <u>W</u> <u>E</u> <u>Y</u> <u>E</u> <u>F</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>R</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>Q</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>K</u> <u>D</u> <u>---</u> <u>K</u> <u>T</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>F</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>F</u> <u>G</u>				
A20867	OmpC	<i>E. coli</i>		<u>M</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>F</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>E</u> <u>T</u> <u>Q</u> <u>V</u> <u>T</u> <u>D</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>Y</u> <u>G</u> <u>Q</u> <u>W</u> <u>E</u> <u>Y</u> <u>Q</u> <u>I</u> <u>Q</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>S</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>N</u> <u>E</u> <u>N</u> <u>N</u> <u>S</u> <u>---</u> <u>W</u> <u>T</u> <u>R</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>F</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>F</u> <u>Q</u>				
JQ0119	OmpC	<i>S. typhi</i>		<u>M</u> <u>R</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>F</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>E</u> <u>T</u> <u>Q</u> <u>V</u> <u>N</u> <u>D</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>Y</u> <u>G</u> <u>Q</u> <u>W</u> <u>E</u> <u>Y</u> <u>Q</u> <u>I</u> <u>Q</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>Q</u> <u>T</u> <u>E</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>N</u> <u>D</u> <u>S</u> <u>---</u> <u>W</u> <u>T</u> <u>R</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>F</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>F</u> <u>A</u>				
A59139	OmpC	<i>S. typhimurium</i>		<u>M</u> <u>R</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>F</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>E</u> <u>T</u> <u>Q</u> <u>V</u> <u>N</u> <u>D</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>Y</u> <u>G</u> <u>Q</u> <u>W</u> <u>E</u> <u>Y</u> <u>Q</u> <u>I</u> <u>Q</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>Q</u> <u>T</u> <u>E</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>N</u> <u>D</u> <u>S</u> <u>---</u> <u>W</u> <u>T</u> <u>R</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>F</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>F</u> <u>A</u>				
I24960	OmpC	<i>Serratia marcescens</i>		<u>M</u> <u>R</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>G</u> <u>E</u> <u>T</u> <u>Q</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>Y</u> <u>G</u> <u>Q</u> <u>W</u> <u>E</u> <u>Y</u> <u>Q</u> <u>A</u> <u>N</u> <u>L</u> <u>N</u> <u>H</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>N</u> <u>Q</u> <u>D</u> <u>N</u> <u>K</u> <u>N</u> <u>---</u> <u>F</u> <u>T</u> <u>R</u> <u>Y</u> <u>G</u> <u>F</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>F</u> <u>G</u>				
O33507	OmpC	<i>Rahnella aquatilis</i>		<u>M</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>F</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>E</u> <u>T</u> <u>Q</u> <u>I</u> <u>N</u> <u>N</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>Y</u> <u>G</u> <u>E</u> <u>W</u> <u>E</u> <u>Y</u> <u>Q</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>N</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>A</u> <u>N</u> <u>N</u> <u>---</u> <u>F</u> <u>T</u> <u>R</u> <u>V</u> <u>G</u> <u>F</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>F</u> <u>G</u>				
T46993	ORF13	<i>Yersinia pestis</i>		<u>V</u> <u>R</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>F</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>E</u> <u>T</u> <u>K</u> <u>I</u> <u>N</u> <u>S</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>F</u> <u>G</u> <u>Q</u> <u>W</u> <u>E</u> <u>Y</u> <u>N</u> <u>I</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>N</u> <u>N</u> <u>T</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>Q</u> <u>G</u> <u>D</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>---</u> <u>K</u> <u>T</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>F</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>A</u>				
AJ011501	OmpK35	<i>K. pneumoniae</i>		<u>A</u> <u>R</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>E</u> <u>T</u> <u>Q</u> <u>I</u> <u>N</u> <u>D</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>Y</u> <u>G</u> <u>Q</u> <u>W</u> <u>E</u> <u>Y</u> <u>N</u> <u>M</u> <u>D</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>N</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>Q</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>---</u> <u>K</u> <u>T</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>F</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>G</u>				
S51104	OmpK36	<i>K. pneumoniae</i>	41	<u>M</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>V</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>E</u> <u>T</u> <u>Q</u> <u>I</u> <u>N</u> <u>D</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>Y</u> <u>G</u> <u>Q</u> <u>W</u> <u>E</u> <u>Y</u> <u>N</u> <u>V</u> <u>Q</u> <u>A</u> <u>N</u> <u>N</u> <u>T</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>Q</u> <u>A</u> <u>---</u> <u>W</u> <u>T</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>F</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>F</u> <u>G</u>				
AF336098	Omp36	<i>Enterobacter aerogenes</i>		<u>M</u> <u>R</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>V</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>E</u> <u>T</u> <u>Q</u> <u>I</u> <u>N</u> <u>D</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>Y</u> <u>G</u> <u>Q</u> <u>W</u> <u>E</u> <u>Y</u> <u>N</u> <u>V</u> <u>Q</u> <u>A</u> <u>N</u> <u>N</u> <u>T</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>Q</u> <u>A</u> <u>---</u> <u>W</u> <u>T</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>F</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>F</u> <u>G</u>				
A60121	OmpP2	<i>Haemophilus influenzae</i>		<u>S</u> <u>R</u> <u>F</u> <u>H</u> <u>I</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>H</u> <u>N</u> <u>F</u> <u>G</u> <u>D</u> <u>G</u> <u>F</u> <u>Y</u> <u>A</u> <u>Q</u> <u>G</u> <u>Y</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>T</u> <u>R</u> <u>F</u> <u>V</u> <u>T</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>N</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>N</u> <u>F</</u>				

In allen genannten Porinen ergab sich, daß der jeweilige Arginin-Cluster bei pH = 7 vollständig protoniert ist. Die destabilisierende Wechselwirkung zwischen den einzelnen Argininen wird in allen Fällen durch die Interaktion mit den hinter den Cluster verborgen liegenden Säuren kompensiert.

OmpK36 ist OmpF in hohem Maße ähnlich und gehört zu der Homologiegruppe in Abb. 17. Die Architektur des erweiterten Arginin-Clusters besteht in OmpK36 aus den Aminosäuren Arg 42, Arg 82, Arg 132, Glu 62 und Glu 71 vom benachbarten Monomer². So wurde auch hier eine Stabilisierung der Ladungen über den gesamten untersuchten pH-Bereich von 2 – 12 gefunden. Die Wechselwirkungsenergie zwischen Arg 42 und Glu 62 beträgt 5,3 kcal/mol, die zwischen Arg 132 und Glu 71 der nächsten Untereinheit 9,2 kcal/mol.

Der Cluster im Porin aus *R. capsulatus* wird durch Arg 9, Arg 24 und Arg 26 gebildet (siehe Abb. 18). In dieser Struktur stellt Asp 7 den bedeutendsten stabilisierenden Faktor dar. Asp 7 wechselwirkt dabei hauptsächlich mit dem flankierenden Arg 26 (-9,2 kcal/mol) und weniger mit dem zentral gelegenen Arg 24 (-1,6 kcal/mol). In der Konstriktionszone des Porins aus *R. blasticus* befinden sich vier eng benachbarte Argininingruppen (Arg 9, Arg 30, Arg 32 und Arg 52). Arg 30 wird dabei von Asp 56 und Tyr 7 flankiert.

Es stellte sich hier die Frage, ob der pK_a -Wert des vergleichsweise schwach sauren Tyrosins durch die Proteinumgebung ausreichend weit verschoben wird, so daß eine Salzbrücke mit Arg 30 zustandekommt. Nach den hier durchgeführten Rechnungen verbleiben die vier Argininingruppen bis pH = 12 im protonierten Zustand. Der wesentliche Beitrag zur Ladungsstabilisierung wird dabei von Asp 56 geleistet, das eine Salzbrücke mit Arg 30 bildet (Wechselwirkungsenergie 5,5 kcal/mol). Dagegen ist Tyr 7 nicht ionisiert. Die günstige Interaktion mit den vier Argininresten wird durch die hohe Desolvatationsenergie aufgrund der verborgenen Lage im Protein ausgeglichen.

Analoge Ergebnisse wurden für den Fall des Porins aus *P. denitrificans* erzielt. Auch hier besteht der Arginin-Cluster aus vier Gruppen (Arg 29, Arg 31, Arg 49, Arg 51).

²Ähnlich dem Fall in PhoE handelt es sich hier um die wahren Sequenzpositionen Arg 37, Arg 75 und Arg 125.

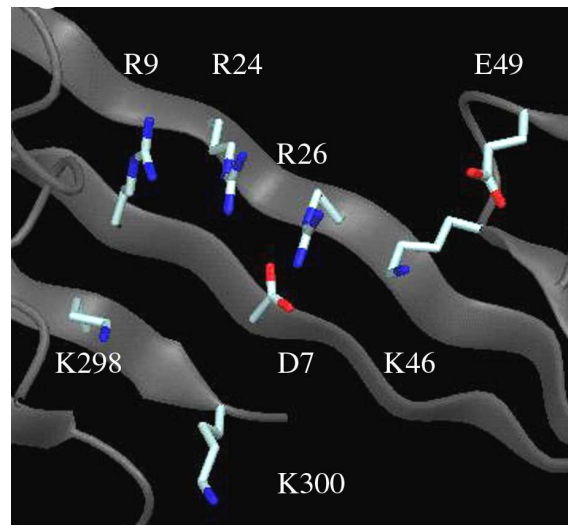


Abbildung 18: Architektur des Ladungs-Clusters im Porin aus *Rhodobacter capsulatus*. Asp 7 wechselwirkt mit Arg 26 des Arginin-Clusters. Dies stellt ein funktionelles Äquivalent zur Salzbrücke zwischen Glu 58 und Arg 75 in Omp32 bzw. Glu62 und Arg 82 in OmpF und PhoE dar. Aus Zachariae *et al.* (2002).

Er wird durch Asp 55 stabilisiert (Salzbrücke zu Arg 29, Wechselwirkungsenergie: 6,7 kcal/mol), während Tyr 7 protoniert ist und keinen stabilisierenden Beitrag in Form einer Salzbrücke leistet.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser elektrostatischen Studie, daß alle strukturell bekannten Porine eine stark geladene Konstriktionszone besitzen, da insbesondere der in allen diesen Strukturen vorhandene Arginin-Cluster bei pH = 7 vollständig protoniert ist. In Omp32 führt vor allem diese Tatsache zu einem deutlich positiven Potential in der gesamten Pore, während bei den anderen Porinen der dipolare Charakter der Konstriktionszone erhöht ist. Die Stabilisierung dieses Clusters erfolgt in allen Fällen über Salzbrücken mit nicht-solvensexponierten sauren Resten, die im Falle von Omp32 keinen Einfluß auf das positive elektrostatische Feld in der Pore besitzen.

5.2 Poisson-Nernst-Planck-Rechnungen an Modellkanälen

Eine den Poisson-Boltzmann-Elektrostatikrechnungen verwandte Weiterentwicklung auf dem Gebiet der Kontinuumrechnungen ist die Poisson-Nernst-Planck-Methode zur Berechnung der Elektrodifusion von Ionen in Kanalstrukturen. Die eindimensionale Nernst-Planck-Methode wird seit langem zur Betrachtung einfacher zylinderförmiger Membrankanal-Modelle verwendet (siehe Eisenberg, 1999; Hille, 1992). Der dreidimensionale Poisson-Nernst-Planck-Algorithmus (PNP) von Kurnikova *et al.* (1999; siehe Abschnitt 3.2) stellt eine deutliche Verbesserung dieser Technik dar. Trotzdem leidet die PNP-Methode unter einer gewissen Schwäche, wenn enge Kanalstrukturen betrachtet werden sollen, da sie – als Kontinuum-Methode – die spezifischen Wechselwirkungen der Ionen mit der Kanalwand nicht berücksichtigt und der Kanal starr ist. Aufgrund der Besonderheit der Geometrie von Omp32, das eine ungewöhnlich enge Konstriktionszone besitzt, spielen Randeffekte in der Pore erwartungsgemäß eine große Rolle. Eine Verbesserung dieser Methode wurde für die vorliegende Arbeit in enger Kooperation mit Dr. Andrey Karshikoff und Dr. Assen Koumanov vom Karolinska Institut in Huddinge bei Stockholm, Schweden, entwickelt (Koumanov *et al.*, 2003). In dem neuen Algorithmus wird der endlichen Ausdehnung durch den Kanal wandernder Ionen und ihrer Wechselwirkung mit dem Kanal in Form von Desolvationsenergie Rechnung getragen.

Nach der Implementierung dieses Rechenschemas erfolgten Testrechnungen an Modellkanälen. Die Einflüsse der Desolvation auf die Ergebnisse der PNP-Rechnungen traten hierbei deutlich hervor und konnten unter verschiedenen Bedingungen illustriert werden. Für die PNP-Rechnungen wurden Porenmodelle in Form eines Zylinders, eines Doppeltrichters und eines Einfachtrichters verwendet. Zur primären Validierung des entwickelten PNP-Algorithmus wurden zunächst Rechnungen an Kanälen ohne zusätzliche permanente Ladungsverteilung durchgeführt.

Die Auswirkung der Vernachlässigung von Desolvationseffekten stellte sich als immens heraus. Die größten Differenzen ergaben sich hierbei für den zylindrischen Kanal, der den kontinuierlich geringsten Querschnitt besitzt. Die Ionenkonzentrationen sind in der Mitte des Kanals um einen Faktor von 1,5 – 4 geringer als

diejenigen, die ohne Desolvatationsenergie berechnet wurden (für eine Elektrolyt-Ionenstärke von $I = 10$ mM und eine transmembrane Potentialdifferenz von $V' - V'' = 100$ mV). Am Rand der für Ionen zugänglichen Grenzfläche, also an den Kanalwänden, steigt dieser Faktor auf 5 – 20 an. Besonders aufgrund der reduzierten Konzentrationen wurde so für die verschiedenen Kanalgeometrien eine Reduzierung des elektrischen Stroms, der durch die Kanalmodelle fließt, um die Faktoren 5,2 (Zylinder), 3,4 (Doppeltrichter) bzw. 1,9 (Trichter) bei Einbeziehung der Desolvationseffekte berechnet ($I = 10$ mM, $V' - V'' = 100$ mV). Parallel zum Porenquerschnitt nehmen die Ionenkonzentrationen vom Zentrum zum Kanalrand ab und erreichen ihr Minimum an der Grenze des ionenzugänglichen Volumens.

Der Vergleich mit Strom-Spannungskurven gehört zu den wenigen Möglichkeiten, theoretische Modelle für Ionenkanäle an experimentellen Daten zu validieren. Für das Doppeltrichter-Kanalmodell, das der Porin-Geometrie am nächsten kommt, wurden Strom-Spannungs-Eigenschaften am neutralen Kanal und mit einer positiven Ladung an zwei verschiedenen Positionen in der Pore berechnet. Die Ergebnisse sind in Abb. 19 dargestellt.

Die Strom-Spannungs-Kurve des neutralen Kanalmodells ist symmetrisch und fast linear. Der Strom nimmt leicht mit steigender Transmembranspannung zu. Der Anteil von positiven und negativen Ladungen am Gesamtstrom ist erwartungsgemäß gleich hoch. Führt man in analoger Form wie im Zylindermodell eine Ladung um die Kanalmitte bei $z = 0$ Å ein, so steigt der Gesamtstrom durch den Doppeltrichterkanal bei gegebener Spannung an. Gleichzeitig zeigen sich zu hohen Spannungen hin Sättigungseffekte des Stroms in einer Abflachung der Kurve. Die Kurve bleibt jedoch symmetrisch zum Nullpunkt. Asymmetrien treten dann auf, wenn man die Ladung von der Porenmitte verschiebt. Die maximale Abweichung von symmetrischen Kurven wurde bei Verschiebung der Ladungsverteilung hin zu $z = 9$ Å erhalten. Der Beitrag der Kationen zum Stromfluß ist in beiden positiv geladenen Poren vernachlässigbar gering.

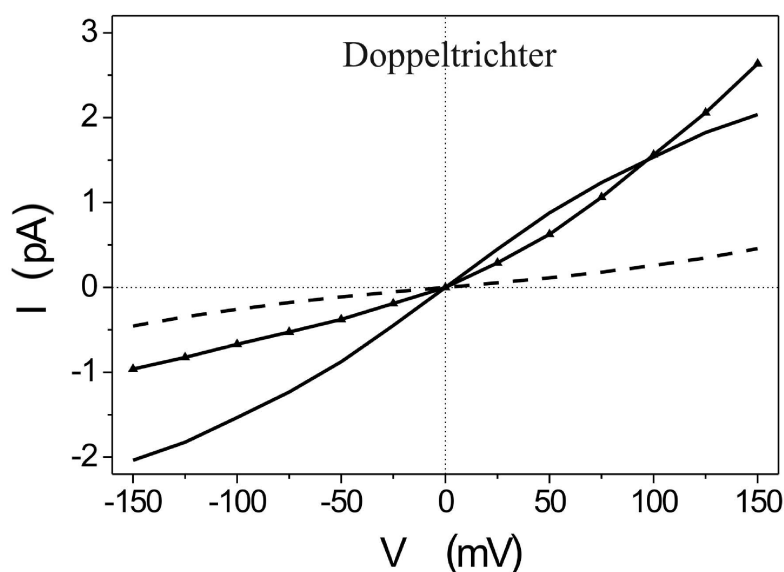


Abbildung 19: Berechnete Strom-Spannungs-Charakteristik eines Doppeltrichter-Modellkanals mit verschiedenen Ladungsverteilungen, neutral (gestrichelte Linie), $1e$ Ladung entlang des Kanalcentrums (durchgezogene Linie), $1e$ Ladung bei $z = 9 \text{ \AA}$ (durchgezogene Linie mit Dreiecken). Die Simulationen erfolgten bei 10 mM Elektrolyt-Ionenkonzentration.

Die Ergebnisse haben Relevanz für Omp32, das eine ähnliche Geometrie und ein von der Kanalengstelle verschobenes elektrostatisches Potentialminimum besitzt (vgl. Abschnitt 5.1.1). Asymmetrische und nicht-lineare Strom-Spannungs-Abhängigkeiten wurden im Experiment für Omp32 nachgewiesen (siehe Abb. 5).

Allerdings zeigten die im Verlauf der Arbeit durchgeführten Moleküldynamik-Simulationen (siehe Abschnitt 5.3), daß die Dynamik der Aminosäureseitenketten der Konstriktionszone und ihre Wechselwirkung mit den Ionen eine essentielle Bedeutung für die Anionentranslokation in Omp32 hat.

Diese deutlichen Ergebnisse stellten die Anwendbarkeit des PNP-Ansatzes zur Behandlung des Ionenflusses in Omp32 erheblich in Frage, da dort ein starres Proteinmodell eingesetzt wird und eine Kontinuum-Methode sehr starke Wechselwirkungen auf atomarer Basis nicht darstellen kann (Eisenberg *et al.*, 1995). Das PNP-Modell wurde deshalb – als zu grob vereinfachend für Omp32 – nicht eingesetzt.

5.3 Moleküldynamik-Studien zur Anionentranslokation in Omp32

Um die Struktur-Funktions-Beziehungen des Omp32-Kanals aufzuklären, erfolgten Moleküldynamik-Simulationen der Bewegung von Chlorid-Ionen in der Pore von Omp32. Die berechnete Ladungssituation in der Konstriktionszone (siehe Abschnitt 5.1.1 und die – verglichen mit OmpF (siehe Abb. 20) – stärkere Orientierung des Arginin-Clusters von Omp32 in Richtung der Porenlängsachse, ließen einen Unterschied in den Eigenschaften des Ionentransfers bezogen auf das bislang einzige mit theoretischen Modellrechnungen untersuchte unspezifische Porin OmpF erwarten.

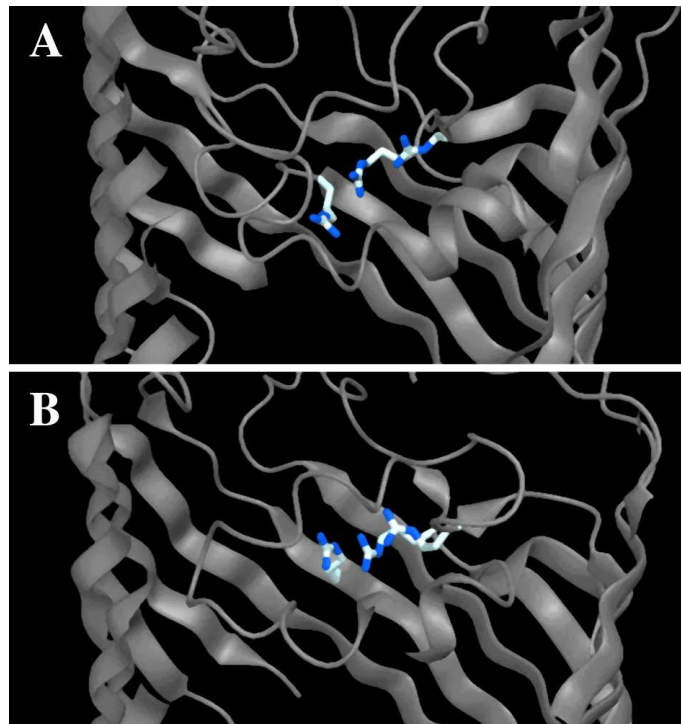


Abbildung 20: Orientierung und Position des Arginin-Clusters in Omp32 (A) und OmpF (B). Deutlich wird der größere Anteil der Cluster-Orientierung entlang der Porenachse in Omp32. Dies hat bedeutende Auswirkungen auf den Mechanismus der Ionenleitung. Aus Zachariae *et al.* (2003).

Omp32 ist stark anionenselektiv und niedrige Ionenkonzentrationen sind für physiologische Verhältnisse typisch. Infolgedessen wurden ein bis zwei Chlorid-Ionen im Kanal von Omp32 simuliert. Aus den Ergebnissen der Elektrostatikrechnungen wurden mit der Methode von Dieckmann *et al.* (1999) Verteilungskoeffizienten von ca. 4 und 0,02 für Chlorid- und Kalium-Ionen relativ zur Konzentration der Lösung berechnet. Somit entspricht ein System mit ein bis zwei Chlorid-Ionen einer Elektrolyt-Ionenkonzentration von 25 – 50 mM in der Lösung.

Durch die Wahl eines reduzierten Simulationssystems (siehe Abschnitt 4.3) sollte es möglich werden, die Simulationen wiederholbar zu machen und insgesamt über lange Zeit, d.h. einige zehn Nanosekunden, auszudehnen. Dabei stellte sich auch die Frage, wie sich verschiedene äußere Verhältnisse wie elektrische Felder, unterschiedliche Ausgangspunkte der Ionen und die Einwirkung von Zugkräften auf die Ionen auswirken. Zusätzlich sollte ein Energieprofil der Chlorid-Translokation durch den inneren Kanal von Omp32 erstellt werden.

5.3.1 Simulationen mit einem Anion

Extrazellulärer Eingangsbereich

Insgesamt 10 Simulationen gingen von Startgeometrien aus, in denen Chlorid-Ionen an verschiedene Positionen im extrazellulären Eingangsbereich von Omp32 plaziert wurden. In allen diesen Simulationen konnte die Einhaltung eines klar definierten Pfades beobachtet werden, der die Cl⁻-Ionen in Richtung der Konstriktionszone leitet. Dieser Pfad schließt zunächst die Koordination des Anions mit den Amid-Stickstoffatomen der Seitenketten von Asn 130 und Gln 306 im extrazellulären Trichter ein. Eine feste Bindung zu diesen Gruppen hätte bedeutet, daß der Transfer zu den Gruppen der Konstriktionszone stark verlangsamt worden wäre. Die schwächere, temporäre Wechselwirkung mit den zwei polaren Gruppen verhindert eine längerwährende Immobilisierung und sichert eine schnelle Weiterbewegung des Ions.

Die erste Bindung auf dem Weg in die Engstelle des Kanals erfolgte üblicherweise mit der Seitenkette von Lys 308 nach nur ca. 100 – 500 ps. (siehe Abb. 21 und 22), wobei das Chlorid-Ion für etwa 0,2 – 0,7 ns im gebundenen Zustand verbleibt.

Die Flexibilität der langen Seitenkette, verbunden mit der thermischen Bewegung, sorgt dabei dafür, daß die Bewegung des Cl^- -Ions trotz seiner Bindung an die Lysin-Gruppe in einem z -Bereich von ca. 3 – 7 Å stattfinden (Abb. 21 A–B und 21 E–F) und sich somit mehrfach temporär an die Gruppe Arg 133 annähern kann. Dies ist – von der extrazellulären Seite aus gesehen – die erste Base des Arginin-Clusters in der Konstriktionszone von Omp32. Im allgemeinen führt eine dieser Annäherungen an Arg 133 zu einem Übergang auf diese Gruppe und einen Zustand der Bindung an Arg 133. Dieser *Crossover*-Schritt findet teilweise rechtwinklig zur Porenachse statt. Er kann als erster bedeutender Teilschritt der Anionentranslokation in Omp32 betrachtet werden.

Konstriktionszone

In Abb. 22 sind repräsentative Momentaufnahmen einer charakteristischen Trajektorie der Ionenbewegung in der Nähe der Konstriktionszone dargestellt. Beginnend mit dem ersten gebundenen Zustand an Arg 133 ist es möglich, eine Reihe von Bindungsstellen an den Arginin-Cluster zu benennen. Wenn man Lys 308 und zwei Argininreste auf der periplasmatischen Seite außerhalb der Konstriktionszone einschließt, kann man sich diese Bindungsstellen als Stationen einer Leiter aus basischen Gruppen vorstellen, auf denen das Anion durch den engen Bereich der Konstriktionszone von Omp32 gereicht wird.

An den Bindungsstellen im Bereich des zentralen Arginin-Clusters wird das Chlorid-Ion durch die terminalen Stickstoffatome der Guanidiniumgruppen eines oder zweier der benachbarten Arginine koordiniert. Die beobachteten Bindungsstellen des Ions befinden sich bei Arg 133, zwischen Arg 133 und Arg 75 (gemeinsam koordiniert), an Arg 75 (zusammen mit einer Wechselwirkung mit den Nachbargruppen) und an Arg 38.

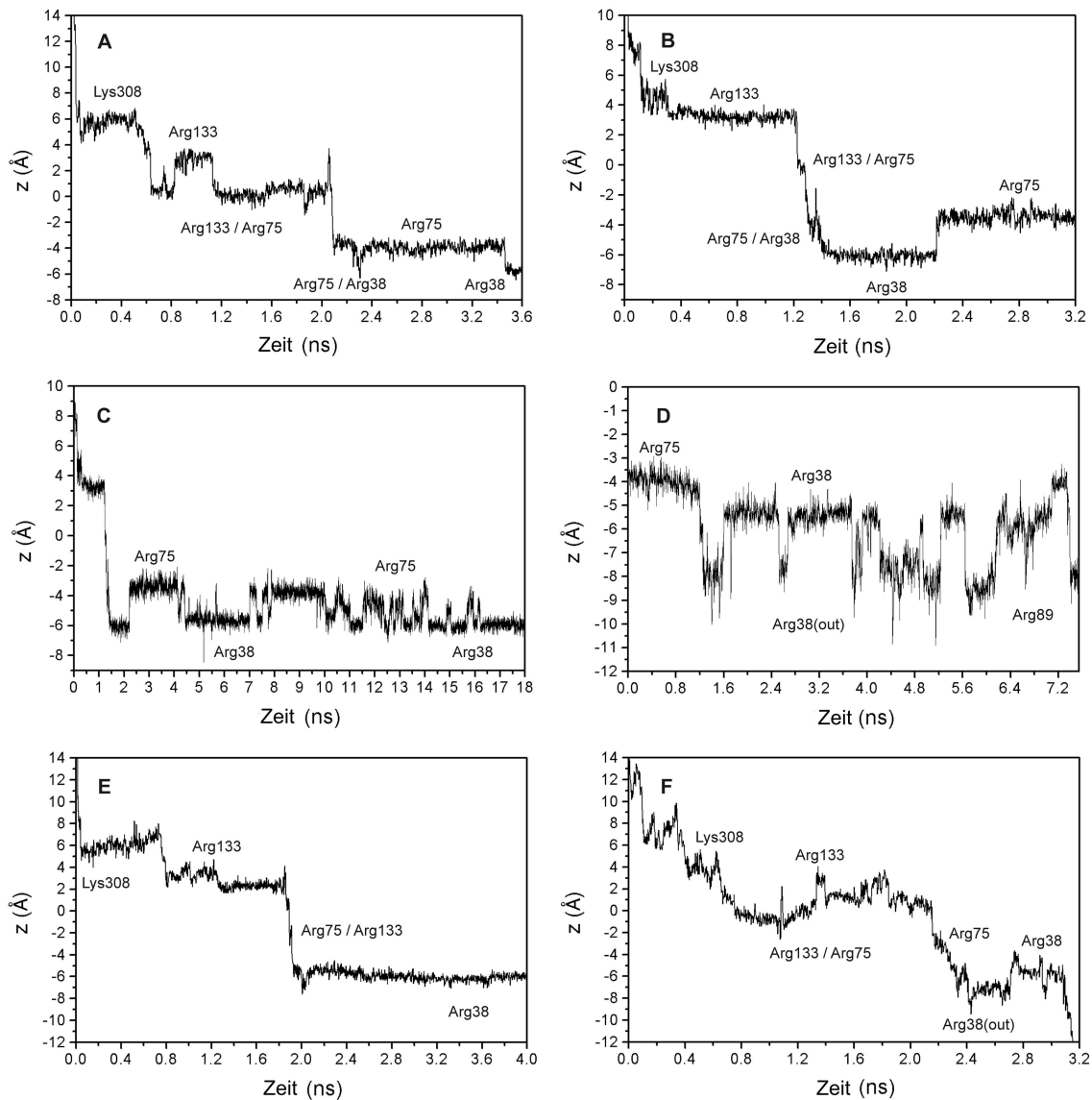


Abbildung 21: Trajektorien der Chlorid-Ionen im Kanal von Omp32. In (A) und (B) wird die Immobilisierung des Anions an spezifischen Bindungsstellen entlang des Basen-Clusters deutlich. (C) stellt eine längere Zeitskala der Simulation aus (B) dar. Das Anion wechselt zwischen zwei verschiedenen Bindungsstellen an Arg 38 und Arg 75 während nahezu 17 ns. Dort befindet sich die bevorzugte Bindungsregion für Chlorid-Ionen im Kanal von Omp32. (D) Translokation von der periplasmatischen Seite von Arg 38 zu Arg 89. (E) Trajektorie eines Chlorid-Ions bei Anlegen eines transmembranen elektrischen Feldes entsprechend 100 mV, das das Chlorid-Ion in Richtung des Periplasmas zieht. (F) Trajektorie eines schnellen Chlorid-Transfers durch die Konstriktionszone von der exoplasmatischen zur periplasmatischen Seite.

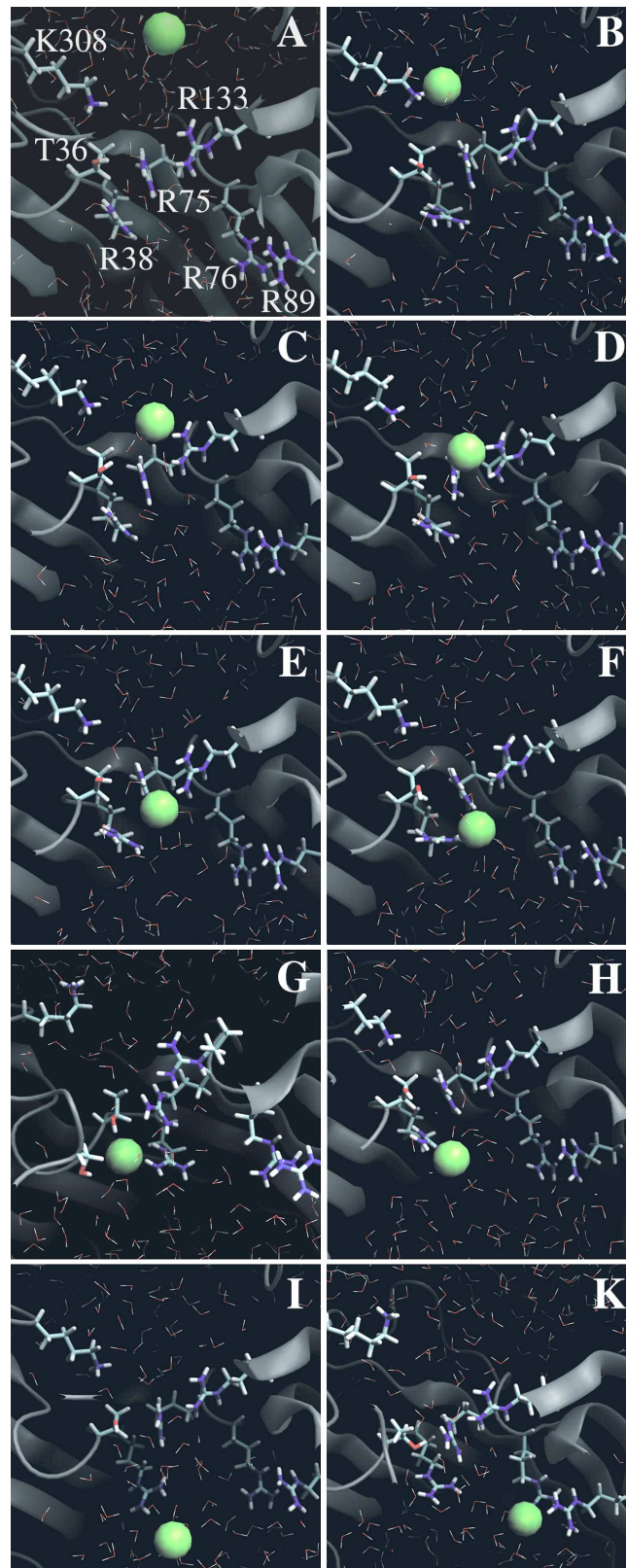
Wie aus den Abbildungen 21 A–F und 22 klar hervorgeht, sind diese gebundenen Zustände deutlich voneinander zu unterscheiden. Die Lebensdauer der Bindungszustände erreicht zum Teil den Nanosekundenbereich. Verläßt das Chlorid-Ion eine Bindungsstelle, so ist damit immer eine neue Bindung an die nächste Position auf der Basen-Leiter verbunden. Die spezifische Lebensdauer der gebundenen Zustände scheint dabei von zufälligen thermischen Fluktuationen bestimmt zu sein, bei denen große Abweichungen von der mittleren Lebensdauer vorkommen.

Es ist eine deutliche Tendenz des Anions zu beobachten, an den Resten Arg 75 und Arg 38 zu binden. Übergänge von Arg 133 zu Lys 308 sowie von Arg 75 / Arg 133 zu einer Bindung an Arg 133 können allerdings ebenfalls beobachtet werden. Dabei waren die erreichten Bindungsstellen nicht von denen zu unterscheiden, die durch Transfer in die entgegengesetzte Richtung besetzt wurden.

Eine bedeutende Beobachtung war, daß die Ionen-Übergänge unweigerlich mit Bewegungen der Arginin-Seitenketten verbunden waren. Der Transfer des Anions von einer Base zur nächsten wird durch die Dynamik der Arginine erleichtert und beschleunigt. Somit ist ein Zusammenspiel der Ionen- und Seitenkettendynamik für die Funktion des Anionentransfermechanismus in Omp32 verantwortlich.

Wie schon in früheren Moleküldynamik-Simulationen an OmpF beobachtet wurde (Tieleman und Berendsen, 1998; Im und Roux, 2002b), reduziert sich in der dynamischen Betrachtung die minimale Porenquerschnittsfläche im Vergleich zur Kristallstruktur. In der vorliegenden Arbeit konnte eine deutliche Verringerung von 25 \AA^2 auf $12 \pm 3 \text{ \AA}^2$ festgestellt werden. Die Stelle geringsten Querschnitts liegt dabei auf einer z -Koordinate von $-0,7 \text{ \AA}$.

Abbildung 22: (Nächste Seite) Transferpfad der Chlorid-Ionen. Ansichten von Momentaufnahmen der Trajektorie einer Chlorid-Translokation entlang der "Basenleiter". (A) Das Chlorid-Ion nähert sich Lys 308. (B) Es bindet an Lys 308. (C) Transfer zu Arg 133. (D) Gemeinsame Bindung durch Arg 38 und Arg 75. (E) An Arg 75 gebundenes Chlorid-Ion. (G) Koordination des Anions am bevorzugten Bindungsbereich, Atome von Arg 38, Arg 75, Thr 36 und Ser 108 umfassend. (H,I) Dynamik der Seitenkette von Arg 38, die das Chlorid-Ion in den periplasmatischen Eingangsbereich von Omp32 befördert. (K) Chlorid-Bindungsstelle an Arg 89. Aus Zachariae *et al.* (2003).



Aufgrund der hohen Dichte positiver Ladungen in der Konstriktionszone tendiert das Chlorid-Ion dazu, diesen Bereich während ausgedehnter Zeitabschnitte der Simulationen nicht zu verlassen. Dies ist insbesondere in Abb. 21 C zu erkennen. Die Trajektorie wurde dem längsten Simulationslauf entnommen. Das Chlorid-Ion wechselt hier für einen Zeitraum von annähernd 17 ns zwischen zwei Bindungsstellen an Arg 75 und Arg 38. Diese Kanalregion wurde ebenfalls als Ort des elektrostatischen Potentialminimums in den vorher erfolgten Poisson-Boltzmann-Rechnungen bestimmt (siehe Abschnitt 5.1.1). Aus den Moleküldynamik-Simulationen geht hervor, daß die Immobilisierung des Chlorid-Ions in dieser Zone neben den Argininbindungen durch weitere Kontakte mit dem Sauerstoffatom der Seitenkette und dem *Backbone*-Stickstoffatom von Thr 36 verstärkt wird. Eine kleinere zusätzliche Rolle spielt zudem die Wechselwirkung mit der Hydroxy-Gruppe von Ser 108.

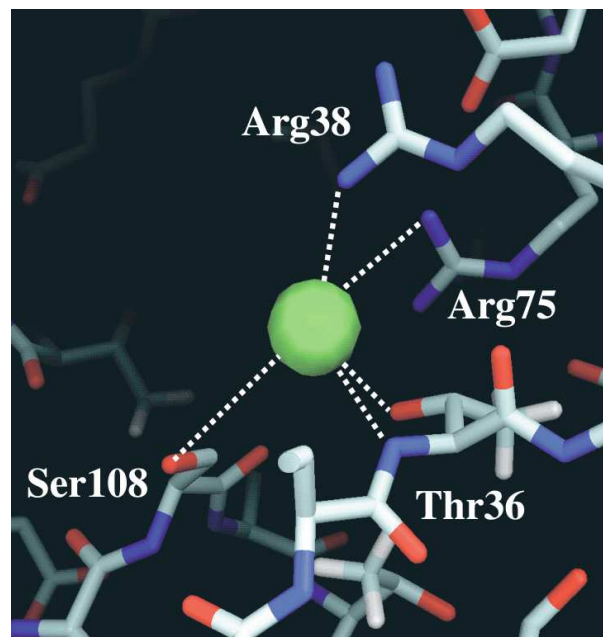


Abbildung 23: Bevorzugte Bindestelle für die Chlorid-Ionen in der Pore von Omp32 nahe $z = -6$ Å. Die Distanzen des Chlorid-Ions zu seinen Proteinkontakten betragen je: 3,1 Å (Arg 38 N_{η_2}); 3,1 Å (Thr 36 O_{γ}); 4,2 Å (Thr 36 N); 4,3 Å (Arg 75 N_{η_1}). Aus Zachariae *et al.* (2003).

In dieser Region besitzt das Chlorid-Ion einen höheren Grad an Freiheit in bezug auf die Bewegung in der xy -Ebene, wobei die z -Koordinate fast konstant bleibt. Die Pore erweitert sich hier von der Konstriktionszone zum periplasmatischen Eingangstrichter. Die dem Solvens zugängliche Fläche erhöht sich dabei auf ca. $80 - 150 \text{ \AA}^2$, so daß die Anzahl der Wassermoleküle, die das Chlorid-Ion solvatisieren, im Vergleich zum Minimalwert ansteigt. Die minimale Anzahl solvatisierender Wassermoleküle (~ 3) findet man zwischen Arg 133 und Arg 75. In Abb. 24 ist die bevorzugte Bindungsregion durch ein deutlich hervortretendes Maximum der Gesamtkoordinationszahl des Chlorid-Ions gekennzeichnet.

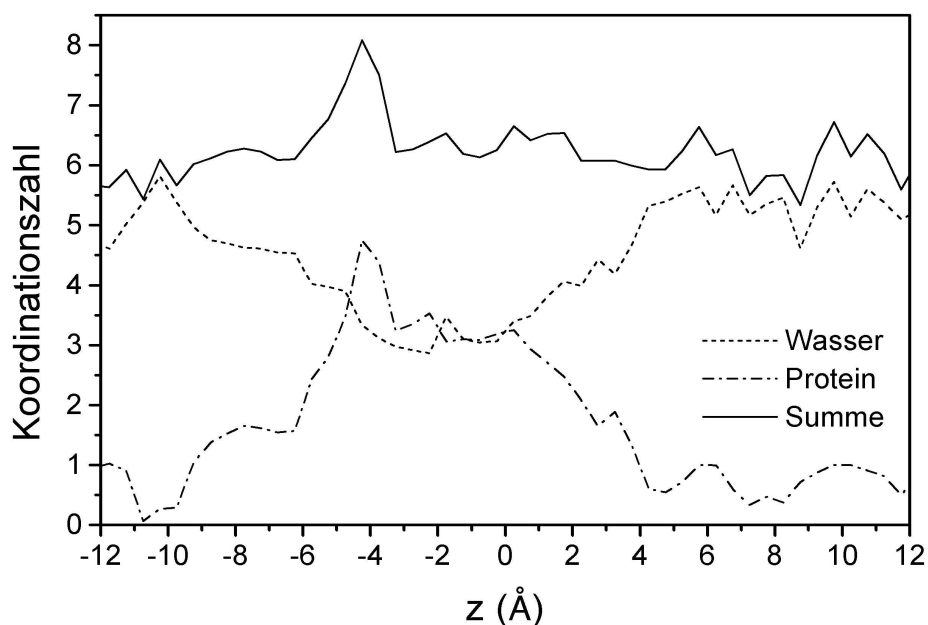


Abbildung 24: Koordinationszahl des Chlorid-Ions im inneren Kanal von Omp32. Die durchgezogene Linie stellt die Summenkurve der Wasserkontakte (gestrichelt) und Proteinkontakte (strichpunktiert) dar. Im Bereich der Konstriktionszone werden Wasser- gegen Proteinkontakte ausgetauscht. Die Gesamtzahl der koordinierenden Atome bleibt dabei gleich, mit Ausnahme der bevorzugten Bindungsregion, die durch einen deutlichen *Peak* in der Koordinationszahl gekennzeichnet ist.

Dieser *Peak* läßt sich in erster Linie durch die große Zahl von Protein-Kontakten erklären. In allen anderen Kanalbereichen bleibt die Gesamtkoordinationszahl des Anions annähernd konstant. Die erste Hydratisierungshülle des Cl^- -Ions wird beim Durchgang durch die Konstriktionszone von sechs auf drei Wassermoleküle halbiert. Hierzu ist anzumerken, daß eine Koordinationszahl von 6 – 7 in experimentellen und theoretischen Arbeiten für Chlorid-Ionen in wässriger Lösung beschrieben wird (Ohtaki und Radnai, 1993). Im extrazellulären Eingangstrichterbereich wird im Durchschnitt nur ein Wassermolekül durch Koordinierung mit Asn 130 oder Gln 306 ersetzt, im periplasmatischen Bereich eines durch Ser 108. In der Strukturanalyse der Simulationsläufe wurde wiederholt beobachtet, daß die Kette von Wassermolekülen, die durch die Konstriktionszone reicht, häufig für längere Zeitabschnitte unterbrochen wird.

Translokation aus der Konstriktionszone

Der Prozeß, die Konstriktionszone zu verlassen, ist ein energetisch ungünstiger Schritt. Die elektrostatische Anziehung benachbarter Basen wirkt sich stark auf das Cl^- -Ion aus. Nichtsdestotrotz wurden in den Simulationen zwei mögliche Wege beobachtet, auf denen sich das Anion von dieser Region entfernen und weiter in den periplasmatischen Bereich vordringen kann (siehe Abb. 21 D und 22 I,K). Zum einen sind Übergänge von Arg 38 zu Arg 89 möglich. Arg 89 ist eine von zwei nebeneinanderliegenden Arginin-Gruppen, die sich in der Kristallstruktur ca. 11 Å von Arg 38 entfernt im periplasmatischen Trichter befinden. Der Transfer kann spontan stattfinden. Er wird durch die größere Flexibilität der Seitenkette von Arg 38 erleichtert. Die Dynamik von Arg 38 ist ausgeprägter als die anderer Basen aufgrund der Kanalgeometrie, die sich hier – wie oben beschrieben – von der engen Konstriktionszone in den Trichterbereich erweitert. Die *Root-Mean-Square*-Fluktuationen der Guanidinium-Gruppen unterscheiden sich beim Ionendurchgang deutlich (Arg 38: 1,29 Å; Arg 75: 0,74 Å).

Auf der anderen Seite kann diese erhöhte Beweglichkeit auch dazu beitragen, das Cl^- -Ion in Richtung Periplasma zu befördern. Im Anschluß an solche Bewegungen wurde mehrfach eine zumindest temporäre Diffusion des Cl^- -Ions in den Trichterbereich hinein beobachtet (Abb. 21 D).

Einer der Simulationsläufe zeigte einen relativ schnellen Transfer eines Chlorid-Ions von der exoplasmatischen Seite durch die Konstriktionszone zum periplasmatischen Trichter. Aufgrund geringerer Lebensdauern insbesondere der an Arg 75 und Arg 38 gebundenen Zustände erfolgte die Translokation des Anions durch die Konstriktionszone in weniger als 3 ns (siehe Abb. 21 F). Obwohl es aus der Aufzeichnung der z -Trajektorie weniger klar hervorgeht, trat das Muster der Bindung und Lösung von Bindungen des Anions an die spezifischen Basen und polaren Gruppen auch hier unverändert auf, und der Transferpfad war identisch mit dem oben beschriebenen.

Über alle Simulationen hinweg betragen die Bindungslängen zwischen Cl^- und seiner jeweiligen primären Partnerbase zwischen 3,0 und 3,7 Å. Der durchschnittliche Wert war hierbei 3,2 Å.

Periplasmatischer Eingangsbereich

Simulationen ausgehend von Chlorid-Positionen im periplasmatischen Eingangsbereich wurden ebenfalls durchgeführt. Ähnlich der Situation im extrazellulären Eingangsbereich wird die Bewegung des Anions hier von Kontakten mit ungeladenen polaren Gruppen dominiert. In diesem Fall stellten die Hydroxy-Gruppen von Ser 103 und Ser 108 die Koordinationstellen des Chlorid-Ions dar. Das Cl^- -Ion trat zunächst von Ser 103 zu Ser 108 über, von wo es schließlich die Konstriktionszone bei Arg 38 erreichte.

Auch hier ist zu erkennen, daß der Transfer zur Konstriktionszone offenbar nicht durch starke Wechselwirkungen mit den vorhandenen Basen im periplasmatischen Eingangstrichter verlangsamt wird. Die Interaktionen mit Ser 103 und Ser 108 führen nicht zu einer längerfristigen Immobilisierung des Chlorid-Ions an diesen Stellen.

Insgesamt konnte durch die MD-Simulationen mit einem Anion ein vollständig neuer Mechanismus der Ionenleitung in Kanälen entdeckt werden. Eine solch starke Wechselwirkung von Ionen mit den geladenen Gruppen der Porenwand und vor allem ihrer Dynamik wurde für Porine noch nicht beschrieben. Der Mechanismus der Ionenleitung in anderen Kanälen, z.B. dem KcsA-Kanal, beruht auf der Wechselwirkung mit partiellen Ladungen des vergleichsweise starren Protein-

Backbones. Der Ionen transfer entspricht somit keinem einfachen Diffusionsvorgang mehr, und die Bezeichnung unspezifischer Pore als reine Diffusionspore (Jap und Walian, 1996; Schulz, 1996) erscheint zumindest im Fall von Omp32 als fragwürdig.

5.3.2 Simulationen mit zwei Anionen und elektrischen Feldern

In drei Simulationen wurde ein weiteres Cl^- -Ion in den Kanal eingebracht, während das erste in der bevorzugten Bindungsregion der Konstriktionszone gebunden war. Diese Simulationen erfolgten, um den Einfluß zweier Anionen aufeinander im Kanal zu testen. Das zweite Ion bewegte sich jeweils – in Übereinstimmung mit den Simulationen eines einzelnen Anions – schnell in Richtung Konstriktionszone. Jedoch wurde hierbei beobachtet, daß es das erste Ion nicht aus seiner Bindungsstelle verdrängte. In Abb. 25 ist die Trajektorie des zweiten Cl^- -Ions aus der längsten Simulation mit zwei Anionen aufgezeichnet.

Aus ihr geht deutlich hervor, daß der Eintritt des zweiten Chlorid-Ions in die Konstriktionszone über lange Zeit (zunächst ca. 2,8 ns) verhindert wurde. Stattdessen verblieb es an Lys 308 ($z = 5 - 6 \text{ \AA}$) gebunden oder wechselte in Richtung Exoplasma zu Stellen über, an denen es mit den polaren Gruppen Asn 130 und Gln 306 assoziiert war ($z = 7 - 10 \text{ \AA}$). Nach 2,8 ns wurde es an Arg 133 gebunden. In der Folge wurde es aber nach nur ca. 250 ps wieder aus der Konstriktionszone abgestoßen und bewegte sich über ca. 9 \AA zurück in Richtung des extrazellulären Eingangstrichters zu den Gruppen Asn 130 bzw. Gln 306. In Anschluß wurde es erneut stabil von Lys 308 gebunden; ein weiterer Vorstoß in Richtung der Konstriktionszone blieb kurz und war reversibel (nach einer Zeit von 5,4 ns), da eine Bindung an Arg 133 nicht erreicht wurde.

Die Ergebnisse legen nahe, daß der Eintritt eines zweiten Ions verlangsamt oder inhibiert wird, wenn sich dort bereits ein Anion in gebundenem Zustand befindet. Das erste Ion muß die Konstriktionszone offensichtlich erst über einen der oben vorgestellten Mechanismen verlassen, bevor der Eintritt eines zweiten Anions möglich ist.

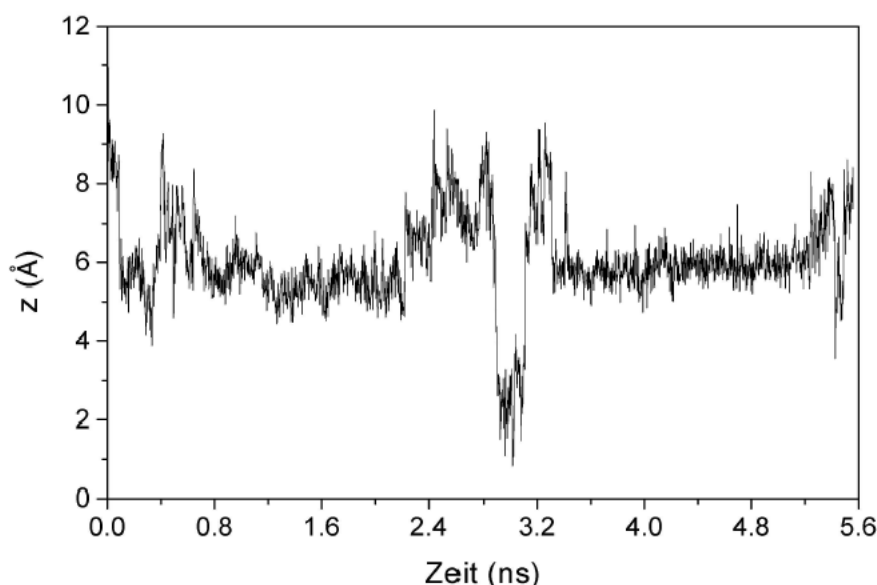


Abbildung 25: z -Trajektorie eines zweiten Cl^- -Ions im Kanal von Omp32, während das erste Anion in der bevorzugten Bindungsregion ($z = -4 - 6 \text{ \AA}$) gebunden ist. Die z -Region um 6 \AA entspricht einer Bindung des Cl^- -Ions an Lys 308. Bei $z = 2 \text{ \AA}$ wird es an Arg 133 gebunden. Bei $z = 8 - 10 \text{ \AA}$ ist das Anion an Asn 130 bzw. Gln 306 assoziiert. Besonders bemerkenswert ist die weite Abstoßung des Cl^- -Ions aus der Konstriktionszone nach ca. $3,1 \text{ ns}$. Eine Tendenz zum Eintritt in die Konstriktionszone ist insgesamt nur schwach zu beobachten.

Dieses Verhalten kann, neben der gegenseitigen Abstoßung der zwei Anionen, der verringerten Beweglichkeit der Seitenketten von Arg 75 und Arg 133 in bezug auf eine Annäherung an Lys 308 zugeschrieben werden, während sie vom ersten in der Konstriktion befindlichen Ion angezogen werden. Für die Leitfähigkeitsmessungen an Omp32 hat dies insofern Bedeutung, als daß eine Sättigung der relativen Leitfähigkeit bei höheren Ionenkonzentrationen damit sehr gut erklärt werden kann.

Um die Auswirkung eines elektrischen Feldes auf die Ionenbewegung zu untersuchen, erfolgten Simulationen unter Anwendung einer elektrischen Kraft auf alle partiellen bzw. integralen Ladungen im System. Dabei wurden Feldstärken von $0,6 - 2 \cdot 10^7 \text{ V/m}$, entsprechend einem transmembranen Potential von ca. $30 - 100 \text{ mV}$ mit beiden möglichen Polarisationsrichtungen simuliert. Wie aus Abb. 21

E hervorgeht, wurde das Muster der Chlorid-Ionenbewegung im Kanal dadurch nicht verändert. Der Ionentransferpfad blieb unverändert, gleichzeitig unterlag die Lebensdauer der einzelnen gebundenen Zustände keiner systematischen Veränderung bzw. Verringerung.

Aus dieser Beobachtung kann der Schluß gezogen werden, daß die Ergebnisse der Simulationen, die mehrheitlich ohne Anwendung eines äußeren elektrischen Feldes durchgeführt wurden, auch für die experimentellen Messungen an Omp32 Relevanz besitzen, bei denen eine Potentialdifferenz an die Membran angelegt ist. Allerdings können Effekte des Potentials, die auf langen Zeitskalen – über den Nanosekundenbereich hinaus – stattfinden, mit diesen Simulationsrechnungen derzeit nicht erfaßt und betrachtet werden.

5.3.3 *Potential-of-Mean-Force*-Profil der Ionentranslokation

Die bisherigen Beobachtungen eines definierten Anionentransferweges und offenbar thermisch aktivierter Übergänge legten eine Untersuchung der energetischen Verhältnisse der Translokation von Chlorid-Ionen durch die Konstriktionszone von Omp32 nahe. Dazu wurden Berechnungen der Freien Energie mit der *Umbrella-Sampling*-Technik (siehe Abschnitt 3.3.3) durchgeführt. Das erhaltene PMF-Profil entlang der Basen-Leiter von Omp32 ist in Abb. 26 dargestellt.

Hierin wird die Immobilisierung eines Chlorid-Ions an spezifischen Bindungsstellen entlang der Porenachse durch die besondere Form der Kurve der Freien Energie untermauert. Die Kurve zeigt eine Abfolge Freier-Energie-Minima, deren Positionen mit den Bindungsstellen übereinstimmen, die in den freien Simulationsläufen beobachtet wurden (siehe Abb. 21).

Die einzelnen Energieminima werden durch moderate bis kleine Energiebarrieren im Bereich von 5 – 1 kcal/mol voneinander getrennt. Die spezifische Höhe der Energieberge ist dabei richtungsabhängig. Lokale Minima entsprechen der Ionenbindung an Lys 308 ($z = 6 - 7 \text{ \AA}$), Arg 133 ($z = 3,5 \text{ \AA}$), desweiteren ein bis zwei Positionen, die eine gemeinsam von Arg 133 und Arg 75 koordinierte Bindung darstellen ($z = 0 \text{ \AA}$, $z = -2,5 \text{ \AA}$). Die Beobachtung, daß beim Übergang in den periplasmatischen Eingangsbereich zwei nahezu äquivalente bevorzugte Bindungsstellen existieren (siehe Abb. 21 C), wird im PMF-Profil durch das Auftreten zweier fast

gleichwertiger globaler Energieminima überzeugend bestätigt ($z = -6 \text{ \AA}$ und $z = -3,5 \text{ \AA}$). Getrennt werden sie durch eine Energiebarriere von ca. 3 kcal/mol Höhe.

Der Ionentransfer in Richtung des Periplasmas ist im engsten Porenbereich (zwischen $z = 0 \text{ \AA}$ und $z = -3,5 \text{ \AA}$ mit einer Energiebarriere von 2 kcal/mol verbunden. Dagegen benötigt der Ionentransfer in die entgegengesetzte Richtung – auf den exoplasmatischen Raum zu – eine wesentlich höhere Freie Energie zur Aktivierung (ca. 5 kcal/mol).

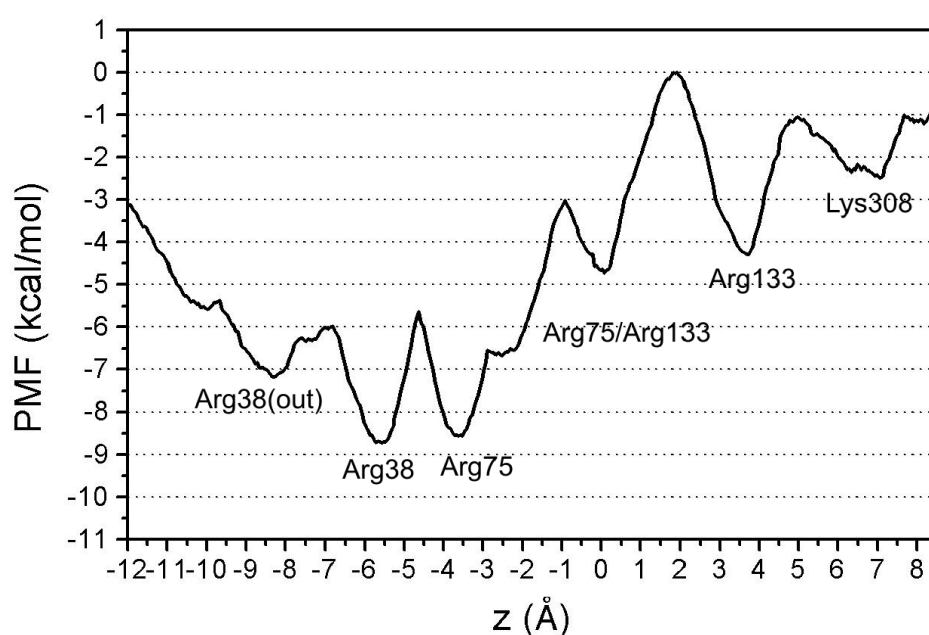


Abbildung 26: Potential-of-Mean-Force-Profil des Chlorid-Transfers durch die Konstriktionszone von Omp32. Aus Zachariae *et al.* (2003).

Diese höchste individuelle Energiebarriere wird für den Ionenübergang zwischen Arg 133 und der ersten gemeinsamen Bindungsstelle von Arg 75 und Arg 133 gefunden. Diese Reaktion erfordert die Bewegung der Seitenkette von Arg 75 in der dort besonders dicht besetzten Umgebung. Die Bindung bei $z = -8,5 \text{ \AA}$, an der äußeren Seite von Arg 38, wird nur wenig gegen den Übergang zum benachbarten globalen Energieminimum stabilisiert. Die Aktivierungsbarriere dieses Übergangs beträgt nur ca. 1 kcal/mol. Es ist vorstellbar, daß die Depopulation dieses Zustands

durch die oben beschriebene *Crossover*-Reaktion von Arg 38 zu Arg 89 stattfindet, die wegen ihres rechtwinkligen Charakters in bezug auf die Porenachse in dieser PMF-Studie nicht berücksichtigt werden konnte.

Insgesamt beträgt die Differenz der Freien Energie zwischen dem ersten gebundenen Zustand bei Lys 308 und dem globalen Minimum der Freien Energie bei Arg 38 ca. 6,5 kcal/mol. Die Tendenz der Cl⁻-Ionen, bevorzugt in der Region des Übergangs der Konstriktionszone zum periplasmatischen Eingangstrichter zu binden, kann so auch durch Betrachtung des Energieprofils erklärt werden. Das zweifache Energieminimum ist deutlich vom Minimum der Querschnittsfläche weg verlagert, das in den Simulationen bei $z = -0,7$ Å liegt (siehe oben).

5.3.4 Kraftspektroskopie-Simulationen

Die in Abschnitt 5.3.3 beschriebenen Ergebnisse weisen auf eine starke Bindung des Chlorid-Ions in einer Region am Ende der Konstriktionszone von Omp32 hin. Schwächere Bindungen wurden für andere Positionen an Basen in und um die Konstriktionszone gefunden. Um die Bindungskraft zwischen dem Anion und den benachbarten Basen quantifizieren zu können, erfolgten Kraftspektroskopie-Simulationen. Hierfür wurde das Cl⁻-Ion über eine virtuelle Feder mit konstanter Geschwindigkeit vom exoplasmatischen Eingangstrichter durch die Konstriktionszone auf die periplasmatische Seite gezogen. Die spezifische Kraft wurde über die Auslenkung der Feder bestimmt (Grubmüller *et al.*, 1996).

Wie Abb. 27 illustriert, zeigt das Kraftprofil eine Folge stark positiver und negativer Werte. Besonders deutlich manifestiert sich dies in einem Bereich zwischen ca. $z = 5$ Å und $z = -9$ Å. Dieser Bereich entspricht der Konstriktionszone mit den angrenzenden Kanalregionen. Hier alternieren hohe Kraftmaxima mit scharfen Minima auf engem Raum. Dies ist gleichbedeutend damit, daß das Chlorid-Ion zunächst zur jeweils nächsten Bindungsstelle gezogen wird und dann eine bestimmte Bindungskraft überwunden werden muß, um es von dieser Stelle wieder zu entfernen. Die negativen *Peaks* stellen anziehende Kräfte in Richtung der nächsten Bindungsstelle dar. Da die Kraft der Ableitung der Freien Energie nach dem Ort entspricht, sollten sich im Kraftprofil Nulldurchgänge an denjenigen Stellen finden, an denen im Energieprofil Maxima oder Minima vorkommen. Kraft-

maxima sollten den Wendepunkten der Energie zwischen einem Energieminimum und -maximum entsprechen, Kraftminima den Wendepunkten zwischen Energiemaxima und -minima.

Die Positionen der maximalen und minimalen Kräfte stimmen gut mit dieser Erwartung überein. Die Kraftmaxima bei $z = 2,5 \text{ \AA}$, $z = -0,5 \text{ \AA}$ und $z = -2,5 \text{ \AA}$ zeigen mittlere Abrißkräfte im Bereich von 130 – 230 pN. Dazwischen liegen Anziehungskräfte von 110 – 150 pN ($z = 1,5 \text{ \AA}$; $z = -1 \text{ \AA}$). Dem Kraftmaximum bei $z = 2 \text{ \AA}$ kann der Übergang zwischen Lys 308 und Arg 133 zugeordnet werden, dem Maximum bei $z = -0,5 \text{ \AA}$ entspricht der Transfer von Arg 133 zur gemeinsamen Bindungsstelle von Arg 133 und Arg 75. Bei ca. $z = -2,5 \text{ \AA}$ findet der Wechsel von dieser Bindungsstelle zu Arg 75 statt.

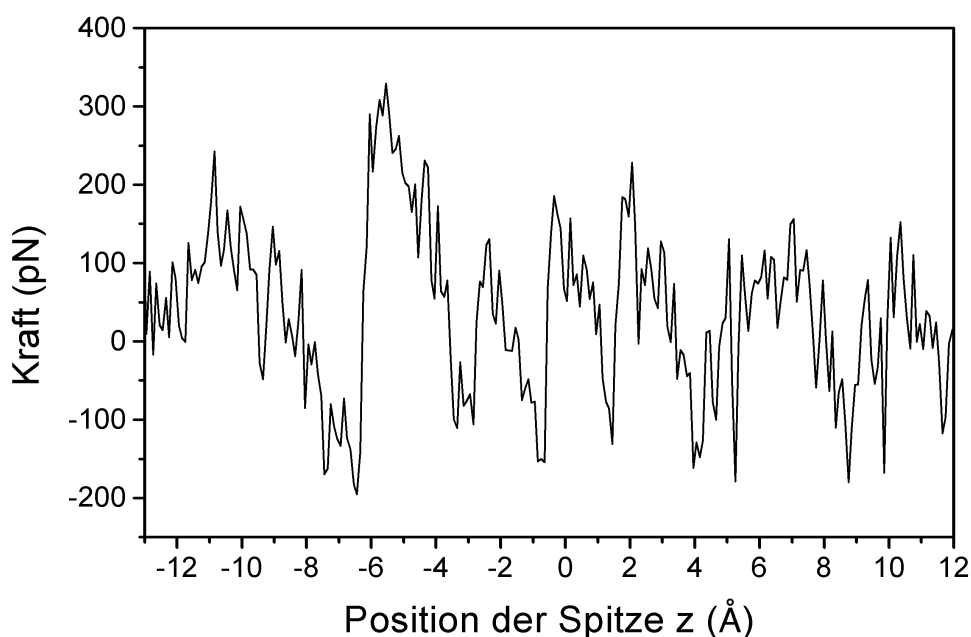


Abbildung 27: Kraftkurve einer repräsentativen Kraftspektroskopie-Simulation des Chlorid-Ionentransfers durch die Konstriktionszone von Omp32. Die alternierenden Kraftminima und -maxima entsprechen den Übergängen zwischen den einzelnen Cl^- -Bindungsstellen, Nullstellen Maxima bzw. Minima der Freien Energie. Das globale Kraftmaximum wird mit $F = 325 \text{ pN}$ bei $z = -6 \text{ \AA}$ erreicht und entspricht einem Bindungsbruch an der bevorzugten Bindungsregion in Omp32, nahe Arg 38.

Zwischen $z = -4 \text{ \AA}$ und $z = -6 \text{ \AA}$ steigt die Kraftkurve zum ausgeprägtesten und höchsten Maximum an. Diese Stelle ist mit der bevorzugten Bindungsregion in den Simulationen und dem Energieminimum auf der PMF-Kurve gleichzusetzen. Eine Kraft von 325 pN ist nötig, um einen Bindungsbruch zwischen dem Chlorid-Ion und seinen Bindungspartnern (siehe Abschnitt 5.3.1) hier herbeizuführen. Nach diesem Abrißprozeß wird das Anion von der periplasmatischen Seite von Arg 38 angezogen. Dies spiegelt sich in einem Minimum der Kraftkurve mit $F = -200 \text{ pN}$ bei $z = -6,5 \text{ \AA}$ wider. Erst bei z -Werten unter -8 \AA wird erneut der Bereich positiver Kräfte erreicht.

Das Doppelminimum der Freien Energie wird mit dieser Methode nicht in Form alternierender Kräfte aufgelöst, da die Zuggeschwindigkeit des Ions im Vergleich zur realen Durchgangszeit immer noch relativ hoch liegt und der gerade Zugpfad nicht der wirklichen physikalischen Situation entspricht. Die anderen Eigenschaften des Energieprofils werden jedoch in der Kraftspektroskopie-Simulation gut wiedergegeben.

Die oben beschriebene erhöhte Flexibilität der Seitenkette von Arg 38 erklärt den moderateren Anstieg der Kraftkurve in der Region zwischen $z = -6,5 \text{ \AA}$ und $z = -10 \text{ \AA}$ im Vergleich zu den scharfen Kraft-Alternierungen in der Konstriktionszone. Die Bindung zu Arg 38 reißt bei einer Position der Spitze von ca. -11 \AA ab (das Anion befindet sich dabei bei ca. $z = 10,5 \text{ \AA}$). Danach fällt die Kraftkurve nicht mehr in den negativen Bereich, d.h. das Chlorid-Ion wird nicht mehr von einer weiteren Base angezogen. Dieser Prozeß entspricht der in den Simulationen beobachteten Diffusion von Arg 38 fort. Der Transfer von Arg 38 zu Arg 89 kann mit der hier verwendeten Methode nicht modelliert werden, da er in etwa im rechten Winkel zur Porenachse verläuft, die Zugrichtung der Spitze während der Simulation aber einheitlich bleiben muß.

Die Kombination der Resultate aus den freien Simulationsläufen, der PMF-Bestimmung und den Kraftspektroskopie-Simulationen ergibt ein einheitliches funktionelles Bild der Anionentranslokation in Omp32. Besondere Bindungsstellen für Chlorid-Ionen besonders in der Konstriktionszone von Omp32 finden sich unter Verwendung aller drei Methoden. Die Freien-Energie-Barrieren der Übergänge zwischen den Bindungspositionen wurden mit der *Umbrella-Sampling*-Methode be-

stimmt. Schließlich konnten hier – als ergänzende Information – die Bindungskräfte des Cl^- -Ions an die einzelnen Basen berechnet werden. Das Profil der Kräfte stellt eine weitere Bestätigung des vorher erhaltenen Profils der Freien Energie dar.

5.4 Moleküldynamik-Simulationen eines Omp32-Trimers mit expliziter Membran und Malat-Ionen

Aus den Elektrostatik-Rechnungen und den Simulationen einzelner Chlorid-Ionen in der Pore von Omp32 ging hervor, daß Omp32 eine besonders hohe Affinität und spezielle Bindungsstellen für Anionen besitzt. Die starke Bindung wird im Experiment durch Sättigungskurven des Ionenstroms sowohl bei hohen Ionenkonzentrationen als auch bei großen angelegten Spannungen deutlich. Die geringe Querschnittsfläche der Konstriktionszone von Omp32 läßt eine starke Wechselwirkung mit ausgedehnteren Molekülen erwarten, falls sie den Kanal passieren können. Die Tatsache, daß *Delftia acidovorans* auf anionischen organischen Mono- und Disäuren als Substrat wächst und die Häufigkeit von Omp32 in der äußeren Membran dieses Bakteriums (Gerbl-Rieger *et al.*, 1992), legen eine Bedeutung von Omp32 für die Bindung von anionischen organischen Säuren nahe. Da *D. acidovorans* ein Bodenbakterium ist, könnte eine starke Affinität und Bindung von Substraten aufgrund der geringen Nährstoffkonzentrationen im Boden erforderlich sein.

5.4.1 Simulationssystem

Um diese Hypothese mit der Methode der Moleküldynamik-Simulation zu testen, sollte ein Gesamtsystem aus einem Omp32-Trimer, Membranlipiden und Wassermolekülen erstellt werden. Zu diesem Gesamtsystem sollten Malat-Ionen hinzugefügt, und so insbesondere ihre Wechselwirkung mit dem Porintrimer untersucht werden. Malat-Ionen stellen den bevorzugten Nährstoff von *D. acidovorans* dar (Willems *et al.*, 1992). In der Simulation wurden sechs Malat-Ionen verwendet, was einer Konzentration von ca. 25 mM entspricht. Der Aufbau eines vollständigen Systems war notwendig, da das Verhalten der Malat-Ionen auch im Eingangsbereich der Poren beleuchtet werden sollte. Zudem erschien eine Betrachtung der langreichweitigen Elektrostatik mittels der *Particle-Mesh-Ewald-Gittersumme* (siehe Abschnitt 3.3.2) in diesen Simulationen notwendig. Daneben sollten Informationen über mögliche strukturelle Veränderungen und die Stabilität der Kristallstruktur von Omp32 in Simulationen mit einer expliziten Membrenumgebung gesammelt werden.

Das System zu Beginn des Produktionslaufes ist in Abb. 28 dargestellt. Zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit waren ca. 1,75 ns im Rahmen des Produktionslaufes berechnet worden. Aufgrund der immensen Größe des Simulationssystems entsprach dieser Zeitabschnitt einer Rechenzeit von etwa 5 Monaten. Für die Auswertung der dynamischen Eigenschaften des Proteins und die Beobachtung der Diffusion und Bindung von Malat-Ionen in Omp32 ist die bislang simulierte Zeitspanne weit ausreichend (vgl. die Analyse der 1-ns-Simulation von OmpF in Tieleman und Berendsen, 1998).

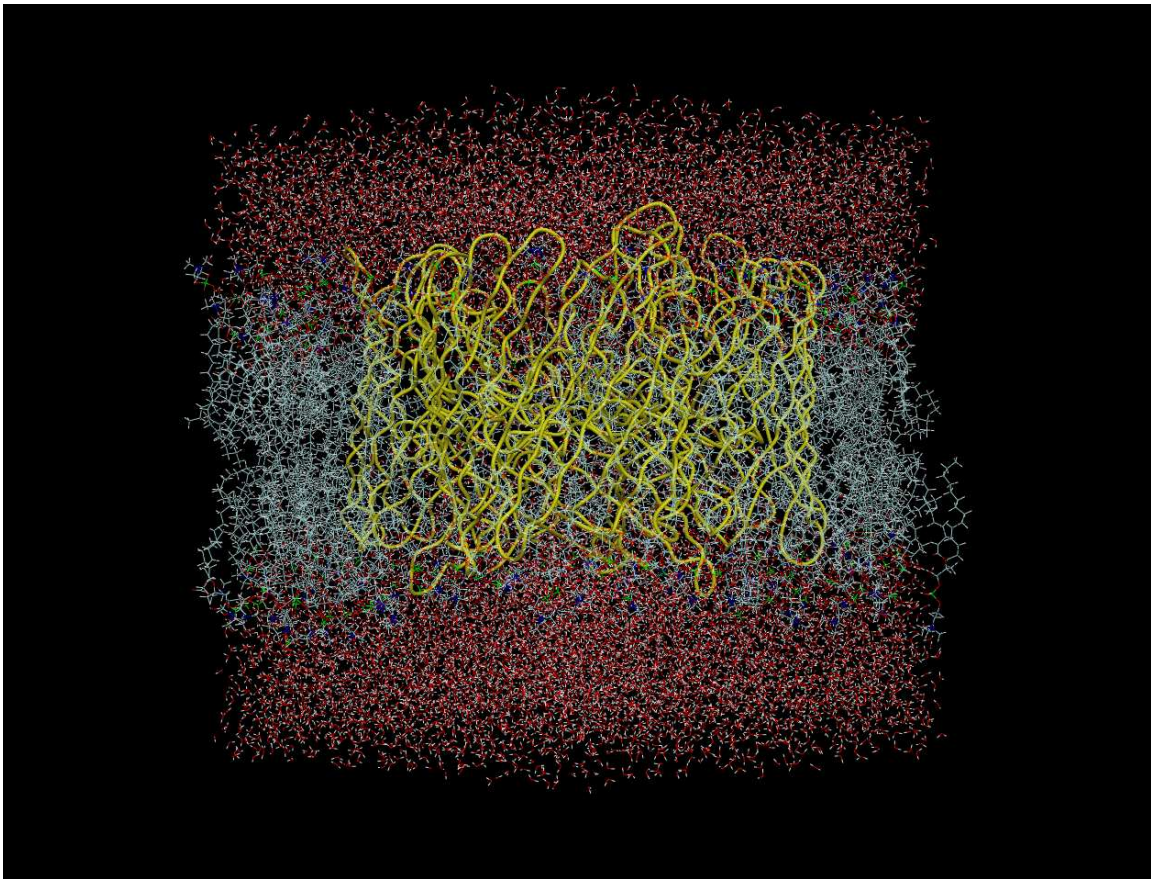


Abbildung 28: Vollständiges Simulationssystem aus einem Omp32-Trimer, 162 DMPC-Lipidmolekülen, 14323 Wassermolekülen und 6 Malat-Ionen nach der Äquilibrierungsphase. Das hexagonale System ist Teil eines periodischen "Kristalls" gleichartiger Systeme.

5.4.2 Struktur und Stabilität von Omp32 in der Simulation

Abb. 29 zeigt die mittlere *Root-Mean-Square*-Fluktuation (RMS-Fluktuation) der C_{α} -Atome aller Aminosäuren in der ersten Untereinheit von Omp32 über 1,75 ns simulierte Zeit. Die anderen zwei Untereinheiten ergeben analoge Resultate und wurden deshalb nicht gesondert in Abbildungen aufgenommen.

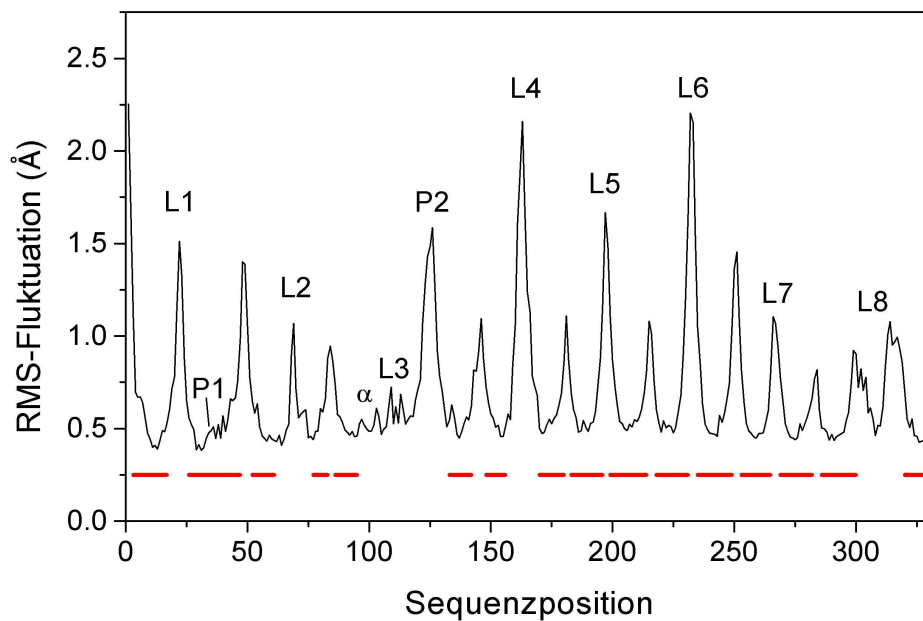


Abbildung 29: *Root-Mean-Square*-Fluktuation der C_{α} -Atome der Aminosäuren im ersten Monomer von Omp32. Die roten Balken unter der Kurve zeigen die Positionen der 16 β -Stränge an. Die Positionen der übrigen Sekundärstrukturelemente sind ebenfalls angegeben.

Die Sekundärstrukturelemente (vgl. Abb. 6) sind anhand dieser Auftragung leicht zu identifizieren: die Maxima der Kurve entsprechen den *Loops* oder *Turns* des β -Barrels, fast alle Minima sind mit den β -Strängen assoziiert. Ausnahmen bilden die *Loops* L3 und L8, die sich in die durch das β -Barrel gebildete Pore falten und die Konstriktionszone formen. Der längste *Loop* in Omp32, L3 (Aminosäuren 96 – 132), enthält einen α -helikalen Abschnitt (Aminosäuren 96 – 101), der nur geringer Fluktuation unterworfen ist. Bemerkenswert ist, daß auch der zentrale Teil von L3 keine stark erhöhte Dynamik aufweist (Aminosäuren 102 – 117). Diese Beobach-

tung ist der bewegungseinschränkenden Position des *Loops* in der engen Konstriktionszone von Omp32 zuzuschreiben. Ausschließlich der Teil, der der *Protrusion* P2 zugeordnet werden kann (Aminosäuren 118 – 130) fluktuiert in höherem Maße, da sich P2 in Richtung des extrazellulären Porenrandes faltet.

Der zweitlängste *Loop* L8, der sich zur Porenmitte hin faltet (Aminosäuren 301 – 319), wird durch die enorm starke Salzbrücke zwischen Lys 308 und Glu 60, die in Abschnitt 5.1.1 beschrieben wurde, zweigeteilt. An der Sequenzposition 308 ist ein deutliches Minimum der RMS-Fluktuation zu erkennen. Dadurch wird die Bedeutung dieser Salzbrücke zur Stabilisierung der Struktur von L8 und damit der Geometrie der Konstriktionszone von Omp32 bestätigt. Zudem bindet das benachbarte Glu 309 an ein Calcium-Ion im Trimerzwischenraum. Diese Wechselwirkung fixiert die Struktur des *Loops* 8 zusätzlich.

Es wird deutlich, daß die wichtigsten Merkmale der Sekundärstruktur, insbesondere die Struktur des β -*Barrels*, während des Produktionslaufes intakt blieben. Eine fortlaufende Überprüfung der Sekundärstruktur während der Simulation mit dem Programm DSSP (Kabsch und Sander, 1983) bestätigte diese Beobachtung. Die Zentren der β -Stränge weisen nur geringe RMS-Fluktuationen von 0,4 – 0,5 Å auf. Maximale RMS-Fluktuationen finden sich für die *Loops* L4 und L6 mit ca. 2,2 Å. L4 (Aminosäuren 157 – 169) bildet den Übergang vom Rand des β -*Barrels* zur Trimerkontaktzone, L6 (Aminosäuren 232 – 234) weist leicht vom β -*Barrel*-Rand nach außen. Ein weiteres Maximum in der Fluktuation (2,2 Å) ist dem N-Terminus zuzuordnen, der durch eine ungeladene Pyroglutamat-Gruppe gebildet wird.

In Abb. 30 ist die gesamte RMS-Abweichung der C_{α} -Atome des Omp32-Trimers von der Kristallstruktur während des Simulationslaufes dargestellt. Es ergab sich eine insgesamt mittlere Abweichung von ca. 2,8 Å nach 1,7 ns. Der Wert stieg im mittleren Bereich der Simulation (0,9 – 1,1 ns) zunächst von 2,4 Å auf 2,9 Å stark an, fiel dann aber bis 1,4 ns auf ca. 2,6 Å zurück. Der weitere Anstieg der RMS-Abweichung im Bereich bis 1,7 ns war langsam. Dies macht die Stabilität der Proteinstruktur im Laufe der Simulation deutlich.

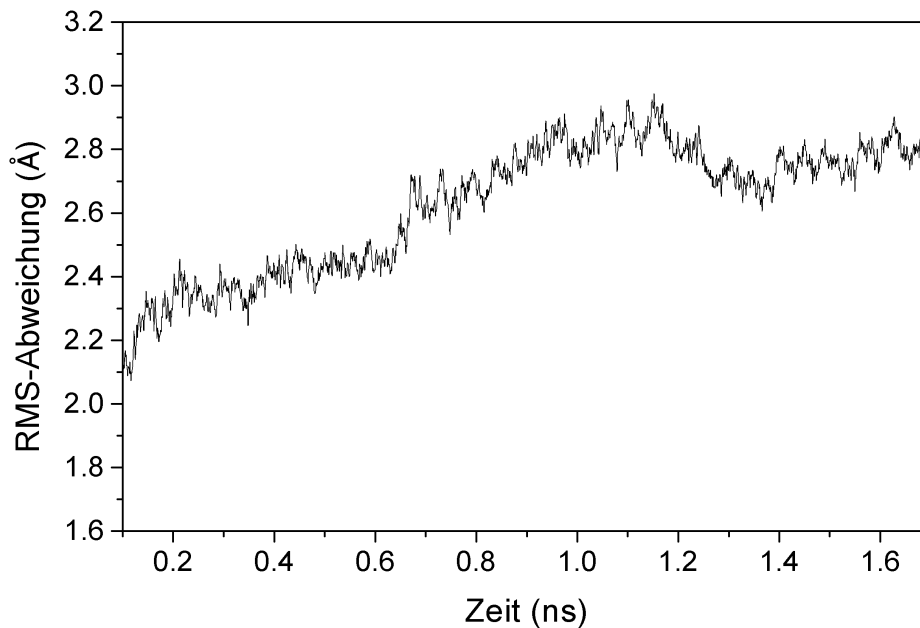


Abbildung 30: RMS-Abweichung der C_{α} -Atome der Aminosäuren des Omp32-Trimers als Funktion der simulierten Zeitspanne. Die ersten 100 ps des Produktionslaufes wurden noch der Äquilibrierungsphase zugerechnet.

5.4.3 Diffusion und Bindung von Malat-Ionen in Omp32

In der Simulation konnte eine starke Wechselwirkung zwischen Malat-Ionen und dem positiven Potential im Kanal von Omp32 beobachtet werden. Insgesamt drei der im extrazellulären und periplasmatischen Solvensbereich eingesetzten sechs Malat-Ionen wurden von den Basen der Konstriktionszone in Omp32 nach ca. 0,5 – 1,1 ns gebunden. Davon stammte eines aus der extrazellulären, zwei aus der periplasmatischen Region.

Von der exoplasmatischen Lösung aus wanderte ein L-Malat-Ion in den Kanal des ersten Monomers von Omp32 (Abb. 31). $z = 0 \text{ \AA}$ entspricht hierbei der Koordinate des Membranzentrums und unterscheidet sich vom Nullpunkt der in Abschnitt 5.3 durchgeführten Rechnungen um ca. 4 \AA in Richtung des periplasmatischen Solvens. Er fällt ungefähr mit der Position des C_{α} -Atoms von Arg 38 zusammen.

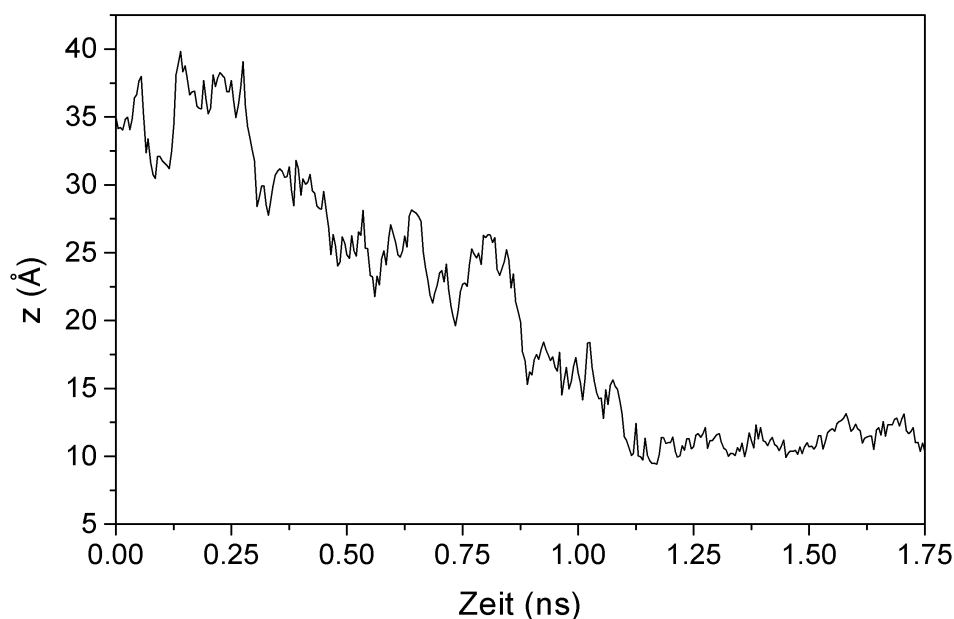


Abbildung 31: Trajektorie der Diffusion eines L-Malat-Ions von der extrazellulären Lösung in die Konstriktionszone des ersten Monomers und Bindung an Arg 75. Der geometrische Mittelpunkt des Malat-Ions wurde als Referenzpunkt der Molekülposition gewählt. Bei $t = 300$ ps findet die erste bedeutende Anziehung in Richtung des Kanals statt, dabei spielt die Gruppe Arg 26 am Porenrand eine Rolle. Bis $t = 1,1$ ns diffundiert das Malat-Ion in Richtung der Konstriktionszone und wird danach von Arg 75 gebunden. Nach ca. $t = 1,2$ ns wird die zweite Carboxyl-Gruppe des Malats zusätzlich von Lys 74 koordiniert.

Nach $t = 275$ ps ist ein deutlicher Übergang der Malat-Bewegung hin zu einer gerichteten Diffusion in tiefere Bereiche des Kanals zu erkennen. Innerhalb nur 885 ps fand eine Translokation des L-Malat-Ions über eine Distanz von 30 \AA statt. Dabei wanderte es vom exoplasmatischen Raum zur Konstriktionszone des Porins.

Nach Beginn des Produktionslaufes begannen die Seitenketten des Arginin-Clusters der Konstriktionszone dieses Monomers unverzüglich, sich in Richtung des im extrazellulären Solvensbereich diffundierenden Malat-Ions zu orientieren. Während der Annäherungsphase des Malat-Ions an die Konstriktionszone bewegten sich die Seitenketten der Arginine um zwischen $3,3 \text{ \AA}$ (Arg 75) und $4,7 \text{ \AA}$ (Arg 133) in Richtung des Malat-Ions (Referenzpunkt ist das C_{ζ} -Atom des jeweiligen

Arginins). Zu bemerken ist, daß aufgrund dieser Reorientierung die Guanidinium-Gruppe von Arg 75 in der Simulation meist eine höhere z -Koordinate aufwies als die von Arg 133, also dem vom extrazellulären Eingangsbereich kommenden Malat-Ion näher war. In der Kristallstruktur ist die Reihenfolge in z -Dimension genau umgekehrt. Die Bewegung des Malat-Ions im Kanal ist diffusiv. Der Beginn der Hineinbewegung war mit einer Wechselwirkung mit Arg 26 am äußersten Porenrand verbunden, die jedoch nicht zu einer Annäherung des Malat-Ions auf Wasserstoffbrückendistanz führte (bei ca. $t = 300 - 450$ ps, $z \approx 30$ Å). Weitere individuelle Wechselwirkungen mit einzelnen Basen des Poreneingangstrichters konnten während der Hineindiffusion nicht festgestellt werden. Nach $t = 1,1$ ns wurde das Malat-Ion von der Seitenkette der in der Konstriktionszone befindlichen Gruppe Arg 75 gebunden. In Abb. 31 ist dieser Zustand durch den horizontalen Verlauf der Kurve nach $t = 1,1$ ns bei $z \approx 10$ Å erkennbar.

Zunächst ging nur eine Carboxylgruppe des Malats eine enge Wechselwirkung mit der Guanidinium-Gruppe von Arg 75 ein. Nach weiteren ca. 100 ps erfolgte jedoch eine Bindung der zweiten Carboxylgruppe an die Amino-Funktion der Seitenkette von Lys 74 (Abb. 32). Während die Bindung an Lys 74 für kurze Zeiten gelöst wurde, blieb die Wasserstoffbrücken-Wechselwirkung mit Arg 75 über die gesamte restliche Simulationsdauer erhalten. Dieses Wechselspiel der Bindungsbildung und des Bindungsbruches an Lys 74 erklärt die geringen Fluktuationen in der z -Koordinate des Malat-Ions zwischen $t = 1,5$ ns und $t = 1,75$ ns in Abb. 31. Zum weit überwiegenden Anteil dieser Simulationsphase bestand jedoch eine starke Wechselwirkung des Malat-Ions mit sowohl Arg 75 als auch Lys 74.

Abb. 33 zeigt die Trajektorie in z -Richtung eines im periplasmatischen Raum eingesetzten D-Malats. Nach ca. 300 ps freier Diffusion ist der Zeitpunkt, an dem die gerichtete Diffusion im elektrostatischen Feld der Omp32-Pore beginnt, gut erkennbar. Die darauffolgende Phase der Malat-Bewegung ist erneut bemerkenswert, da in nur 430 ps ein Transfer über ca. 22 Å in Richtung der Konstriktionszone stattfand. Nach $t = 0,75$ ns wurde das Malat-Ion von der Base Arg 38 der Konstriktionszone gebunden. Diese Bindung wurde über die weitere simulierte Zeitspanne von 1 ns nicht mehr gelöst. Der gebundene Zustand ist durch einen annähernd horizontalen Verlauf der Trajektorie auf Höhe von $z \approx -5$ Å gekennzeichnet.

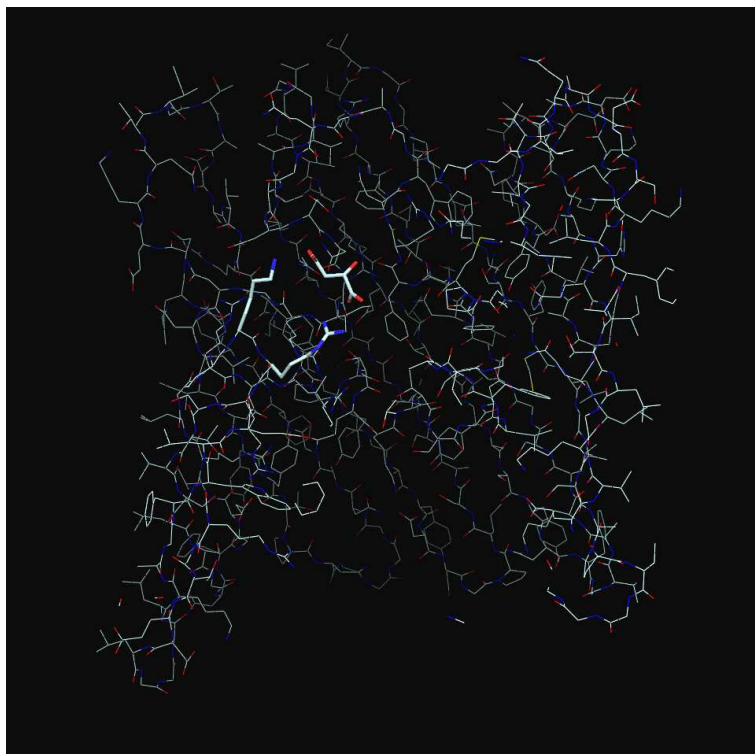


Abbildung 32: Bindungssituation des L-Malat-Ions an Lys 74 und Arg 75 auf der extrazellulären Seite der Konstriktionszone von Omp32. Die Momentaufnahme wurde nach $t = 1,44$ ns erzeugt. Die Distanzen zwischen den terminalen Stickstoffatomen der jeweiligen Base und den nächsten Sauerstoffatomen der Malat-Carboxylgruppen betragen $2,71$ Å und $2,83$ Å (Arg 75) bzw. $2,95$ Å (Lys 74).

Es fand nahezu keine Bewegung des Malats in z -Richtung mehr statt. Ein kurzer Abschnitt geringerer z -Koordinaten zwischen $t = 875$ ps und $t = 975$ ps wird durch Fluktuation um die Seitenkette von Arg 38 und nicht durch einen Bruch der Bindung verursacht.

Die Phase der gerichteten Diffusion des Malat-Ions in die Konstriktionszone von Omp32 beginnt mit einer Interaktion mit Lys 284 am periplasmatischen Rand von Omp32 ($z \approx -20$ Å). Sie war jedoch nicht so stark, daß eine Annäherung des Malats auf Wasserstoffbrückendistanz erreicht wurde. Stattdessen bewegte sich das Malat-Ion rasch in Richtung Kanalengstelle weiter. Während der gesamten weiteren Hineindiffusion des Malat-Ions in die Pore wurde auch hier keine be-

deutende Wechselwirkung mit den Basen im periplasmatischen Eingangstrichter der Pore beobachtet. Die Diffusion fand ausschließlich in Richtung der Konstriktionszone statt und wurde im wesentlichen durch die Wechselwirkung mit den dort dicht gedrängt vorliegenden Arginin-Seitenketten verursacht. Die Bewegung war somit außerordentlich schnell und wurde nicht durch Bindung an Aminosäurereste vor Erreichen der Konstriktionszone unterbrochen und verlangsamt.

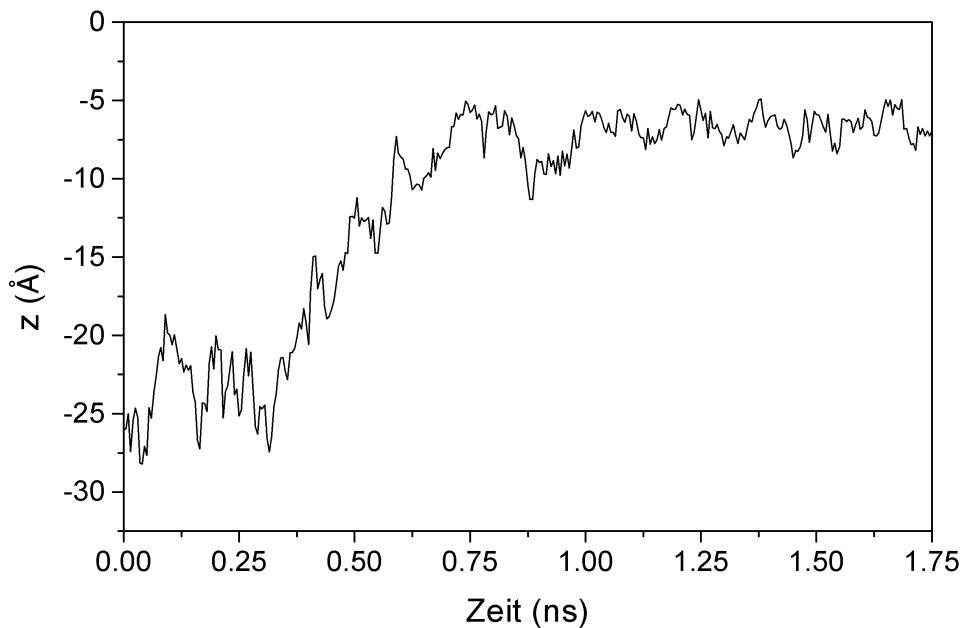


Abbildung 33: Trajektorie der Hineindiffusion und Bindung eines D-Malat-Ions an das dritte Monomer von Omp32. Die drei Phasen der Malat-Dynamik gehen aus der Aufzeichnung deutlich hervor; zwischen $t = 0$ ns und $t = 0,3$ ns diffundiert das Malat-Ion frei im Periplasma, zwischen $t = 0,3$ ns und $t = 0,75$ ns wird es von den Basen der Konstriktionszone angezogen und nach $t = 0,75$ ns von Arg 38 gebunden.

Die Seitenketten der Basen in der Konstriktionszone orientierten sich während der Simulation z.T. stark in Richtung des sich annähernden bzw. an Arg 38 gebundenen Malat-Ions um. Dies wird insbesondere durch die Aufzeichnung der Dynamik der Seitenkette von Arg 133 deutlich. Abb. 34 zeigt die Bewegung des C_{ζ} -Atoms von Arg 133 über 6 Å hin zu dem an Arg 38 gebundenen Malat.

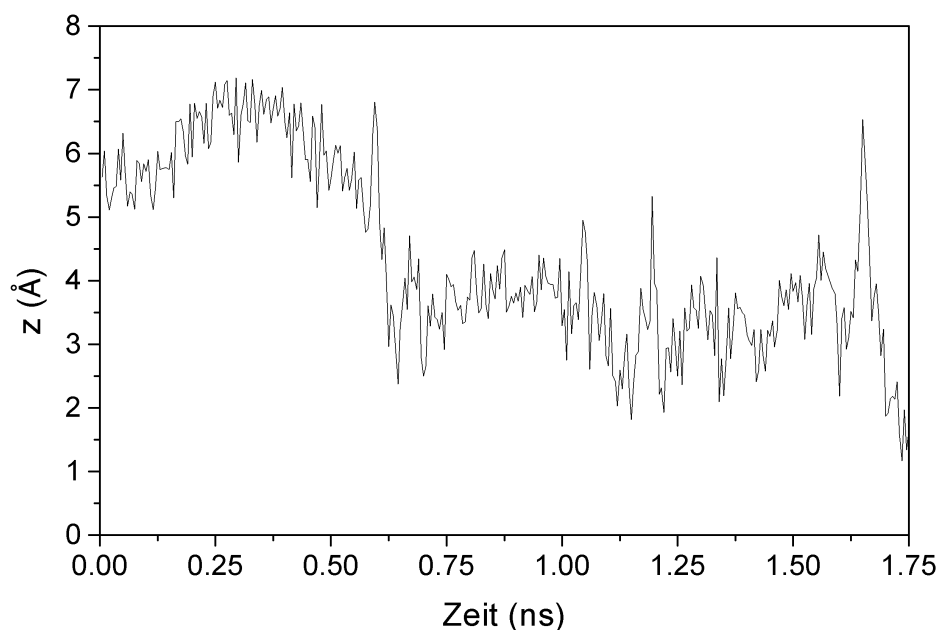


Abbildung 34: Annäherung der Seitenkette von Arg 133 (C_{ζ}) an das bei Arg 38 ($z = -5$ Å) gebundene D-Malat-Ion im Laufe der Simulation.

Die Struktur der Porenengstelle, besonders die Geometrie des Arginin-Clusters, paßt sich also dem gebundenen Substrat an. Abb. 35 stellt eine charakteristische Momentaufnahme der Bindung des D-Malat-Ions an die Guanidinium-Gruppe von Arg 38 dar. Hierbei ist zu bemerken, daß das Malat-Ion an dieser Position nur mit einer Carboxyl-Gruppe eine Wechselwirkung mit Arg 38 eingeht, die zweite Carboxyl-Gruppe aber kontinuierlich Solvens-koordiniert ist. Diese Tatsache galt für nahezu die gesamte Zeitdauer, während der die Bindung in der Simulation bestand. Nur für sehr kurze Zeitabschnitte befand sich die zweite Carboxyl-Gruppe des Malats in für Wasserstoffbrücken relevante Distanz zur Seitenkette von Arg 76. In der Nähe von Arg 38 wurde in den *Umbrella-Sampling*-Simulationen mit einem Chlorid-Ion das globale Energieminimum für den Porendurchgang berechnet (siehe Abschnitt 5.3.3). Das Potentialminimum in den Elektrostatik-Rechnungen wurde ebenfalls für diesen Bereich bestimmt (Abschnitt 5.1.1). Aus diesem Grund ist davon auszugehen, daß die Bindung des zweifach negativ geladenen D-Malats an die Base Arg 38 einem sehr stabilen Zustand entspricht. Ein Überwechseln zu

anderen Gruppen, auch zu Arg 75, wurde im Laufe der Simulation nicht mehr beobachtet.

Im zweiten Monomer wurde ein ähnliches Diffusionsverhalten und Bindung an Arg 38 für ein L-Malat-Ion aus dem periplasmatischen Raum gefunden. Die Eigenschaften der Trajektorie und der Bindung entsprechen den oben für D-Malat in Monomer 3 beschriebenen weitestgehend.

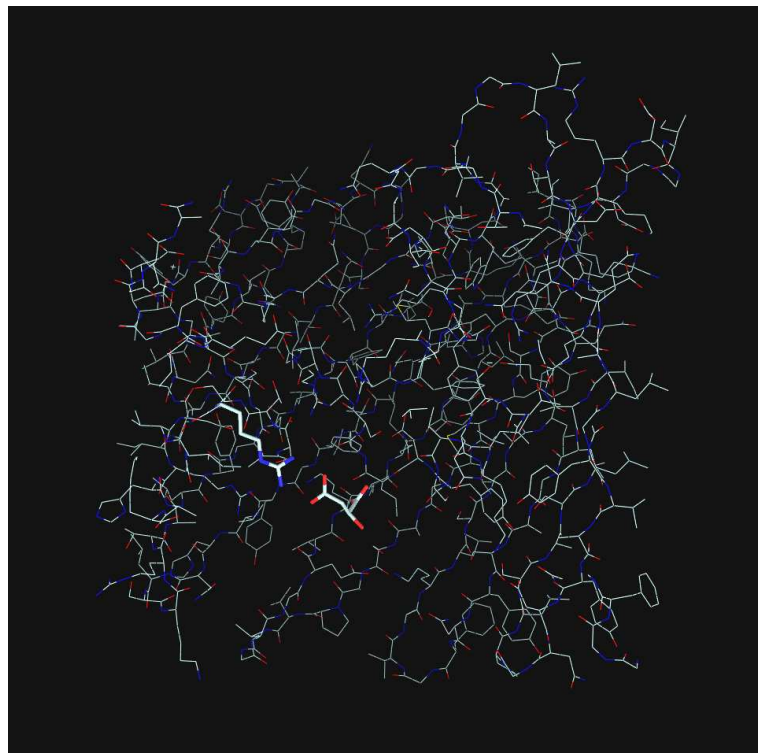


Abbildung 35: Bindungsmuster des D-Malat-Ions an Arg 38 des dritten Monomers. Die zweite Carboxylgruppe wechselwirkt nicht mit einer weiteren Base. Die Momentaufnahme wurde nach einer Simulationszeit von $t = 1,37$ ns erstellt. Die Distanz zwischen den Sauerstoffatomen der Malat-Carboxylgruppe und den terminalen Guanidinium-Stickstoffatomen von Arg 38 beträgt $2,63$ Å bzw. $2,74$ Å.

Insgesamt zeigen die MD-Simulationen des vollständigen Systems, daß eine starke Affinität des Kanals von Omp32 zu den zweifach negativ geladenen Malat-Ionen besteht. Es konnte gezeigt werden, daß eine schnelle Diffusion dieser Ionen aus dem exo- bzw. periplasmatischen Raum hin zu Bindungen an die Basen der Konstriktionszone erfolgt. Diese Bindungen bleiben über weite Strecken der Simulation stabil. Die Struktur von Omp32 bleibt in der Simulation intakt und weist ein bereits für ein OmpF beschriebenes Fluktuationsmuster auf. Es reflektiert erwartungsgemäß die unterschiedlichen Beweglichkeiten der Strukturelemente, aus denen sich das β -Barrel zusammensetzt.

6 Diskussion

6.1 Elektrostatische Eigenschaften von Porinen

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die erste umfassende Studie der Elektrostatik aller strukturell bekannten unspezifischen Porine. Die Ergebnisse stimmen gut mit experimentellen Daten überein und ergeben ein in bezug auf frühere Arbeiten stark verändertes Bild der Ladungsverhältnisse in diesen Kanälen. Die vorliegenden Untersuchungen sind damit in der Lage, die Ionenselektivität von Porinen wesentlich genauer zu beschreiben, als es bisher möglich war.

6.1.1 Der Arginin-Cluster der Konstriktionszone unspezifischer Porine

Für die Ionenselektivität der Porine sind die Art, Anzahl und Anordnung geladener Aminosäurereste verantwortlich. Dabei spielen die in Porennähe und vor allem im Kanal selbst liegenden Ladungen selbstverständlich die größte Rolle. Allen unspezifischen Porinen gemeinsam ist ein Arginin-Cluster in der Konstriktionsstelle der Kanäle, der in einigen Porinen um Lysin-Reste erweitert ist. Üblicherweise liegen dem positiven Arginin-Cluster negativ geladene Aminosäurereste gegenüber. Nur im Porin Omp32 geht das elektrostatische Feld ausschließlich auf positive Ladungen und im wesentlichen auf die Arginin-Reste zurück.

Aufgrund des geringen Querschnitts der Konstriktionszone sind die Arginin-Reste eng benachbart und ihre Ladungen wechselwirken miteinander. Deshalb stellte sich die Frage, ob dieses *Stacking* zu einer zumindest partiellen Deprotonierung und Entladung des Clusters führen könnte. Ein derartiges Verhalten war für die Porine OmpF und PhoE aus *E. coli* (Cowan *et al.*, 1992) in der theoretischen Arbeit von Karshikoff *et al.* (1994) berechnet worden. Der Arginin-Cluster in Omp32 besitzt eine sehr ähnliche Geometrie wie diejenigen in OmpF und PhoE; jedoch wäre die gemessene Ionenselektivität mit einer teilweisen Entladung des Arginin-Clusters in dieser Struktur schlecht vereinbar, die ihr entgegenwirken würde. Für Omp32 wird eine Funktion in der Attraktion und Bindung von anionischen organischen Säuren aus der Umgebung des Bakteriums vermutet. Deutliche Hinweise auf eine derartige Funktion konnten in dieser Arbeit im Rahmen von

Moleküldynamik-Simulationen mit Malat-Ionen erhalten werden (siehe Abschnitt 5.4). Besonders für die gefundenen Mechanismen der Anionenleitung und der Diffusion von Malat und seiner Bindung an der Konstriktionszone ist ein protonierter Zustand des gesamten Arginin-Clusters erforderlich.

In der vorliegenden Arbeit wurden die drei dicht nebeneinanderliegenden Guanidinium-Gruppen des Arginin-Clusters in der Konstriktionszone bei neutralem pH-Wert als vollständig geladen berechnet. Diese enorme Ladungsdichte führt, zusammen mit dem Einfluß einiger geladener Basen in den Poreneingangsbereichen, zu einem stark positiven Potential im gesamten Kanal. Das Potentialminimum für negative Ladungen liegt im Bereich der Konstriktionszone, ca. 5 Å vom engsten Punkt entfernt, und weist einen starken Gradienten in Richtung der Eingangstrichter auf. Die ausgeprägte Anionenselektivität von Omp32 kann somit im wesentlichen der dichten Anhäufung von positiven Ladungen in der Konstriktionszone zugeschrieben werden. Diese lassen das elektrostatische Potential zu einem tiefen Minimum in der Region zwischen Arg 75 und Arg 38 abfallen. Zusammen mit dem Einfluß der weiteren basischen Reste sind die Anziehung anionischer Partikel in Richtung der Kanaleingänge und deren Selektion im Filterbereich der Konstriktionszone synergistische Prozesse, die die Selektivität für Anionen in Omp32 gegenseitig verstärken.

Die dreifache Ladung auf dem Arginin-Cluster wird durch ein bisher noch nicht beschriebenes funktionelles Strukturmotiv stabilisiert. Die Arginine, besonders die zentrale Gruppe des Clusters, Arg 75, bilden nach *hinten*, also in Richtung der Barrel-Wand, Salzbrücken mit ein bis zwei Glutamatgruppen (Glu 58, Glu 60). Die Wechselwirkung ist so stark, daß die ungünstigen Auswirkungen des Ladungs-Stackings und der partiellen Desolvatation der Gruppen mehr als kompensiert werden.

Diese Architektur findet sich in *allen* strukturell bekannten unspezifischen Porinen wieder. In allen Fällen ist die Anordnung der geladenen Aminosäurereste funktionell von Bedeutung, d.h. die Ladung auf dem Arginin-Cluster wird durch versteckt liegende Salzbrücken stabilisiert. So sind die Arginin-Cluster in den rechnerisch untersuchten Porinen bei pH = 7 vollständig protoniert. Meist bleibt diese Ladung bis weit in den basischen Bereich hinein erhalten. Im Fall der Porine von

R. capsulatus, *R. blasticus* und *P. denitrificans* ersetzen Aspartate die Glutamatreste. Da die Geometrie des Arginin-Clusters sich von derjenigen in den übrigen unspezifischen Porinen unterscheidet, ist die kürzere Seitenkette von Aspartat für die Stabilisierungswirkung förderlich.

6.1.2 Relevanz der Ergebnisse für die Porine OmpF und PhoE

Für OmpF und PhoE, von denen besonders OmpF das experimentell und theoretisch am gründlichsten untersuchte Porin darstellt, haben die Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit besondere Bedeutung. Karshikoff *et al.* (1994) sagten ein Titrationsverhalten von OmpF und PhoE um pH = 7 voraus, welches in Experimenten nie bestätigt werden konnte. Die MD-Simulation von Tieleman und Berendsen (1998) basierte noch auf einem OmpF-Modell mit nicht geladenem Arg 82. In jüngeren weiterführenden theoretischen Studien an OmpF wurde aber bereits von der Richtigkeit der experimentellen Daten ausgegangen und die elektrostatischen Rechnungen von Karshikoff *et al.* (1994) nicht verwendet, d.h. es wurden drei geladene Arginin-Reste in der Konstriktionszone eingesetzt (Robertson und Tieleman, 2002; Im und Roux, 2002a, 2002b; Phale und Schirmer, 1999). Die vorliegende Arbeit kann Theorie und Experiment an OmpF und PhoE wieder in Einklang bringen. Wie gut dies gelingt, zeigt der Vergleich der vorliegenden Rechnungen mit neueren, sorgfältigen Leitfähigkeitsmessungen von Nestorovich *et al.* (2003).

In Experimenten wurde nachgewiesen, daß die Leitfähigkeit geöffneter Einfachkanäle von OmpF im pH-Bereich von 5 – 9 konstant bei ca. 4 nS bleibt (Nestorovich *et al.*, 2003). Unter pH = 5 ist ein starker Abfall auf einen Wert von 1 nS bei pH = 2 zu beobachten, während die Leitfähigkeit zwischen pH = 9 und pH = 12 ansteigt. Die Ionenselektivitäten verhalten sich ähnlich. Während im Bereich von pH = 5 bis pH = 9 eine konstant bleibende Kationenselektivität des Faktors 3 gemessen wird, sinkt diese unter pH = 5 und kehrt sich in eine Anionenselektivität unter pH = 3,5 um. Bei einem pH-Wert von 2 wird von einer Anionenselektivität um den Faktor 3 berichtet. Zwischen pH = 9,5 und pH = 12 steigt die Selektivität für Kationen leicht über 3 an (Nestorovich *et al.*, 2003; Schirmer und Phale, 1999; Benz *et al.*, 1979).

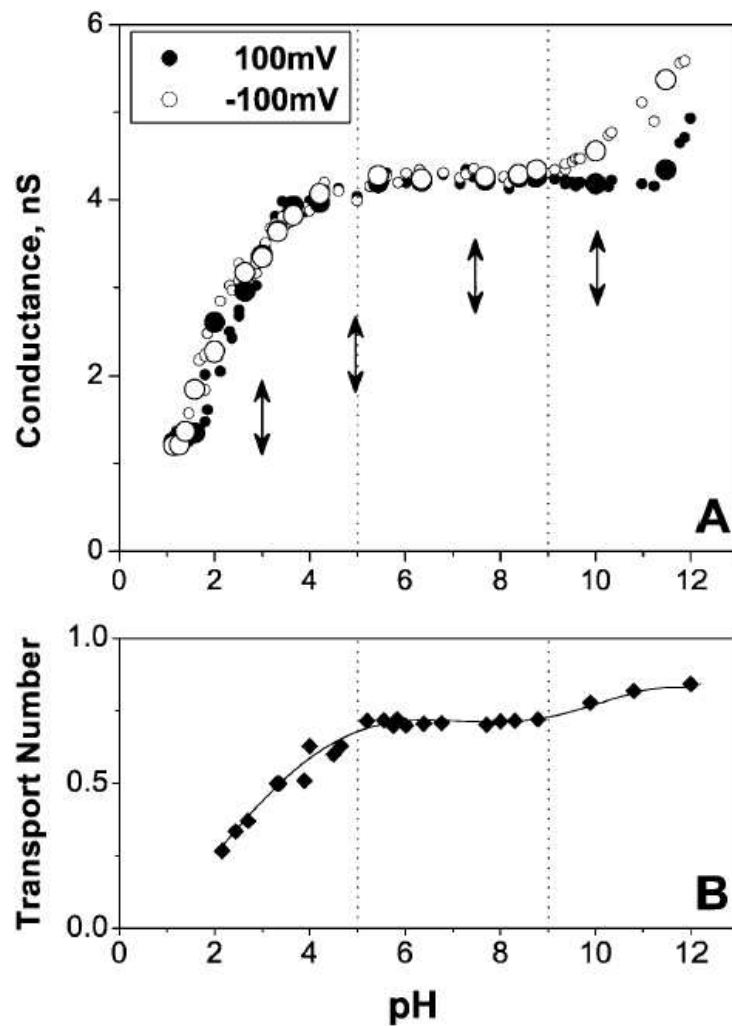


Abbildung 36: Experimentelle Untersuchung der Leitfähigkeit und Selektivität von vier Einfachkanälen von OmpF. (A) Die durchschnittliche Leitfähigkeit eines offenen Kanals fällt zwischen $\text{pH} = 5$ und $\text{pH} = 1$ um den Faktor 4. Dies gilt sowohl für positive (gefüllte Kreise, 100 mV) als auch für negative Membranpolarisierungen (offene Kreise, -100 mV). Die vertikalen Pfeile symbolisieren die pH-Werte, bei denen die vier Einfachkanäle eingesetzt wurden. Die Elektrolytkonzentration betrug 1 M KCl. (B) Ionenselektivität eines geöffneten Einfachkanals, angegeben als Kalium-Transportzahl t^+ . Die Ionenselektivität zeigt die gleiche pH-Abhängigkeit wie die Leitfähigkeit. Zwischen $\text{pH} = 5$ und $\text{pH} = 9$ ist eine leichte Kationenselektivität gegeben ($t^+ > 0,5$), unter $\text{pH} = 5$ sinkt sie ab und kehrt sich in eine Anionenselektivität um ($t^+ < 0,5$). Über $\text{pH} = 9$ steigt die Selektivität für Kationen leicht an. Aus Nestorovich *et al.* (2003).

Diese Ergebnisse stimmen auf hervorragende Weise mit den berechneten Titrationskurven in der vorliegenden Arbeit überein (vgl. Abb. 15). Es ist davon auszugehen, daß pK_a -Rechnungen mit einem durchschnittlichen Fehler von ca. 1 pK-Einheit behaftet sind (Yang *et al.*, 1993; Bashford und Karplus, 1990; Gilson *et al.*, 1987). Der Arginin-Cluster bleibt diesen Rechnungen zufolge in OmpF und PhoE bis $pH = 12$ komplett protoniert. Es gibt also bei beiden Porinen kein Titrationsverhalten im mittleren pH-Bereich.

Dagegen beginnen sich in OmpF unter $pH = 6$ die Säuren in der Konstriktionszone, Asp 113 und Glu 117, zu entladen. Nach den Rechnungen bleibt unter $pH = 2$ ein vollständig geladener Arginin-Cluster zurück, was die Umkehrung der Ionenselektivität in dieser pH-Region gut erklärt. Die Cluster-erweiternde Gruppe Lys 16 in OmpF beginnt sich über $pH = 9$ zu entladen. Lys 80 zeigt in OmpF eine beginnende Deprotonierung über $pH = 10$. Auch diese Ergebnisse reflektieren die an OmpF gemessene Eigenschaft, daß die Kationenselektivität über $pH = 9,5$ leicht ansteigt, sehr gut.

Der wesentliche Einfluß der zwei Säuren Asp 113 und Glu 117 in der Konstriktionszone auf die Ionenselektivität von OmpF wird desweiteren durch Ergebnisse aus Mutationsstudien deutlich (Schirmer und Phale, 1999; Phale *et al.*, 2001). In den Einfachmutanten D113G und E117Q reduziert sich die Selektivität für kationische Spezies von einem Faktor um 4,5 auf 1,4 bzw. 2,9. Die Doppelmutante D113N / E113Q zeigt keine Ionenselektivität mehr. Wird die positive Ladung auf dem Arginin-Cluster beispielsweise durch Mutation der Gruppe Arg 42 zu Cystein verringert, steigt die Kationenselektivität in OmpF um mehr als das zweifache auf einen Wert von 9,7. Die Daten aus Selektivitätsmessungen an der analogen Mutante R82C sind leider widersprüchlich, da es zu zwei Populationen mit erheblichen Unterschieden in der Geometrie der Konstriktionszone kommt. Allerdings hat die Mutation jeweils einen starken Einfluß auf den Faktor der Kationenselektivität (Saint *et al.*, 1996). Eine dieser Populationen zeigt eine Steigerung der Kationenselektivität auf einen Wert von 7,6. Dies kann als Hinweis darauf angesehen werden, daß sich im Wildtyp von OmpF eine Ladung auf Arg 82 befindet. Wird Arg 132 gegen Prolin ausgetauscht, so kommt es zu einer Erhöhung der Selektivität für Kationen auf einen Faktor von 13,0.

In der Moleküldynamiksimulation von Suenaga *et al.* (1998) kommt insbesondere der Säure Asp 113 wesentliche Bedeutung für den Mechanismus der Kationentranslokation in OmpF zu. Natrium-Ionen wurden in der Simulation an Asp 113 gebunden und durch ein zusätzlich eingesetztes Ion ausgetauscht, was netto zu einer Translokation eines Kations durch die Pore von OmpF führte. In dieser Arbeit wurde von einem vollständig geladenen Arginin-Cluster ausgegangen, da die voreingestellten Ionisationszustände der einzelnen Aminosäuren verwendet wurden. Bemerkenswert ist, daß der Cluster trotz der drei Ladungen eine stabile Geometrie in der Simulation beibehält. Insbesondere wurde die Stabilität der Salzbrücke Arg 82 – Glu 62 über die gesamte simulierte Zeit von 1,3 ns erwähnt, aber ihre Wechselwirkungsenergie nicht weiter quantifiziert.

Für PhoE existieren keine neueren Messungen der pH-abhängigen Leitfähigkeit. In einer Studie von Benz *et al.* (1984) wurde die Abhängigkeit des Selektivitätsfaktors für Anionen vom pH-Wert angegeben. Zwischen pH = 3 und ca. pH = 6 ist eine starke Veränderung dieses Faktors von ca. 12 auf ca. 3 zu verzeichnen. Zwischen pH = 6 und pH = 7 bleibt die Selektivität auf konstantem Niveau, während sie zu pH = 9 hin wieder etwas abnimmt. Qualitativ, und wenn man die oben genannte Genauigkeit von pK_a -Rechnungen in Betracht zieht, auch quantitativ, sind diese Meßergebnisse mit den berechneten Titrationskurven von Lys 16 und Lys 18 in der Konstriktionszone von PhoE gut zu erklären.

Für die Titrierbarkeit des beobachteten spannungsabhängigen Schließens von OmpF um pH = 7 kann nach den vorliegenden Rechnungen eine Deprotonierung von Basen bzw. eine Protonierung von Säuren in der Konstriktionszone als Grund ausgeschlossen werden. Es scheinen ohnehin eher großräumige Veränderungen der Geometrie von OmpF, insbesondere der extrazellulären *Loops* bei pH-Verschiebungen als Basis des *Voltage Gatings* in Frage zu kommen (Müller und Engel, 1999). Da die anderen meßbaren Eigenschaften des Kanals nicht um den neutralen pH titrierbar sind, ist ein gemeinsamer Grund für das Schließen und die Veränderungen der elektrophysiologischen Daten unwahrscheinlich. Es ist jedoch anzumerken, daß ein vollständig befriedigender Ansatz zur Erklärung des Schließverhaltens aller unselektiver Porine weiterhin aussteht. In Omp32 wurde in den Moleküldynamik-Simulationen dieser Arbeit eine starke Beweglichkeit von *Pro-*

trusion 2 beobachtet, die aus den Temperaturfaktoren nicht hervorgeht (siehe Abschnitt 6.4.2). Diese Bewegung kann zu einer starken Geometrieveränderung der Pore führen, da P2 Teil von *Loop 3* ist, der die Konstriktionszone maßgeblich formt. Ob die Beweglichkeit von P2 auch zu einem Schließen der Pore führt, müssen weitere Studien klären.

6.1.3 Verwendete Methodik

Der drastische Unterschied der pK_a -Werte des Arginin-Clusters bzw. der Lysine zwischen der Arbeit von Karshikoff *et al.* (1994) und der hier vorliegenden Studie kann im wesentlichen auf einen einfachen methodischen Grund in der Durchführung der Rechnungen zurückgeführt werden. In der früheren Arbeit wurden ausschließlich titrierbare Ladungen in die Poisson-Boltzmann-Rechnungen aufgenommen. Die Verteilung der permanenten Ladungen, beispielsweise die Peptid-Dipole des Protein-Backbones oder Partialladungen von Hydroxy-Gruppen, wurden vernachlässigt. Die Ladungen auf den titrierbaren Gruppen waren so zudem nicht über die gesamte Gruppe verteilt, sondern konzentrierten sich auf die jeweiligen aciden bzw. basischen Zentren, also ein (Lys, Cys, Tyr) bis zwei Atome (Arg, His, Glu, Asp). Hierzu wurde bereits in früheren Arbeiten (Lancaster *et al.*, 1996; Spassov *et al.*, 1997; Gunner *et al.*, 2000) gezeigt, daß der geladene Zustand stark durch Backbone- und Seitenkettendipole stabilisiert werden kann, die die ungünstige Desolvatationsenergie kompensieren. Im allgemeinen gleichen sich die destabilisierenden Einflüsse der Desolvatationsenergie und die stabilisierenden Effekte der permanenten Protein-Partialladungen (ca. auf Null) aus. Die Wechselwirkungen des Arginin-Clusters mit den dahinter liegenden Glutamatresten wurden in den älteren Rechnungen zwar gefunden, jedoch in der Auswertung offenbar nicht berücksichtigt, da sie die addierte Destabilisierungsenergie durch Desolvatation und ungünstige Ladungswechselwirkungen bei Nichtberücksichtigung der Wechselwirkung mit Partialladungen in OmpF und PhoE insgesamt nicht ausgleichen konnten. Gleichzeitig wurde die Desolvatationsenergie der einzelnen ionisierbaren Reste überschätzt, da die Modell-Aminosäuren keine Ladungsverteilung, sondern konzentrierte Ladungen aufwiesen. Berücksichtigt man die Protein-Partialladungen für die Berechnung dieser zwei Terme, so fällt die Wechselwir-

kungsenergie der funktionellen Salzbrücken stark ins Gewicht.

Weitere energetische Effekte aufgrund des Arginin-*Stackings* können in Poisson-Boltzmann-Kontinuumrechnungen aufgrund des vereinfachten theoretischen Modells nicht eingehen. Hier ist insbesondere die Wechselwirkung der π -Systeme der drei Guadiniumgruppen zu nennen. Es ist zu erwarten, daß der quasiaromatische Charakter der geladenen Guadiniumgruppen zu einer Ladungsstabilisierung beiträgt. Einige theoretische Arbeiten auf semiempirischem bzw. *ab-initio*-quantenchemischem Niveau berechneten ein deutliches Energieminimum benachbarter Guanidiniumgruppen bei einem gegenseitigen Abstand von ca. 3 – 3,5 Å (Magalhaes *et al.*, 1994; Boudon *et al.*, 1990). Dieser Abstand entspricht der in den Porinen gefundenen Distanz zwischen den Guanidiniumgruppen des Arginin-*Clusters*.

6.1.4 Vergleich mit weiteren Porinen

Zum Titrationsverhalten von Omp32 in bezug auf Leitfähigkeit und Ionenselektivität liegen leider keine ausreichenden Daten vor. Allerdings lassen sich Vergleiche mit dem Porin Omp34 aus *Acidovorax delafieldii* ziehen, das evolutionär und funktionell eng mit Omp32 verwandt ist (Brunen und Engelhardt, 1995). In diesem Porin bleibt der Wert für die Anionenselektivität zwischen pH = 6 und pH = 9 auf nahezu konstantem Niveau. Wurden die Arginin-Reste in der Konstriktionszone von Omp34 so modifiziert, daß dort keine Ladungen mehr vorhanden sein konnten, so wurde das Porin kationenselektiv.

Die Tatsache, daß die Anordnung des Arginin-*Clusters* und seiner stabilisierenden Säuren im Laufe der Evolution in den Porinen der α -, β - und γ -Untergruppen der Proteobakterien stabil erhalten geblieben ist, weist stark auf eine funktionelle Bedeutung dieses Arrangements von Aminosäuren hin. Die hier durchgeführten Rechnungen zeigen, daß diese Architektur in jedem der strukturell bekannten unselektiven Porine eine elektrostatische Bedeutung hat. Ihre Funktion ist, den Arginin-*Cluster* über weite pH-Bereiche, insbesondere um den neutralen pH, geladen zu halten. Damit wird in den meisten Fällen eine stark dipolare Kanalengstelle mit einem elektrostatischen Feld quer zur Poren längsachse stabilisiert. Dies gewährleistet eine hohe Affinität für dipolare Substrate wie z.B. Zuckermoleküle,

die so mit maximaler Effizienz in das Porencentrum geleitet und dort eventuell gebunden werden (Karshikoff *et al.*, 1994; Tieleman und Robertson, 2002). Wäre der Arginin-Cluster zumindest teilweise ungeladen, würde sich die Frage stellen, warum die Aminosäuresequenzen in diesem Bereich nicht Variationen hin zu polaren Gruppen unterworfen wären. Porine haben die Funktion, polaren Molekülen den Austausch über den hydrophoben Teil der äußeren Membran zu ermöglichen. Die Einschränkung der Bewegungsfreiheit in der engen Pore führt dabei für das transferierte Molekül zu einem Entropieverlust. Gleichzeitig werden solvatisierende Wassermoleküle verloren, was sich in einer ungünstigen Desolvatationsenergie äußert. Um beide Terme auszugleichen, ist eine möglichst starke Affinität und Wechselwirkung des Porins in der Engstelle mit dem polaren Substrat notwendig, also eine stark geladene Porenwand. Die starke Polarität dient ebenfalls dazu, hydrophobe Moleküle von der Passage durch die Poren auszuschließen. Die Bedeutung der stabilisierenden Säuren für den Arginin-Cluster und der Einfluß des Clusters selbst auf die elektrophysiologischen Eigenschaften wird derzeit auch durch Mutationsstudien an Omp32 untersucht.

Die Acidität von Tyrosin reicht offenbar nicht aus, um es zu einer weiteren Cluster-stabilisierenden Gruppe zu machen. Dafür sprechen die Ergebnisse der hier durchgeführten Rechnungen am Porin aus *R. blasticus* (Kreusch und Schulz, 1994) und dem homologen Porin aus *P. denitrificans* (Hirsch *et al.*, 1997). Für Mutanten an Arg 29 bzw. Arg 31 des letzteren Porins wurde erwartungsgemäß eine Umkehr der Selektivität von Anionen zu Kationen bei Austausch durch Glutamat gefunden (Saxena *et al.*, 1999).

Eng benachbarte Argininseitenketten werden selbstverständlich auch in anderen Proteinen gefunden (Magalhaes *et al.*, 1994). Insbesondere auf der Proteinoberfläche liegende geladene Paare bzw. Cluster können funktionelle Bedeutung besitzen, z.B. für die Substratbindung in Enzymen. In einigen dieser Proteine ist eine funktionell wichtige Stabilisierung über verborgene, d.h. nicht ebenfalls auf der Proteinoberfläche liegende, Salzbrücken denkbar und scheint bei Betrachtung der jeweiligen Geometrie plausibel. Weitere elektrostatische Rechnungen sind notwendig, um die Ladungswchselwirkungen in diesen Strukturen aufzuklären. Unter den Kandidaten für funktionell bedeutende, stabilisierende Salzbrücken

um Arginin-Paare befinden sich z.B. die Substratbindungsstelle der UMP/CMP-Kinase aus *Dictyostelium discoideum* (Schlichting und Reinstein, 1999) und die AMP-Bindungsstelle der Adenylatkinase aus *E. coli* im geschlossenen Zustand (Berry *et al.*, 1994). In beiden Fällen kann aufgrund der negativen Ladung der Substrate darauf geschlossen werden, daß stabilisierte, positiv geladene Arginingruppen eine Bedeutung für deren Bindung besitzen könnten.

6.2 Poisson-Nernst-Planck-Rechnungen

Die Verwendung von Kontinuum-Methoden wie PNP ist gerechtfertigt, wenn die untersuchten atomaren Prozesse auf einer langen Zeitskala stattfinden und die Systeme eine große Anzahl Teilchen umfassen, solange die Dynamik der Systembestandteile vernachlässigt und individuelle Wechselwirkungen der Atome in einem mittleren Feld zusammengefaßt werden können (Eisenberg, 1996). Exaktere atomare Methoden wie Moleküldynamik-Simulationen können nur kurze Zeitabschnitte behandeln und ihr Zeitaufwand skaliert ca. mit dem Quadrat der Teilchenzahl. Kontinuum-Modelle der Elektrodifusion sind in der Lage, eine große Bandbreite experimenteller Daten zu erklären und die wesentlichen Einflußgrößen der Ionenleitung in Kanälen korrekt zu beschreiben. Allerdings führen die Vereinfachungen zu Problemen bei manchen – insbesondere engeren – Kanälen, weshalb die Erweiterung vorhandener Ansätze notwendig und lohnend erscheint.

6.2.1 Beitrag zur Verfeinerung der Methodik

Nonner *et al.* (1998) erweiterten den grundlegenden eindimensionalen PNP-Ansatz um ein chemisches Exzeß-Potential als Parameter, der alle Effekte umfaßt, die in die Betrachtung des mittleren elektrostatischen Potentials nicht einfließen. Nach einer Kalibrierung der Diffusionskonstanten und des chemischen Exzeß-Potentials konnte dieses Modell eine Reihe beobachteter Eigenschaften des L-Typ-Calciumkanals präzise widerspiegeln. Jedoch blieb die Herkunft dieses Exzeß-Potentials unklar.

Die Veränderungen der PNP-Gleichungen, die in der vorliegenden Studie vorgenommen wurden (Koumanov *et al.*, 2003), stellen eine substantielle Verbesse-

rung der PNP-Methodik dar. Die Modifizierungen können als Beiträge zur Berücksichtigung des chemischen Exzeß-Potentials betrachtet werden, wie sie in den Arbeiten von Nonner *et al.* (1998) und Gillespie und Eisenberg (2002) für eindimensionale PNP-Kontinuum-Methoden geleistet wurden. Die Verwendung der Desolvatationsenergie und eines Potentials, das einen endlichen Ionenradius reflektiert, beruhen auf klaren physikalischen Grundlagen. In weiteren Verfeinerungen können entropische Effekte und Auswirkungen des begrenzten Volumens sowie spezifische Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Ionen in das Modell über $U_i^{rest}(\vec{r})$ zusätzlich eingebunden werden. Weiterhin könnten die nichtelektrostatischen Anteile der Bindungsaffinität eines Ions an das Protein (van-der-Waals-Wechselwirkung) eingeschlossen werden.

6.2.2 Ergebnisse an Modell-Ionenkanälen

Aus allen Modellrechnungen geht hervor, daß der Einfluß von Desolvationseffekten in PNP-Simulationen nicht vernachlässigbar ist. Für den berechneten Strom durch die Kanäle ergibt sich eine bis zu fünffache Verringerung. Die Ionenkonzentrationen in den Kanälen, die Verteilung der Ionendriftgeschwindigkeiten sowie die radiale Verteilung der Ionen im Kanalmodell werden stark durch die Einbeziehung der Desolvatation verändert.

Die Rechnungen am geladenen Doppeltrichtermodell zeigen, daß asymmetrische Strom-Spannungs-Kurven dann erhalten werden, wenn das elektrostatische Potentialminimum nicht symmetrisch zur Kanalgeometrie angeordnet – also von der Kanalmitte verschoben – ist. Die Einführung einer Ladung alleine reicht aus, um zu Sättigungseffekten des Stroms bei höheren angelegten Spannungen zu gelangen. Diese Ergebnisse sind für Omp32 relevant, da hier asymmetrische und nichtlineare Strom-Spannungs-Kurven gemessen wurden (Mathes und Engelhardt, 1998). In den Poisson-Boltzmann-Rechnungen und der PMF-Bestimmung (Abschnitte 5.1.1 und 5.3.3) wurden für Omp32 Minima der potentiellen elektrostatischen bzw. der Freien Energie für Anionen berechnet, die von der Porenmitte verschoben waren. Selbst an einem so einfachen Kanalmodell wie dem Doppelzylinder und unter Anwendung der PNP-Kontinuum-Methode zeigt sich, daß ein Energieminimum in Form einer Ladung im Kanal ein Sättigungsverhalten des

Stroms hervorruft, und der Unterschied zwischen geometrischem und energetischem Minimum zu einer Asymmetrie des Stroms in bezug auf die Spannung führt. Die hier vorgestellte PNP-Methode ist also in der Lage, ein gewisses nicht-diffusives Verhalten um Potentialminima richtig zu modellieren, obwohl es sich um eine Kontinuum-Methode handelt.

Der neue Algorithmus wurde allerdings nicht auf die exakte dreidimensionale Struktur von Omp32 angewendet. Erhebliche Schwierigkeiten sind hierbei insbesondere dadurch zu erwarten, daß die Dynamik der Aminosäurereste der Konstriktionszone eine große Rolle in der Anionentranslokation spielt (Abschnitt 5.3). Somit stellt eine Methode, die das Protein als starr betrachtet, eine grobe Näherung dar, die die Resultate zu stark beeinflusst. Zudem sind die Interaktionen zwischen Anionen und dem Protein in der Pore von Omp32 besonders intensiv, und nach den Ergebnissen der MD-Simulationen existieren im Kanal spezifische Anionen-Bindungsstellen. Dies stellt die Anwendbarkeit des PNP-Ansatzes für diesen Kanal grundsätzlich in Frage. Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit (Abschnitte 5.3 und 5.4) muß auf exaktere, atomare Methoden zurückgegriffen werden, um die Ionentranslokation in Omp32 korrekt zu beschreiben.

6.3 Der Ionentransfer in Omp32

In dieser Arbeit konnte ein neuer, eigenständiger Mechanismus der Anionenleitung in einem Kanalprotein beschrieben werden. Die durchgeführten Moleküldynamik-Simulationen zeigten eine enge Verflechtung zwischen der Dynamik der Basen in und um die Konstriktionszone mit der Translokation von Chlorid-Ionen. In diesen Rechnungen gefundene spezielle Bindungsstellen und ein ungewöhnliches Energieprofil für die Ionenleitung bieten auch eine Grundlage zur Erklärung von experimentellen Befunden an Omp32.

6.3.1 Vergleich mit Dynamikstudien am Porin OmpF

Die hier vorgestellten Moleküldynamikrechnungen stellen die ersten derartigen Simulationen an einem anionenselektiven Kanalprotein dar. Im Gegensatz zu dem bisher einzigen mit MD-Rechnungen simulierten Porin OmpF (Tieleman und Be-

rendsen, 1998; Suenaga *et al.*, 1998; Im und Roux, 2002a, 2002b) enthält Omp32 nur basische Gruppen in der Konstriktionszone und weist somit an der Engstelle kein dipolares elektrostatisches Feld auf. Dies und die geringe Querschnittsfläche der Pore (Zeth *et al.*, 2000) führen zu einer deutlich von der in OmpF vorliegenden Ausgangssituation abweichenden Grundlage der Ionenleitung in Omp32. Hinzu kommt, daß die Seitenketten des Arginin-Clusters eine stärker in Richtung der Poren längsachse orientierte Ausrichtung besitzen als in OmpF. In den hier vorliegenden Moleküldynamikrechnungen werden sie als Sprossen einer Leiter aus basischen Aminosäuren charakterisiert, auf der die Chlorid-Ionen durch die Konstriktionszone weitergereicht werden.

Die Rechnungen wurden mit einem oder zwei Cl^- -Ionen in der Pore von Omp32 durchgeführt. Dies stellt eine relativ geringe Ionenkonzentration im Kanal dar. Nach einer Modellabschätzung entspricht diese Menge einer Elektrolyt-Ionenkonzentration von ca. 25 – 50 mM. Eine derartig kleine Konzentration sollte physiologischen Bedingungen nahekommen, da *D. acidovorans* hauptsächlich im Boden lebt. Aufgrund der ausgesprochen hohen Selektivität für Anionen von Omp32 und des durchgehend positiven elektrostatischen Potentials der Pore (siehe Abschnitt 5.1.1) wurde für die durchgeführten Moleküldynamik-Simulationen auf die Anwesenheit von Kationen in der Pore verzichtet. So geben diese Simulationen noch keine Information über die Eigenschaften der Kationentranslokation im Kanal von Omp32. Es ist relativ unwahrscheinlich, daß Kationen eine große Rolle für die Charakteristik der Anionentranslokation spielen, besonders bei geringen Ionenstärken. Die Selektivität für eine bestimmte Ionensorte nimmt mit kleineren Ionenstärken extrem zu, wie es z.B. für OmpF auf eindrucksvolle Weise beschrieben wurde (Schirmer und Phale, 1999). Grund hierfür sind die geringeren elektrostatischen Abschirmungseffekte in verdünnten Lösungen. In Omp32 herrscht bereits bei mittleren Ionenstärken eine sehr starke Ionenselektivität vor, die bei Verringerung der Ionenstärke noch ausgeprägter sein dürfte.

In Moleküldynamikstudien zur Ionenleitung in OmpF wurde berichtet, daß Chlorid-Ionen die Konstriktionszone nur für den Fall passieren können, daß sich dort ebenfalls ein Kation (K^+) befindet (Im und Roux, 2002a). Diese Studie erfolgte unter Verwendung einer hohen Ionenstärke von 1M KCl im Elektrolyten. Bei

dieser hohen Ionenkonzentration erfordert die Funktion der Anionentranslokation offenbar die vorherige Bildung eines Elektrolyt-Ionenpaares in der Konstriktionszone. Es ist vorstellbar, daß derartige Effekte auch in Omp32 eine Rolle spielen, insbesondere bei entsprechend hohen Ionenkonzentrationen. Dagegen spricht allerdings der in Omp32 wesentlich geringere Porenquerschnitt. Er scheint es kaum zuzulassen, daß sich in der funktionell bedeutenden Region der Konstriktionszone mehr als ein Ion gleichzeitig befindet. Auf diese Weise würden sich die Transferwege der zwei Ionensorten überlappen, was die Translokation beider Spezies behindern könnte. Für die Ionenleitung in OmpF wurden dagegen zwei scharf voneinander getrennte Transferwege für Kationen und Anionen in der weiteren Pore berechnet (Schirmer und Phale, 1999; Im und Roux, 2002a, 2002b).

Brownian-Dynamics-Simulationen von Kalium- und Chlorid-Ionen in den Poren von OmpF und OmpF-Mutanten konnten experimentell gemessene Selektivitätsfaktoren sehr gut reproduzieren (Schirmer und Phale, 1999; Phale *et al.*, 2001). Unter Verwendung desselben Programms erhaltene Resultate an Omp32 zeigten allerdings keine gute Übereinstimmung mit der gemessenen Selektivität. Insgesamt ergaben sich nur sehr wenige produktive (d.h. kanaldurchquerende) Ionen trajektorien (Zachariae, Schirmer und Engelhardt, unveröffentlichte Daten), eine Bevorzugung von Anionen war dabei nahezu nicht gegeben. Durch die Auswertung der in dieser Arbeit erfolgten Moleküldynamikstudien können diese Beobachtungen nun durch den besonderen Ionentransfermechanismus in Omp32 erklärt werden, der die dynamische Bewegung der Arginin-Seitenketten in der schmalen Konstriktionszone einschließt. Eine Methode, die das Protein als rigide Struktur modelliert – wie Brownian-Dynamics-Simulationen – kann solche dynamischen Eigenschaften nicht reproduzieren. Die meisten Ionen scheitern bei Anwendung dieser Methode somit an der Passage durch die enge Konstriktionszone. Nur besonders energiereiche Ionen mit nahezu exakt entlang der z -Achse gerichteter Bewegung können durch die engste Region treten. Die spezifische Ladung dieser Partikel spielt dabei nur eine untergeordnete Rolle.

Die Moleküldynamikstudien weisen darauf hin, daß Omp32 keinen einfachen Diffusionskanal darstellt. Das Protein interagiert stark mit den Anionen, für die es selektiv ist. Somit wird die Anionentranslokation zu einem Prozeß, der mehr-

fach die Zufuhr von Aktivierungsenergie erfordert. Es gibt nach den Dynamiksimulationen und vor allem nach der Berechnung des Profils der Freien Energie im Kanal eine Reihe von Bindungsstellen für Chlorid-Ionen an basischen Seitenketten in und nahe der Konstriktionszone von Omp32. Der Anionentransfer funktioniert durch ein bisher nicht beschriebenes Zusammenspiel von Ionen- und Proteindynamik. Die Chlorid-Ionen werden durch die Bewegung der Arginin- und Lysinseitenketten durch die Konstriktion von einer Base zur nächstfolgenden weitergereicht. Die einzelnen Weitergabeschritte besitzen Energiebarrieren von ca. 1 – 5 kcal/mol. Im KcsA-Kanal berechneten Bernèche und Roux (2001) Energiebarrieren von 2 – 3 kcal/mol für den konzertierten Mechanismus der Kalium-Ionenleitung. Diese Studie erfolgte ebenfalls durch Anwendung der *Umbrella-Sampling*-Methode. Im KcsA-Kaliumkanal wurden experimentell (in kristallographischen Arbeiten) ebenfalls multiple Ionenbindungsstellen beobachtet (Morais-Cabral *et al.*, 2001).

6.3.2 Vergleich mit experimentellen Daten

Das Profil des *Potential of Mean Force* in Omp32 ist deutlich asymmetrisch in bezug auf die Geometrie der Pore. Die PMF-Kurve fällt auf ein doppeltes globales Energieminimum im Bereich des inneren Kanals ab, das jedoch vom Minimum des Porenquerschnitts um bis zu 6 Å in Richtung des periplasmatischen Eingangs verschoben ist. Damit fällt es relativ gut mit der Position zusammen, an der in der Kristallstruktur von Omp32 ein Sulfat-Ion gebunden ist (Zeth *et al.*, 2000). Gleichzeitig sind die Energiebarrieren auf dem PMF-Profil jeweils ausgeprägt richtungsabhängig. Dies könnte eine Erklärung für die ungewöhnliche Asymmetrie in den experimentellen Strom-Spannungs-Messungen an Omp32 liefern (Mathes und Engelhardt, 1998). In der Leitfähigkeit von Omp32 drückt sich diese Asymmetrie in stark verschiedenen Meßwerten bei angelegten Spannungen von +50 mV bzw. -50 mV aus. Die Verhältnisse der Leitfähigkeiten betragen dabei 1,45 bei einer Konzentration von 3 mM und 1,33 bei einer Konzentration von 10 mM KCl.

Die in den Simulationen verzeichnete lange Ionen transferzeit stimmt relativ gut mit experimentellen Beobachtungen überein. Die Leitfähigkeit von Omp32 im Trimer beträgt bei einer Konzentration von 100 mM KCl und einer transmembranen Spannung von 100 mV ca. 180 ± 30 pS (Mathes und Engelhardt, 1998). Dieser

Wert entspricht einer mittleren Durchgangszeit von 23 – 32 ns pro individuellem Ion.

An der Hauptbindungsstelle für Chlorid-Ionen in Omp32 wechselwirkt das Anion stark mit zwei Arginin-Seitenketten (Arg 75 und Arg 38). Gleichzeitig jedoch wird es von 1 – 2 Sauerstoffatomen der Seitenketten von Thr 36 und Ser 108 und dem *Backbone*-Stickstoffatom von Thr 36 koordiniert. Die Tatsache, daß polare Gruppen an der Bindung von Chlorid beteiligt sind, ist vergleichbar mit der Situation im ClC-Chloridkanal. Dort binden die Sauerstoffatome der Seitenketten von Tyr 445 und Ser 107 sowie zwei *Backbone*-Stickstoffatome von Ile 356 und Phe 357 ein Chlorid-Ion an der kristallographisch bestimmten Bindungsstelle (Dutzler *et al.*, 2002b). Im ClC-Kanal nehmen daneben allerdings keine geladenen Gruppen an der Chlorid-Bindung teil.

In einer weiteren Moleküldynamikstudie an OmpF wurde von Suenaga *et al.* (1998) berichtet, daß ein Natrium-Kation temporär an die Gruppe Asp 113 in der Konstriktionszone bindet, und von einem weiteren Na⁺-Ion von dieser Bindungsstelle verdrängt wird (s.o.). Die Ionen-translokation wird mit diesem Verdrängen begründet und der Transfermechanismus als *Push-Out*-Mechanismus bezeichnet. In der vorliegenden Arbeit wurde ein derartiges Verhalten nicht beobachtet. Dagegen wurde der Eintritt eines zweiten Chlorid-Ions in die Konstriktionszone von Omp32 durch die Anwesenheit eines ersten Anions in diesem Bereich verlangsamt bzw. verhindert. Neben der elektrostatischen Abstoßung ist dafür die verringerte Beweglichkeit der Arginin-Seitenketten verantwortlich, wenn sie bereits an ein Anion binden.

Dieser Effekt, und die starke Bindung von Anionen, die besonders aus der PMF-Kurve deutlich wird, kann eine befriedigende Erklärung für die beobachteten Sättigungseffekte der Leitfähigkeit von Omp32 in Richtung höherer Ionenstärken liefern (siehe Abb. 37). Die Leitfähigkeitskurve zeigt deutliche Unterschiede sowohl zwischen Omp32 und dem Porin aus *R. capsulatus* (Przybylski *et al.*, 1996) als auch zwischen Omp32 und OmpF in KCl-Lösung (Benz *et al.*, 1978). Der Sättigungskurve in Omp32 stehen konstant auf einem Niveau verbleibende relative Leitfähigkeitswerte in diesen beiden Porinen gegenüber. Dies gilt auch für andere Porine, die nicht in die Abbildung mit aufgenommen wurden.

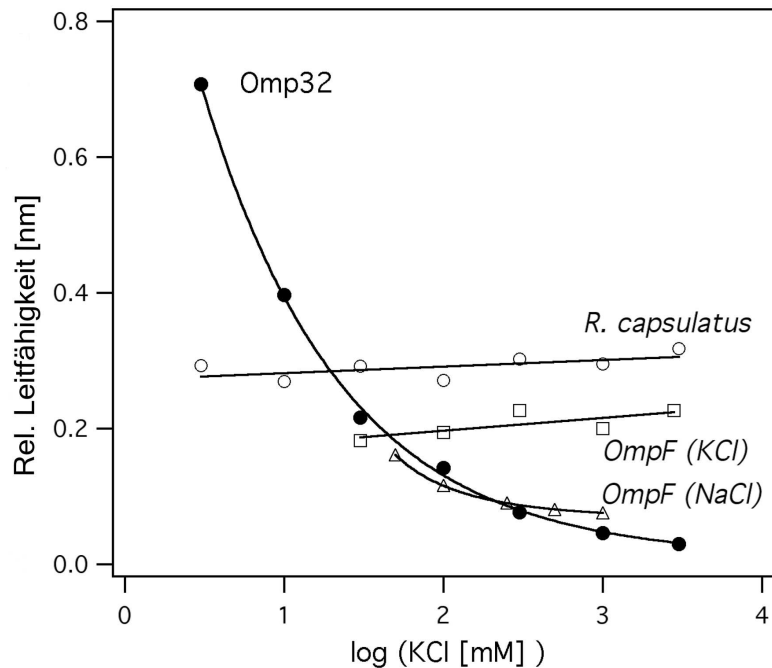


Abbildung 37: Leitfähigkeit von Omp32 in Abhängigkeit von der Elektrolytkonzentration. Die relative Leitfähigkeit wird hier als Verhältnis zwischen der Porinleitfähigkeit (nS) und der spezifischen Leitfähigkeit der Elektrolytlösung (nS/nm) ausgedrückt. Dieses Verhältnis kann als Maß für die Länge eines virtuellen Leiters mit einem bestimmten Widerstand und Querschnitt verstanden werden. Somit ist Omp32 bei geringen Salzkonzentrationen ein besonders guter Leiter. Zum Vergleich sind die Daten von OmpF und dem Porin aus *Rhodobacter capsulatus* eingezeichnet (aus Benz *et al.*, 1978; Przybylski *et al.*, 1996; Mathes und Engelhardt, 1998; und Schirmer und Phale, 1999).

Im Bereich hoher Ionenstärken zeigt Omp32 eine deutlich geringere Leitfähigkeit als die anderen Porine. In Lösungen geringer Konzentration besitzt Omp32 dagegen eine höhere Leitfähigkeit. Die Beobachtung einer derartigen Sättigungskurve läßt sich mit dem berechneten aktivierten Prozeß der Ionenleitung und einer starken Bindung von Anionen im Kanal an einer bzw. mehreren Bindungsstellen mit deutlichen Energieminima hervorragend erklären. Die Ergebnisse der Simulationen deuten darauf hin, daß die Zeit, die für die Passage eines Anions durch die Pore von Omp32 benötigt wird, sich nur geringfügig durch eine Veränderung der Ionenkonzentration verkürzen läßt. Stattdessen wird die mittlere Durchgangszeit

durch die Energiebarrieren bestimmt, die mit dem besonderen Mechanismus der Ionen-transportation in Omp32 verknüpft sind. Dies manifestiert sich in der Sättigung der relativen Ionenleitfähigkeit bei höheren Ionenstärken.

Die Tatsache, daß Omp32 in verdünnten Elektrolyten ein vergleichsweise hohes Leitvermögen besitzt, kann auf das stark positive Potential in der Pore und das trichterförmige Potential am extrazellulären Poreneingang zurückgeführt werden (vgl. Abschnitt 5.1.1). Dadurch werden Anionen stärker in Richtung des Kanals angezogen. Dies wirkt sich wegen kleinerer Abschirmungseffekte besonders in Lösungen geringer Ionenstärke aus.

Leitfähigkeitsmessungen in NaCl-Lösungen ergaben einen ähnlichen, wenn auch deutlich weniger stark ausgeprägten Sättigungseffekt bei OmpF (Schirmer und Phale, 1999), der im Gegensatz zu den Messungen in KCl-Lösungen steht. Dies könnte eine Auswirkung des kleineren Ionenradius von Na^+ sein, der sich in einer stärkeren Wechselwirkung mit den geladenen Säuren in der Konstriktionszone von OmpF bemerkbar machen könnte. Wie oben erwähnt, berechneten Suenaga *et al.* (1998) eine gewisse Bindung von Na^+ an Asp 113 im OmpF-Kanal. Ein Transfermechanismus, der die zeitweise Immobilisierung von Kationen an geladenen Gruppen umfaßt, könnte somit auch in diesem Porin eine Rolle spielen.

Die Anwendung äußerer elektrischer Felder in den Simulationsläufen, die umgerechnet transmembranen Potentialdifferenzen zwischen 30 und 100 mV entsprachen, ergab keine wesentlichen Effekte auf die Zeitdauer und den Mechanismus der Ionenleitung in Omp32. Das natürlich auftretende Donnan-Potential quer zur äußeren Membran, das durch die asymmetrische Ladungsverteilung der Phospholipid-Kopfgruppen auf der einen und der Lipopolysaccharide auf der anderen Membranseite erzeugt wird, wird auf einen maximalen Wert von ca. 30 mV geschätzt (Sen *et al.*, 1988). Somit kann angenommen werden, daß die in den Simulationen erzielten Ergebnisse auch für physiologisch relevante Spannungsverhältnisse gültig sind. Omp32 ist offenbar gut an die Attraktion und Translokation von anionischen Substraten in gering konzentrierten Lösungen angepaßt (vgl. Abschnitt 6.4).

6.3.3 Vergleich mit Modelltheorien von Ionenkanälen

Aus Leitfähigkeitsmessungen an Ionenkanälen ist bekannt, daß die Kinetik der Einzelionentranslokation durch Poren oft einer Michaelis-Menten-Sättigungskurve gleicht (Hille, 1992). Daraus wurde geschlossen, daß in diesen Kanalsystemen eine oder mehrere Bindungsstellen für Ionen existieren (Läuger, 1973). Der Ionen transfer kann als Diffusion zu, zwischen und fort von Bindungsstellen beschrieben werden. Dabei ist die Anzahl der Immobilisierungsstellen für die qualitative Form der kinetischen Funktion nicht relevant.

Die Ratentheorie nach Eyring (1935, 1936) kann nach diesem Modell dazu benutzt werden, die Geschwindigkeiten der Ionenübergänge bei bekannter Höhe der Energiebarrieren zwischen den Bindungsstellen zu quantifizieren. Poren ohne sättigbare Bindungsstellen können dagegen ausreichend gut mit Kontinuum-Methoden wie der Nernst-Planck-Theorie behandelt werden (Eisenberg *et al.*, 1995). Da die Eyring-Theorie für Gasphasenreaktionen abgeleitet wurde, ist eine Korrektur nach Kramers (Kramers, 1940) für Reibungseffekte bei Reaktionen in der flüssigen Phase erforderlich (siehe z.B. Eisenberg, 1999; Hynes, 1985).

Die Goldman-Hodgkin-Katz-Theorie (GHK), mit der z.B. die Selektivitäts- und Permeabilitätsfaktoren von Ionenkanälen aus den experimentell gemessenen Strömen berechnet werden, ist dagegen für den Fall mit dem Kanal und miteinander nicht wechselwirkender Ionen und konstanter transmembraner Potentialgradienten abgeleitet worden (Goldman, 1943; Hodgkin und Katz, 1949). Für das Modell bindender Kanäle ergeben sich Abweichungen von der GHK-Theorie bei höheren Ionenkonzentrationen, da die Ionenbindungsstelle(n) dann überwiegend besetzt sind und die Translokationszeiten vom Profil der Freien Energie bestimmt werden. Je tiefer die Energieminima sind, desto niedriger ist die Sättigungskonzentration; je höher die Energiebarrieren, desto niedriger der Sättigungsstrom (Hille, 1992).

Die Resultate der Moleküldynamik-Simulationen, insbesondere aber das erhaltene Profil der Freien Energie im Bereich der Konstriktionszone von Omp32, lassen darauf schließen, daß Omp32 einem Modell nach Läuger (1973) entspricht. Die dabei zu erwartenden Sättigungseffekte treten im Experiment auf und lassen eine Berechnung der Selektivitätswerte aus den gemessenen Strömen über die GHK-

Theorie als fragwürdig erscheinen. Um die Selektivität aus der Simulation zu berechnen, müßte allerdings ein analoges Profil der Freien Energie für den Durchgang von Kationen erstellt werden. Dies erscheint aus methodischer Sicht problematisch, da bei Betrachtung der elektrostatischen Verhältnisse in der Pore nicht zu erwarten ist, daß sich – wie bei Anionen – spontane Trajektorien durch die Konstriktionszone innerhalb akzeptabler Simulationszeiten ergeben. Die Höhe der Energiebarrieren ist jedoch äußerst empfindlich in bezug auf den jeweiligen Transferweg.

Die Selektivität für Kationen oder Anionen ergibt sich aus einer Kombination der verschiedenen Besetzungszahlen der Bindungsstellen für Anionen und Kationen entlang der Porenachse und der Kinetik der Ionentranslokation (Läuger, 1973). Der Unterschied in den Besetzungszahlen resultiert dabei aus dem Besetzungsgleichgewicht zwischen Energieminima verschiedenen Niveaus (relativ zum Elektrolyten). Die zum Teil beträchtliche Diffusionszeit zwischen möglicherweise weit auseinanderliegenden Energieminima muß hierbei zusätzlich in Betracht gezogen werden.

Nimmt man eine einzelne Bindungsstelle für Anionen in Omp32 an, wie es z.B. das Ergebnis der Poisson-Boltzmann-Rechnungen ist (siehe Abb. 12 in Abschnitt 5.1.1), dann resultiert die Ionenselektivität daraus, daß die Porenmitte, d.h. die Anionenbindungsstelle bei fast allen extrazellulären Elektrolyt-Ionenstärken, bedingt durch das tiefe Potentialminimum, mit einem Anion besetzt ist. Bei gleicher Ionenstärke ergibt sich für diese Region eine fast vernachlässigbare Besetzung mit Kationen, da für Kationen hier ein Energiemaximum vorherrscht. Im Gleichgewicht zwischen periplasmatischem Elektrolyten und der Anionenbindungsstelle führt diese Situation aufgrund des annähernd gleichen Energieunterschieds auf beiden Seiten zu einer ungefähr identischen Konzentration der Anionen im Periplasma und Exoplasma, wenn man von der geringen Potentialdifferenz quer zur äußeren Membran absieht (Donnan-Potential; Sen *et al.*, 1988). Für Kationen gilt dies nicht, da die Besetzungszahl des Energiemaximums sehr klein ist. Für jedes Kation, das bis zur Porenmitte gelangt ist, ist die Wahrscheinlichkeit zwar sehr hoch, auf die eine oder andere Elektrolyt-Region, also auch in das Periplasma weiterzuwandern, jedoch würde die geringe Besetzung des Energiemaximums selbst

bei 100 %-iger Übertragung in den periplasmatischen Raum nicht zu einer hohen Konzentration in diesem Bereich führen.

6.3.4 Verwendete Methodik

Es ist wichtig, die methodischen Limitationen dieser Moleküldynamikstudie zu betrachten. Zu den bedeutendsten Simplifizierungen gehört die Verwendung eines reduzierten Simulationssystems. Daneben spielt die Vernachlässigung der langreichweitigen Elektrostatik durch Verwendung eines *Cutoff*-Radius eine Rolle. Beide Punkte führten zu einer Beschleunigung der Rechnungen unter einem Verzicht auf einen gewissen Grad an Genauigkeit. Zum Vergleich der Verwendung eines *Cutoff*-Radius zur Berechnung der langreichweitigen Elektrostatik mittels der *Particle-Mesh-Ewald*-Methode (siehe Abschnitt 3.3.2) in Simulationen von Ionenkanälen siehe z.B. Capener und Sansom (2002). In dieser Publikation wurden keine nennenswerten Unterschiede der Ergebnisse bezüglich Ionendynamik und Gesamtfluktuationen von Kalium-Kanalmodellen festgestellt, obwohl im allgemeinen davon ausgegangen wird, daß die Verwendung eines *Cutoff*-Radius zu größeren Artefakten führt.

Jedoch wurde das Simulationssystem von vorneherein dadurch eingeschränkt, daß die Struktur des eng an Omp32 assoziierten periplasmatischen Proteins noch nicht gelöst ist. Somit ergaben sich bereits prinzipiell Ungenauigkeiten in der Betrachtung der langreichweitigen elektrostatischen Wechselwirkung und, je nach Entfernung vom periplasmatischen Eingangsbereich von Omp32, auch potentiell Probleme bei der Berücksichtigung kurzreichweitiger atomarer Interaktionen. Es ist allerdings unwahrscheinlich, daß bedeutende strukturelle Veränderungen am Protein aufgrund der Verwendung eines *Cutoff*-Radius auftreten, da die äußere Region des β -Barrels rigide gehalten wurde. Das Profil der Freien Energie der Anionentranslokation betreffend, sollte sich die Vernachlässigung der langreichweitigen elektrostatischen Wechselwirkungen nur auf die relative Höhe der gesamten Energiekurve auswirken, die das Ion innerhalb der Pore erfährt.

6.4 Moleküldynamik-Simulationen eines Omp32-Trimers

6.4.1 Simulationstechnik

Atomare Simulationen von Proteinen in Membranen stellen nach wie vor eine große Herausforderung an die verfügbare Rechenleistung sowie die Simulationstechnik dar. Methoden zum Einbau von Proteinen in Membransysteme wurden für helikale transmembrane Peptide entwickelt und auf Membranproteine übertragen (Woolf und Roux, 1994, 1996; Faraldo-Gómez *et al.*, 2002; siehe auch Forrest und Sansom, 2000). Ein umfassender systematischer Vergleich der verschiedenen Simulationsansätze steht bislang noch weitgehend aus.

Die erste Moleküldynamik-Simulation eines Porin-Trimers mit expliziter Berücksichtigung der Membranumgebung erfolgte 1998 durch Tieleman und Berendsen an OmpF. In dieser Studie wurden eine Doppelschicht aus Palmitoyl-oleoylphosphatidylcholin-Lipiden als Membran verwendet. Die elektrische Neutralität des Systems wurde durch 25 Na⁺-Ionen im Solvens gewährleistet, die die Ladung des Protein-Trimers ausglich. Eine weitere Moleküldynamik-Simulation an OmpF in 1 M KCl-Lösung befaßte sich insbesondere mit den Eigenschaften der Ionenkonzentration und Ionenleitung im Kanal (Im und Roux, 2002b).

Eine Moleküldynamik-Studie zur Klärung der Frage, ob und wo ein bestimmtes Substratmolekül an ein Porin bindet, wurde bislang noch nicht durchgeführt. In der theoretischen Studie zum Mechanismus der Translokation von Zuckermolekülen in Maltoporin (Dutzler *et al.*, 2002a) wurde ein Energieminimierungsalgorithmus zum Auffinden des Reaktionspfades verwendet (Fischer und Karplus, 1992). Insofern stellt der in dieser Arbeit eingeschlagene Weg eine Neuerung dar. Der Rechenaufwand ist erheblich, aber durch die Genauigkeit der erhaltenen Ergebnisse zu rechtfertigen. Da bereits in den Simulationen mit reduziertem Simulationssystem ein starker Einfluß der Proteindynamik auf die Bindung und Translokation von Chlorid-Ionen in Omp32 festgestellt wurde, schiedene Techniken, in denen die Fluktuationen der Aminosäuren eingeschränkt sind bzw. ein rigides Proteinmodell verwendet wird, für die ausgedehnten Substratmoleküle aus.

Zur Darstellung der Membran wurde eine Doppelschicht von Dimyristoylphosphatidylcholin-Lipidmolekülen (DMPC) um das Porin-

Trimer angeordnet. Omp32 befindet sich in der äußeren Membran von *D. acidovorans*, also in einem asymmetrischen Membransystem, das auf der Außenseite aus Lipopolysacchariden besteht (siehe Abschnitt 2.1). Simulationen der Lipopolysaccharid-Membran von *Pseudomonas aeruginosa* wurden von Lins und Straatsma (2001) durchgeführt. Kraftfeld-Parameter für das LPS wurden dabei im Computerchemie-Programmpaket NWChem (Harrison *et al.*, 2000) implementiert.

Die enorme Länge der LPS-Moleküle hätte in Verbindung mit dem Protein-Trimer und einer ausreichenden Größe der Solvensbereiche allerdings schnell dazu geführt, daß die Rechenzeiten aufgrund des erhöhten Systemumfangs unrealistische Zeitskalen erreicht hätten (siehe auch Abschnitt 5.4). Für das Programmpaket CHARMM (Brooks *et al.*, 1983), das in der hier vorliegenden Studie durchgehend für alle MD-Simulationen verwendet wurde, sind bislang noch keine LPS-Parameter implementiert. Dagegen existieren für CHARMM bewährte Schemata zum Einbau von Proteinen in Dipalmitoylphosphatidylcholin- sowie Dimyristoylphosphatidylcholin-Modellmembranen und dazugehörige Parameter (MacKerrel *et al.*, 1998). Im Gegensatz dazu fehlt bislang ein etablierter "Bauplan" zur Erstellung von Systemen aus Proteinen und LPS. Die bessere Durchführbarkeit der Studie und die Möglichkeit, die erhaltenen Ergebnisse mit den zwei bisher veröffentlichten MD-Simulationen an trimeren Porinen vergleichen zu können, führten zur Verwendung des DMPC-Membranmodells und des Einbauschemas von Woolf und Roux (1994, 1996). Die Leitlinien von Faraldo-Gómez *et al.* (2002), die einen direkten Einbau des Proteins in ein "Loch" einer vollständigen äquibrierten Membran vorsehen, erscheinen aufgrund ihrer Simplizität attraktiv. Sie wurden hier aber nicht verfolgt, da sie insbesondere für das MD-Programmpaket GROMACS (van der Spoel *et al.*, 2002) entwickelt und getestet wurden.

6.4.2 Struktur des Omp32-Trimers

Die in den zwei Vorgängerarbeiten beschriebenen Ergebnisse bezüglich der Struktur des OmpF-Trimers sind sehr gut mit den hier erhaltenen Resultaten an Omp32 vergleichbar. Das Muster geringer Beweglichkeit im Bereich der β -Stränge und erhöhter Fluktuation der *Loops* und *Turns* der β -Barrel findet sich sowohl in OmpF als auch in Omp32. Die erhaltenen Werte der RMS-Fluktuation im Bereich des

Protein-Backbones und der gesamten RMS-Abweichung stimmen gut mit denen im OmpF-Trimer aus Tieleman und Berendsen (1998) überein.

Im Vergleich mit den B-Faktoren der Kristallstrukturanalyse ergeben sich, wie in Im und Roux (2002b), sowohl Übereinstimmungen als auch Unterschiede. Dabei muß beachtet werden, daß die experimentellen Daten bei Raumtemperatur aufgezeichnet wurden, während die Simulation bei einer Systemtemperatur von $T = 330$ K erfolgte. Die Kristallpackung schränkt die Bewegungsfreiheit einzelner Sekundärstrukturelemente ein (siehe Zeth *et al.*, 2000), z.B. sind die meisten *Loops* und *Turns* in Protein-Protein-Kontakten involviert.

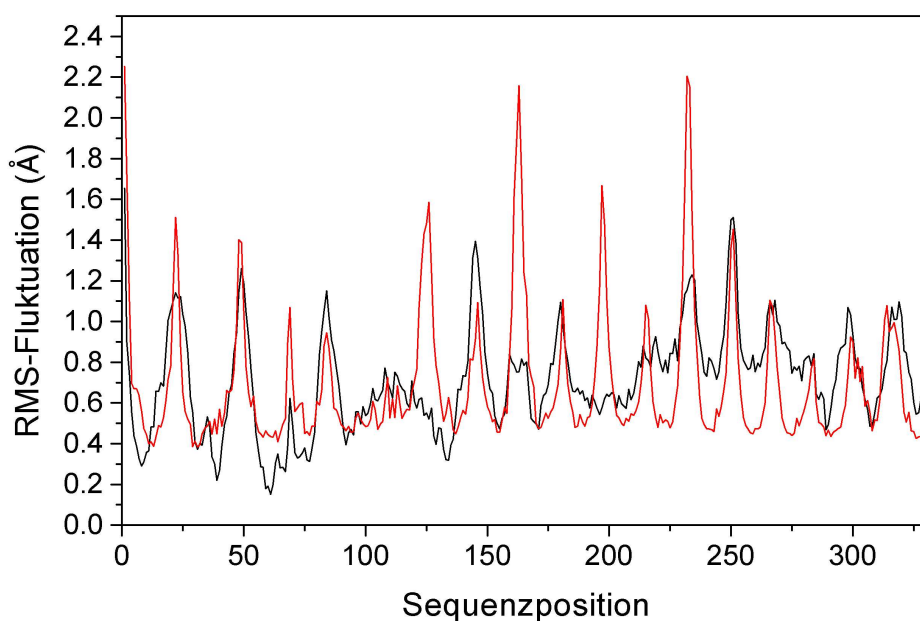


Abbildung 38: Vergleich der RMS-Fluktuation des ersten Monomers (C_{α} -Atome) in der Simulation mit den experimentellen Debye-Waller-B-Faktoren aus der Kristallstruktur (normiert). Die schwarze Kurve entstammt der Kristallstrukturanalyse, die rote zeigt die Werte der Simulation.

Die Trends des Gesamt-Fluktuationmusters werden in der Simulation gut wiedergegeben. Deutliche Diskrepanzen ergeben sich allerdings z.B. für *Protrusion 2* (Sequenzposition 118 – 130), die in der Simulation eine große RMS-Fluktuation aufweist, während in der Auftragung der B-Faktoren an dieser Stelle kein Maxi-

zum Verzeichnen ist. Die Salzbrücke zwischen Asp 128 und Arg 92 stabilisiert die Struktur von P2 nicht im erwarteten Maß. Für die extrazellulären *Loops* ergibt die Simulation erhöhte Fluktuationen, die auf die fehlende Kristallumgebung zurückgeführt werden können.

6.4.3 Substratbindung an Omp32

Die Anionenselektivität von Omp32, seine Häufigkeit in der äußeren Membran von *Delftia acidovorans* und die Tatsache, daß dieses Bakterium auf organischen Säuren – insbesondere Äpfelsäure – wächst, lassen eine Funktion dieses Proteins als Substratkanal annehmen. Aus diesem Grunde wurden die Simulationen mit Malat-Ionen im Solvens durchgeführt.

Aufgrund der positiven Ladung im Kanal und der zweifach negativen Ladung der Substrate konnte eine gewisse Wechselwirkung zwischen den Malat-Ionen und Omp32 erwartet werden. Die Simulation zeigte, daß selbst in gering konzentrierten Malat-Lösungen (25 mM) die Attraktion zwischen Omp32 und Malat so stark ist, daß alle drei Poren innerhalb ca. 1 ns mit Malat besetzt waren. Die gefundene starke Interaktion zwischen der Hälfte der eingesetzten Malat-Ionen und dem Porin-Trimer, die bereits fast von Anbeginn der Simulation vorherrschte, ist jedoch überraschend. Dabei spielt offensichtlich insbesondere die hohe Ladungsdichte aufgrund der eng benachbarten geladenen Arginin-Seitenketten in der Konstriktionszone eine wesentliche Rolle in der Anziehung der Malat-Ionen. Diese Interaktion wird nur wenig durch Wechselwirkungen der Substratmoleküle mit anderen Gruppen der Eingangstrichter von Omp32 gestört und führt dazu, daß ein S-(L)-Malat-Ion aus dem extrazellulären Solvensbereich innerhalb 885 ps über eine Distanz von 30 Å zur Konstriktionszone wanderte. Vom periplasmatischen Raum aus wurde sogar eine Bewegung über 22 Å in nur 430 ps beobachtet.

Das elektrostatische Potential, das vom Arginin-Cluster der Konstriktionszone ausgeht, ist also in der Lage, Malat-Ionen auf äußerst effektive Weise aus dem Solvens in den Kanal zu leiten. Von beiden Seiten kommend, wurden die Malat-Ionen, die in den Kanalbereich vorgedrungen waren, danach von Gruppen aus dem Arginin-Cluster gebunden (von Arg 75 aus dem extrazellulären Bereich, von Arg 38 aus dem Periplasma).

Die beiden Bindungen existierten über 800 ps bzw. 1 ns bis zum bisherigen Ende der Simulation. Dabei wurde das aus dem extrazellulären Raum stammende Malat zusätzlich von Lys 74 gebunden. Diese Stabilität der Bindungen deutet darauf hin, daß funktionell relevante Zustände erreicht wurden. Somit konnte die Bindung von Substrat-Ionen an Omp32 mit Hilfe von Moleküldynamik-Simulationen gezeigt werden.

Jedoch steht die Simulation einer Verbindung dieser zwei gebundenen Zustände, d.h. die Translokation der Malat-Ionen durch die Konstriktionszone noch aus. Aufgrund der Langfristigkeit der MD-Simulationen und der angesprochenen Stabilität der bislang beobachteten Bindungszustände bietet sich insbesondere an, diese Reaktion durch Kraftspektroskopie-Simulationen (Grubmüller *et al.*, 1996; Abschnitt 3.3.3) in beide Reaktionsrichtungen zu modellieren. Diese Technik hätte außerdem den Vorteil der Wiederholbarkeit der Simulationen, da sie die Reaktion erheblich beschleunigen würde.

Eine alternative Methode wurde in Dutzler *et al.* (2002a) für Maltoporin angewandt (s.o.). Jedoch wird hierbei der Reaktionsweg niedrigster potentieller Energie berechnet. So wird der gesamte Entropiebeitrag vernachlässigt und die Effekte der thermischen Bewegung aller Systembestandteile gehen nicht in das Ergebnis ein. Nachdem – wie in Abschnitt 5.3 beschrieben wurde – in der vorliegenden Arbeit ein starker Einfluß der thermischen Bewegung der Arginin- und Lysinseitenketten im Kanal auf die Ionentranslokation festgestellt wurde, erscheint diese Methode wenig geeignet, um die Passage von ionischen Substratmolekülen durch Omp32 zu modellieren.

Die biologische Funktion von Omp32, die Substrataufnahme in den periplasmatischen Raum, läßt die Erwartung aufkommen, daß die Translokation von Malat-Ionen von der extrazellulären Seite in das Periplasma leichter erfolgen sollte als die Bewegung der Substrate vom Periplasma in den extrazellulären Raum. Ein gewisser Hinweis auf ein derartiges Verhalten konnte bereits in den *Umbrella-Sampling*-Simulationen mit Chlorid-Ionen verzeichnet werden, da die Energiebarrieren zwischen den lokalen Energieminima z.T. stark unterschiedlich in bezug auf die Bewegungsrichtung des Ions waren (siehe Abschnitt 5.3.3). Eine solche Situation könnte, insbesondere für die ausgedehnten Malat-Ionen, mit verschiedenen

Beweglichkeiten der assoziierten Basen erklärt werden.

Von der extrazellulären und der periplasmatischen Solvensregion aus ergibt sich eine näherungsweise identische Energiedifferenz zum globalen Energieminimum im Kanal von Omp32 (abgesehen vom transmembranen Donnan-Potential). Somit könnte eine Art Rektifizierung am ehesten durch Unterschiede in der Dynamik der beteiligten Gruppen zustande kommen, d.h., daß ein Transfer in Richtung des Periplasmas stärker durch die Seitenkettendynamik gefördert wird als der umgekehrte Translokationsweg.

Abschließend betrachtet, zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, daß bakterielle Porine verschiedene Stufen der Spezialisierung erreicht haben, die strukturell begründet sind und im Zusammenhang mit ihrer biologischen Funktion stehen. Die intensive Untersuchung der Struktur-Funktionsbeziehungen weiterer Porine – neben dem unspezifischen OmpF und dem hier betrachteten Omp32 – ist lohnenswert, da zu erwarten ist, daß sich neue Formen der Spezialisierung in diesen Kanalproteinen finden lassen.

7 Literatur

- Achouak, W., Heulin, T. und Pagès, J. M. (2001). Multiple facets of bacterial porins. *FEMS Microbiol. Lett.* **199**: 1-7.
- Alexov, E. und Gunner, M. R. (1997). Incorporating protein conformational flexibility into the calculation of pH-dependent protein properties. *Biophys. J.* **72**: 2075-2093.
- Altobelli, G., Nacheva, G., Todorova, K., Ivanov, I. und Karshikoff, A. (2001). Role of the C-terminal chain in human interferon γ stability: an electrostatic study. *Proteins* **43**: 125-133.
- Bashford, D. (1997). An object-oriented programming suite for electrostatic effects in biological molecules. In: Ishikawa, Y., Oldehoeft, R. R., Reynders, J. V. W. und Tholburn, M., editors. Scientific computing in object-oriented parallel environments, volume 1343 of lecture notes in computer science. Springer Verlag, Berlin, 233-240.
- Bashford, D. und Karplus, M. (1990). pK_a 's of ionizable groups in proteins: atomic detail from a continuum electrostatic model. *Biochemistry*. **29**: 10219-10225.
- Benz, R., Janko, K., Boos, W. und Lauger, P. (1978). Formation of large, ion-permeable membrane channels by the matrix protein (porin) of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **511**: 305-319.
- Benz, R., Janko, K. und Lauger, P. (1979). Ionic selectivity of pores formed by the matrix protein (porin) of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta*. **551**: 238-247.
- Benz, R., Darveau, R. P. und Hancock, R. E. W. (1984). Outer-membrane protein PhoE from *Escherichia coli* forms anion-selective pores in lipid-bilayer membranes. *Eur. J. Biochem.* **140**: 319-324.
- Berendsen, H. J. C., Postma, J. P. M., van Gunsteren, N. F., DiNola, A. und Haak, J. R. (1984). Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J. Chem. Phys.* **81**: 3684-3690.

-
- 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 Res.* **28**: 235-242.
- Bernèche, S. und Roux, B. (2000). Molecular dynamics of the KcsA K⁺ channel in a bilayer membrane. *Biophys. J.* **78**: 2900-2917.
- Bernèche, S. und Roux, B. (2001). Energetics of ion conduction through the K⁺ channel. *Nature* **414**: 73-77.
- Beroza, P., Fredkin, D. R., Okamura, M. Y. und Feher, G. (1991). Protonation of interacting residues in a protein by a Monte-Carlo method – application to lysozyme and the photosynthetic reaction center of *Rhodobacter sphaeroides*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 5804-5808.
- Berry, M. B., Meador, B., Bilderback, T., Liang, P., Glaser, M. und Phillips, G. N. Jr. (1994). The closed conformation of a highly flexible protein: the structure of *E. coli* adenylate kinase with bound AMP and AMPPNP. *Proteins* **19**: 183-198.
- Beveridge, D. L. und DiCapua, F. M. (1989). Free energy via molecular simulation: applications to chemical and biomolecular systems. *Annu. Rev. Biophys. Chem.* **18**: 431-492.
- Björkstén, J., Soares, C. M., Nilsson, O. und Tapia, O. (1994). On the stability and plastic properties of the interior L3 loop in *R. capsulatus* porin: a molecular dynamics study. *Protein Eng.* **7**: 487-494.
- Bofill, L., Wessolossky, M., Vicent, E., Salas, M., Besso, J., Merentes, A., Istúriz, R., Guzmán, M. und Murillo, J. (1996). Septic shock due to *Comamonas acidovorans*: a most unusual association. *Infect. Dis. Clin. Pract.* **5**: 73-74.
- Brooks, B., Bruccoleri, R., Olafson, B., States, D., Swaminathan, S. und Karplus, M. (1983). CHARMM: A program for macromolecular energy minimization and dynamics calculations. *J. Comput. Chem.* **4**: 187-217.

- Brunen, M., Engelhardt, H., Schmid, A. und Benz, R. (1991). The major outer membrane protein of *Acidovorax delafieldii* is an anion-selective porin. *J. Bacteriol.* **173**: 4182-4187.
- Brunen, M. und Engelhardt, H. (1995). Significance of positively charged amino acids for the function of the *Acidovorax delafieldii* porin Omp34. *FEMS Microbiol. Lett.* **126**: 127-132.
- Brünger, A. T. und Karplus, M. (1988). Polar hydrogen positions in proteins: empirical energy placement and neutron diffraction comparison. *Proteins* **4**: 148-156.
- Capener, C. E. und Sansom, M. S. P. (2002). Molecular dynamics simulations of a K channel model: sensitivity to changes in ions, waters, and membrane environment. *J. Phys. Chem. B* **106**: 4543-4551.
- Cardenas, A. E., Coalson, R. D. und Kurnikova, M. G. (2000). Three-dimensional Poisson-Nernst-Planck theory studies: influence of membrane electrostatics on gramicidin A channel conductance. *Biophys. J.* **79**: 80-93.
- Cowan, S. W., Schirmer, T., Rummel, G., Steiert, M., Ghosh, R., Pauptit, R. A., Jansonius, J. N. und Rosenbusch, J. P. (1992). Crystal structures explain functional properties of two *E. coli* porins. *Nature* **358**: 727-733.
- de Groot, B. L. und Grubmüller, H. (2001). Water permeation across biological membranes: mechanism and dynamics of Aquaporin-1 and GlpF. *Science* **294**: 2353-2357.
- Dewar, M. J. S. und Thiel, W. (1977). Ground states of molecules. 38. The MNDO method. Approximations and parameters. *J. Am. Chem. Soc.* **99**: 4899-4907.
- Dieckmann, G. R., Lear, J. D., Zhong, Q., Klein, M. L., DeGrado, W. F. und Sharp, K. A. (1999). Exploration of the structural features defining the conduction properties of a synthetic ion channel. *Biophys. J.* **76**: 618-630.

-
- Dillet, V., van Etten, R.L. und Bashford, D. (2000). Stabilization of charges and protonation states in the active site of the protein tyrosine phosphatase: a computational study. *J. Phys. Chem. B* **104**: 11321-11333.
- Dutzler, R., Schirmer, T., Karplus, M. und Fischer, S. (2002a). Translocation mechanism of long sugar chains across the maltoporin membrane channel. *Structure* **10**: 1273-1284.
- Dutzler, R., Campbell, E. B., Cadene, M., Chait, B. T. und MacKinnon, R. (2002b). X-ray structure of a ClC chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity. *Nature* **415**: 287-294.
- Dutzler, R., Rummel, G., Alberti, S., Hernández-Allés, S., Phale, P. S., Rosenbusch, J. P., Benedi, V. J. und Schirmer, T. (1999). Crystal structure and functional characterization of OmpK36, the osmoporin of *Klebsiella pneumoniae*. *Structure* **7**: 425-434.
- Eisenberg, R. S., Kłosek, M. M. und Schuss, Z. (1995). Diffusion as a chemical reaction: stochastic trajectories between fixed concentrations. *J. Chem. Phys.* **102**: 1767-1780.
- Eisenberg, R. S. (1996). Computing the field in proteins and membranes. *J. Membr. Biol.* **150**: 1-25.
- Eisenberg, R. S. (1999). From structure to function in open ionic channels. *J. Membr. Biol.* **171**: 1-24.
- Engelhardt, H. und Peters, J. (1998). Structural research on surface layers: a focus on stability, surface layer homology domains, and surface layer–cell wall interactions. *J. Struct. Biol.* **124**: 276-302.
- Eppens, E. F., Saint, N., van Gelder, P., van Boxtel, R. und Tommassen, J. (1997). Role of the constriction loop in the gating of outer-membrane porin PhoE of *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **415**: 317-320.
- Essmann, U., Perera, L., Berkowitz, M. L., Darden, T., Lee, H. und Pedersen, L. G. (1995). A smooth particle mesh Ewald method. *J. Chem. Phys.* **103**: 8577-8593.

- Ewald, P. (1921). Die Berechnung optischer und elektrostatischer Gitterpotentiale. *Ann. Phys.* **64** 253-287.
- Eyring, H. (1935). The activated complex in chemical reactions. *J. Chem. Phys.* **3**: 107-115.
- Eyring, H. (1936). Viscosity, plasticity, and diffusion as examples of absolute reaction rates. *J. Chem. Phys.* **4**: 283-291.
- Faraldo-Gómez, J. D., Smith, G. R. und Sansom, M. S. P. (2002). Setting up and optimization of membrane protein simulations. *Eur. Biophys. J.* **31** 217-227.
- Ferguson, A. D., Hofmann, E., Coulton, J. W., Diederichs, K. und Welte, W. (1998). Siderophore-mediated iron transport: crystal structure of FhuA with bound lipopolysaccharide. *Science* **282**: 2215-2220.
- Feynman, R. P., Leighton, R. B. und Sands, M. (1965). The Feynman lectures on physics, Vol. I. Addison-Wesley, Reading, USA.
- Fischer, S. und Karplus, M. (1992). Conjugate peak refinement: an algorithm for finding reaction paths and accurate transition states in systems with many degrees of freedom. *Chem. Phys. Lett.* **194**: 252-261.
- Forrest, L. R. und Sansom, M. S. P. (2000). Membrane simulations: bigger and better? *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**: 174-181.
- Forst, D., Welte, W., Wacker, T. und Diederichs, K. (1998). Structure of the sucrose-specific porin ScrY from *Salmonella typhimurium* and its complex with sucrose. *Nat. Struct. Biol.* **5**: 37-46.
- Gillespie, D. und Eisenberg, R. S. (2002). Physical descriptions of experimental selectivity measurements in ion channels. *Eur. Biophys. J.* **6**: 454-466.
- Gilson, M. K., Sharp, K. A. und Honig, B. H. (1987). Calculating the electrostatic potential of molecules in solution: Method and error assessment. *J. Comput. Chem.* **9**: 327-335.

-
- Gilson, M. K. (1995). Theory of electrostatic interactions in macromolecules. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **5**: 216-223.
- Gerbl-Rieger, S., Engelhardt, H., Peters, J., Kehl, M., Lottspeich, F. und Baumeister, W. (1992). Topology of the anion-selective porin Omp32 from *Comamonas acidovorans*. *J. Struct. Biol.* **108**: 14-24.
- Goldman, D. E. (1943). Potential, impedance, and rectification in membranes. *J. Gen. Physiol.* **27**: 37-60.
- Grubmüller, H., Heymann, B. und Tavan, P. (1996). Ligand Binding: Molecular mechanics calculation of the streptavidin-biotin rupture force. *Science* **271**: 997-999.
- Gunner, M. R., Saleh, M. A., Cross, E., ud-Doula, A. und Wise, M. (2000). Backbone dipoles generate positive potentials in all proteins: origins and implications of the effect. *Biophys. J.* **78**: 1126-1144.
- Hadjidimos, A. (2000). Successive overrelaxation (SOR) and related methods. *J. Comp. Appl. Math.* **123**: 177-199.
- Hamer, W. J. (1971). Properties of dielectrics. In: Weast, R. C., Handbook of chemistry and physics. Cleveland, Ohio: The Chemical Rubber Co. Abschnitt E-67.
- Hancock, R. E. W., Karunaratne, D. N. und Bernegger-Egli, C. (1994). Molecular organization and structural role of the outer membrane macromolecules. In: Ghuysen, J. M. und Hagenbeck, R., editors. Bacterial cell wall. Elsevier Science B.V., Amsterdam, Niederlande. 263-279.
- Harvey, S. C. (1989). Treatment of electrostatic effects in macromolecular modelling. *Proteins* **5**: 78-92.
- Harrison, R. J., Nichols, J. A., Straatsma, T. P., Dupuis, M., Bylaska, E. J., Fann, G. I., Windus, T. L., Apra, E., Anchell, J., Bernholdt, D., Borowski, P., Clark, T., Clerc, D., Dachselt, H., de Jong, B., Deegan, M., Dylla, K., Elwood, D., Früchtl, H., Glendenning, E., Gutowski, M., Hess, A., Littlefield, R., Long, X., Meng,

- B., Nieplocha, J., Niu, S., Rosing, M., Sandrone, G., Stave, M., Taylor, H., Thomas, G., van Lenthe, J., Wolinski, K., Wong, A., und Zhang, Z. (2000). NW-Chem, a computational chemistry package for parallel computers, version 4.0, High Performance Computational Chemistry Group, Pacific Northwest National Laboratory, Richland, Washington, USA.
- Heymann, B., und Grubmüller, H. (2001). Molecular dynamics force probe simulations of antibody/antigen unbinding: entropic control and nonadditivity of unbinding forces. *Biophys J.* **81**: 1295-1313.
- Hille, B. (1992). Ion channels of excitable membranes, second edition. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Hirsch, A., Breed, J., Saxena, K., Richter, O. M. H., Ludwig, B., Diederichs, K. und Welte, W. (1997). The structure of porin from *Paracoccus denitrificans* at 3.1 Å resolution. *FEBS Lett.* **404**: 208-210.
- Hockney, R. W. (1970). The potential calculation and some applications. *Meth. Comp. Phys.* **9**: 136-211.
- Hodgkin, A. L. und Katz, B. (1949). The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid. *J. Physiol.* **108**: 37-77.
- Höltje, J. V. (1998). Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 181-203.
- Hoover, W. G. (1985). Canonical dynamics: equilibrium phase space distributions. *Phys. Rev. A* **31**: 1695-1697.
- Hynes, J. T. (1985). Chemical reaction dynamics in solution. *Ann. Rev. Phys. Chem.* **36**: 573-597.
- Im, W., Seefeld, S. und Roux, B. (2000). A grand canonical Monte Carlo–Brownian dynamics algorithm for simulating ion channels. *Biophys. J.* **79**: 788-801.
- Im, W. und Roux, B. (2002a). Ion permeation and selectivity of OmpF porin: a theoretical study based on molecular dynamics, Brownian dynamics, and continuum electrodiffusion theory. *J. Mol. Biol.* **322**: 851-869.

-
- Im, W. und Roux, B. (2002b). Ions and counterions in a biological channel: a molecular dynamics simulation of OmpF porin from *Escherichia coli* in an explicit membrane with 1 M KCl aqueous salt solution. *J. Mol. Biol.* **319**: 1177-1197.
- Jap, B. K. und Walian, P. J. (1996). Structure and functional mechanism of porins. *Physiol. Rev.* **76**: 1073-1088.
- Jensen, M. Ø., Tajkhorshid, E. und Schulten, K. (2001). The mechanism of glycerol conduction in aquaglyceroporins. *Structure* **9**: 1083-1093.
- Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J., Madura, J. D., Impey, R. W. und Klein, M. L. (1983). Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* **79**: 926-935.
- Kabsch, W. und Sander, C. (1983). Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers* **22**: 2577-2637.
- Karplus, M. und McCammon, J. A. (2002). Molecular dynamics simulations of biomolecules. *Nat. Struct. Biol.* **9**: 646-652.
- Karshikoff, A. (1995). A simple algorithm for the calculation of multiple site titration curves. *Protein Eng.* **8**: 243-248.
- Karshikoff, A., Spassov, V., Cowan, S. W., Ladenstein, R. und Schirmer, T. (1994). Electrostatic properties of two porin channels from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **240**: 372-384.
- Klapper, I., Hagstrom, R., Fine, R., Sharp, K. und Honig, B. (1986). Focusing of electric fields in the active site of Cu-Zn Superoxide Dismutase: effects of ionic strength and amino-acid modification. *Proteins* **1**: 47-59.
- Koebnik, R., Locher, K. P., and van Gelder, P. (2000). Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Mol. Microbiol.* **37**: 239-253.

- Kottalam, J. und Case, D. A. (1988). Dynamics of ligand escape from the heme pocket of myoglobin. *J. Am. Chem. Soc.* **110**: 7690-7697.
- Koronakis, V. (2003). TolC – the bacterial exit duct for proteins and drugs. *FEBS Lett.* **555**: 66-71.
- Koumanov, A., Rüterjans, H. und Karshikoff, A. (2002). Continuum electrostatic analysis of irregular ionization and proton allocation in proteins. *Proteins* **46**: 85-96.
- Koumanov, A., Zachariae, U., Engelhardt, H. und Karshikoff, A. (2003). Improved 3D continuum calculations of ion flux through membrane channels. *Eur. Biophys. J.* **32**: 689-702.
- Kramers, H. A. (1940). *Physica* **7**: 284-304.
- Kreusch, A. und Schulz, G. E. (1994). Refined structure of the porin from *Rhodopseudomonas blastica*. Comparison with the porin from *Rhodobacter capsulatus*. *J. Mol. Biol.* **243**: 891-903.
- Kurnikova, M. G., Coalson, R. D., Graf, P. und Nitzan, A. (1999). A lattice relaxation algorithm for three- dimensional Poisson-Nernst-Planck theory with application to ion transport through the gramicidin A channel. *Biophys. J.* **76**: 642-656.
- Lancaster, C. R. D., Michel, H., Honig, B. und Gunner, M. R. (1996). Calculated coupling of electron and proton transfer in the photosynthetic reaction center of *Rhodopseudomonas viridis*. *Biophys. J.* **70**: 2469-2492.
- Leach, A. R. (2001). Molecular modelling – principles and applications, second edition. Prentice Hall, Harlow, Großbritannien..
- Levitt, D. G. (1999). Modeling of ion channels. *J. Gen. Physiol.* **113**: 789-794.
- Lins, D. R. und Straatsma, T. P. (2001). Computer simulation of the rough Lipopolysaccharide membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biophys. J.* **81**: 1037-1046.

-
- Läuger, P. (1973). Ion transport through pores: a rate theory analysis. *Biochim. Biophys. Acta* **311**: 423-441.
- MacKerell, A. D. Jr., Bashford, D., Bellott, M., Dunbrack, R. L. Jr., Evanseck, J. D., Field, M. J., Fischer, S., Gao, J., Guo, H., Ha, S., Joseph-McCarthy, D., Kuchnir, L., Kuczera, K., Lau, F. T. K., Mattos, C., Michnick, S., Ngo, T., Nguyen, D. T., Prodhom, B., Reiher, W. E. III, Roux, B., Schlenkrich, M., Smith, J. C., Stote, R., Straub, J., Watanabe, M., Wiorkiewicz-Kuczera, J., Yin, D. und Karplus, M. (1998). All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *J. Phys. Chem. B* **102**: 3586-3616.
- Mafe, S., Ramirez, P. und Alcaraz, A. (2003). Simple molecular model for the binding of antibiotic molecules to bacterial ion channels. *J. Chem. Phys.* **119**: 8097-8102.
- Magalhaes, A., Maigret, B., Hoflack, J., Gomes, J. N. F. und Scheraga, H. A. (1994). Contribution of unusual Arginine-Arginine short-range interactions to stabilization and recognition in proteins. *J. Prot. Chem.* **13**:195-215.
- Mathes, A. und Engelhardt, H. (1998). Nonlinear and asymmetric open channel characteristics of an ion-selective porin in planar membranes. *Biophys. J.* **75**: 1255-1262.
- Metropolis, N., Rosenbluth, A. W., Rosenbluth, M. N., Teller, A. H. und Teller, E. (1953). Equation of state calculations by fast computing machines. *J. Chem. Phys.* **21**: 1087-1092.
- Miteva, M., Demirev, P. A. und Karshikoff, A. (1997). Multiply-protonated protein ions in the gas phase: calculation of the electrostatic interactions between charged sites. *J. Phys. Chem. B* **101**: 9645-9650.
- Morais-Cabral, J. H., Zhou, Y. und MacKinnon, R. (2001). Energetic optimization of ion conduction rate by the K⁺ selectivity filter. *Nature* **414**: 37-42.
- Müller, D. und Engel, A. (1999). Voltage and pH-induced channel closure of porin OmpF visualized by atomic force microscopy. *J. Mol. Biol.* **285**: 1347-1351.

- Nestorovich, E. M., Danelon, C., Winterhalter, M. und Bezrukov, S. M. (2002). Designed to penetrate: time-resolved interaction of single antibiotic molecules with bacterial pores. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 9789-9794.
- Nestorovich, E. M., Rostovtseva, T. K. und Bezrukov, S. M. (2003). Residue ionization and ion transport through OmpF channels. *Biophys. J.* **85**: 3718-3729.
- Nicholls, A. und Honig, B. (1991). A rapid finite difference algorithm, utilizing successive over-relaxation to solve the Poisson-Boltzmann equation. *J. Comput. Chem.* **12**: 435-445.
- Nikaido, H. (1992). Porins and specific channels of bacterial outer membranes. *Mol. Microbiol.* **6**: 435-442.
- Nonner, W., Chen, D. P. und Eisenberg, B. (1998). Anomalous mole fraction effect, electrostatics und binding in ionic channels. *Biophys. J.* **74**: 2327-2334.
- Nosé, S. und Klein, M. L. (1983). Constant pressure molecular dynamics for molecular systems. *Mol. Phys.* **52**: 255-268.
- Ohtaki, H. und Radnai, T. (1993). Structure and dynamics of hydrated ions. *Chem. Rev.* **93**: 1157-1204.
- Partenskii, M. B. und Jordan, P. C. (1992). Theoretical perspectives on ion-channel electrostatics: continuum and microscopic approaches. *Quart. Rev. Biophys.* **25**: 477-510.
- Phale P. S., Philippsen, A., Kiefhaber, T., Koebnik, R., Phale, V. P., Schirmer, T. und Rosenbusch, J. P. (1998). Stability of trimeric OmpF porin: the contributions of the latching loop L2. *Biochemistry* **37**: 15663-670.
- Phale, P. S., Philippsen A., Widmer, C., Phale, V. P., Rosenbusch, J. P. und Schirmer, T. (2001). Role of charged residues at the OmpF porin channel constriction probed by mutagenesis and simulation. *Biochemistry* **40**: 6319-6325.

-
- Przybylski, M., Glocker, M. O., Nestel, U., Schnaible, V., Bluggel, M., Diederichs, K., Weckesser, J., Schad, M., Schmid, A., Welte, W. und Benz, R. (1996). X-ray crystallographic and mass spectrometric structure determination and functional characterization of succinylated porin from *Rhodobacter capsulatus*: implications for ion selectivity and single-channel conductance. *Protein Sci.* **5**: 1477-1489.
- Rashin, A. A., Iofin, M. und Honig, B. (1986). Internal cavities and buried waters in globular proteins. *Biochemistry* **25**: 3619-3625.
- Robertson, K. M. und Tieleman, D. P. (2002). Orientation and interactions of dipolar molecules during transport through OmpF porin. *FEBS Letters.* **528**: 53-57.
- Roux, B. und MacKinnon, R. (1999). The cavity and pore helices in the KcsA K⁺ channel: electrostatic stabilization of monovalent cations. *Science* **285**: 100-102.
- Ryckaert, J. P., Ciccotti, G. und Berendsen, H. J. C. (1977). Numerical integration of cartesian equations of motion of a system with constraints – molecular-dynamics of n-alkanes. *J. Comput. Phys.* **23**: 327-341.
- Saint, N., Kuo-Long, L., Widmer, C., Luckey, M., Schirmer, T. und Rosenbusch, J.P. (1996). Structural and functional characterization of OmpF porin mutants selected for larger pore size. *J. Biol. Chem.* **271**: 20676-20680.
- Sansom, M. S. P., Smith, G. R., Adcock, C. und Biggin, P. C. (1997). The dielectric properties of water within model transbilayer pores. *Biophys. J.* **73**: 2404-2415.
- Sansom, M. S. P., Shrivastava, I. H., Ranatunga, K. M. und Smith, G. R. (2000). Simulations of ion channels - watching ions and water move. *Trends Biochem. Sci.* **25**: 368-374.
- Saxena, K., Drosou, V., Maier, E., Benz, R. und Ludwig, B. (1999). Ion selectivity reversal and induction of voltage-gating by site-directed mutations in the *Paracoccus denitrificans* porin. *Biochemistry.* **38**: 2206-2212.

- Schirmer, T., Keller, T. A., Wang, Y. F., Rosenbusch, J. P. (1995). Structural basis for sugar translocation through maltoporin channels at 3.1 Å resolution. *Science* **267**: 512-514.
- Schirmer, T. (1998). General and specific porins from bacterial outer membranes. *J. Struct Biol.* **121**: 101-109.
- Schirmer, T. und Phale, P. S. (1999). Brownian Dynamics simulation of ion flow through porin channels. *J. Mol. Biol.* **294**: 1159-1167.
- Schlichting, I. und Reinstein, J. (1999). pH influences fluoride coordination number of the AlF_x phosphoryl transfer transition state analog. *Nat. Struct. Biol.* **6**: 721-723.
- Schulz, G. E. (1996). Porins: general to specific, native to engineered passive pores. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **6**: 485-490.
- Schulz, G. E. (2003). Transmembrane β -barrel proteins. *Adv. Protein Chem.* **63**: 47-70.
- Sen, K., Hellman, J. und Nikaido, H. (1988). Porin channels in intact cells of *Escherichia coli* are not affected by Donnan potentials across the outer membrane. *J. Biol. Chem.* **263**: 1182-1187.
- Senapati, S., and Chandra, A. (2001). Dielectric constant of water in a nanocavity. *J. Phys. Chem. B* **105**: 5106-5109.
- Spassov, V. Z., Ladenstein, R. und Karshikoff, A. (1997). Optimization of the electrostatic interactions between ionized groups and peptide dipoles in proteins. *Protein Sci.* **6**: 1190-1195
- Spassov, V. Z. und Bashford, D. (1998). Multiple-site ligand binding to flexible macromolecules: separation of global and local conformational change and an iterative mobile clustering approach. *J. Comp. Chem.* **20**:1091-1111.
- Suenaga, A., Komeiji, Y., Uebayasi, M., Meguro, T., Saito, M. und Yamato, I. (1998). Computational observation of an ion permeation through a channel protein. *Biosci. Rep.* **18**: 39-48.

-
- Tanford, C. (1961). Physical chemistry of macromolecules. John Wiley & Sons, NY, USA.
- Tanford, C. und Roxby, R. (1972). Interpretation of protein titration curves. Application to lysozyme. *Biochemistry* **11**: 2192-2198.
- Tieleman, D. P. und Berendsen, H. J. C. (1998). A molecular dynamics study of the pores formed by *Escherichia coli* OmpF porin in a fully hydrated palmitoyl-oleoyl-phosphatidylcholine bilayer. *Biophys. J.* **74**: 2786-2801.
- Tieleman, D. P., Biggin, P. C., Smith, G. R. und Sansom, M. S. P. (2001). Simulation approaches to ion channel structure-function relationships. *Q. Rev. Biophys.* **34**: 473-561.
- Torrie, G. M. und Valleau, J. P. (1977). Nonphysical sampling distributions in Monte-Carlo free-energy estimation: umbrella sampling. *J. Comp. Phys.* **23**: 187-199.
- Ullmann, G. M. und Knapp, E. W. (1999). Electrostatic models for computing protonation and redox equilibria in proteins. *Eur. Biophys. J.* **28**: 533-551.
- van der Spoel, D., van Buuren, A. R., Apol, E., Meulenhoff, P. J., Tieleman, D. P., Sijbers, A. L. T. M., Hess, B., Feenstra, K. A., Lindahl, E., van Drunen, R. und Berendsen, H. J. C. (2002). Gromacs user manual, version 3.1.1, Nijenborgh 4, 9747 AG Groningen, Niederlande. Internet: www.gromacs.org
- van Gelder, P., Steiert, M., Elkhatabi, M., Rosenbusch, J. P. und Tommassen, J. (1996). Structural and functional characterization of a His-tagged PhoE pore protein of *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **229**: 869-875.
- van Gunsteren, W. F. und Berendsen, H. J. C. (1990). Moleküldynamik-Computersimulationen; Methodik, Anwendungen und Perspektiven in der Chemie. *Angew. Chem.* **102**: 1020-1055.
- Venable, R., Zhang, Y., Hardy, B. und Pastor, R. (1993). Molecular dynamics simulations of lipid bilayer and of hexadecane: an investigation of membrane fluidity. *Science* **262**: 223-226.

- Verlet, L. (1967). Computer 'experiments' on classical fluids. I. Thermodynamical properties of Lennard-Jones molecules. *Phys. Rev.* **159**: 98-103.
- Voges, D. und Karshikoff, A. (1998). A model for a local static dielectric constant in macromolecules. *J. Chem. Phys.* **108**: 2219-2227.
- Warwicker, J. und Watson, N.C. (1982). Calculation of the electric field potential in the active site cleft due to alpha-helix dipoles. *J. Mol. Biol.* **157**: 671-679.
- Watanabe, M., Rosenbusch, J., Schirmer, T. und Karplus, M. (1997). Computer simulations of the OmpF porin from the outer membrane of *Escherichia coli*. *Biophys. J.* **72**: 2094-2103.
- Weiss, M. S., und Schulz, G. E. (1992). Structure of porin refined at 1.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **227**: 493-509.
- Weiss, M. S., Abele, U., Weckesser, J., Welte, W., Schiltz, E. und Schulz, G. E. (1991). Molecular architecture and electrostatic properties of a bacterial porin. *Science* **254**: 1627-1630.
- Wen, A., Fegan, M., Hayward, C., Charkaborty, S. und Sly, L. I. (1999). Phylogenetic relationships among members of the Comamonadaceae, and description of *Delftia acidovorans* (den Dooren de Jong 1926 and Tamaoka et al. 1987) gen. nov., comb. nov. *Intl. J. Syst. Bacteriol.* **49**: 567-576.
- Willems, A., P. de Vos und J. de Ley. (1992). The genus Comamonas. In: A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder und K. H. Schleifer, editors. The prokaryotes. Third edition. Springer-Verlag, New York, NY, USA. 2583-2590.
- Wolf, T. B. und Roux, B. (1994). Molecular dynamics simulation of the gramicidin channel in a phospholipid bilayer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 11631-11635.
- Wolf, T. B. und Roux, B. (1996). Structure, energetics and dynamics of lipid-protein interactions: a molecular dynamics study of the gramicidin A channel in a DMPC bilayer. *Proteins* **24**: 92-114.

-
- Yang, A. S., Gunner, M. R., Sampogna, R., Sharp, K. und Honig, B. (1993). On the calculation of pK_a s in proteins. *Proteins* **15**: 252-265.
- Zachariae, U., Koumanov, A., Engelhardt, H. und Karshikoff, A. (2002). Electrostatic properties of the anion selective porin Omp32 from *Delftia acidovorans* and of the arginine cluster of bacterial porins. *Protein Sci.* **11**: 1309-1319.
- Zachariae, U., Helms, V. und Engelhardt, H. (2003). Multistep mechanism of chloride translocation in a strongly anion-selective porin channel. *Biophys. J.* **85**: 954-962.
- Zeth, K., Diederichs, K., Welte, W. und Engelhardt, H. (2000). Crystal structure of Omp32, the anion-selective porin from *Comamonas acidovorans*, in complex with a periplasmic peptide at 2.1 Å resolution. *Structure* **8**: 981-999.
- Zeth, K. (2000). Doktorarbeit, Technische Universität München.
- Zhou, H. X. (1994). Macromolecular electrostatic energy within the nonlinear Poisson-Boltzmann equation. *J. Chem. Phys.* **100**: 3152-3162.

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Wolfgang Baumeister für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Möglichkeit, deren hervorragende Ressourcen am Max-Planck-Institut für Biochemie nutzen zu können.

Besonders herzlich möchte ich mich bei Herrn Dr. Harald Engelhardt für die interessante Themenstellung und die Möglichkeit, eine Reihe eigener Ideen in die Arbeit einbringen zu können, sowie das stets offene Ohr für Fragen bedanken.

Bei den Mitgliedern der Engelhardt-Arbeitsgruppe, Thomas "Fozzy" Klühspies, Johann Lubieniecki und Erik Roth, möchte ich mich sehr für die angenehme, humorvolle Arbeitsatmosphäre und viele interessante Diskussionen bedanken.

Essentiell für den Erfolg der Arbeit war die Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Volkhard Helms, Universität Saarbrücken, dem ich neben den vielen wissenschaftlichen Diskussionen auch für unzählige wertvolle persönliche Ratschläge Dank schulde.

In ähnlichem Maße war die Zusammenarbeit mit Dr. Andrey Karshikoff aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Rudolf Ladenstein am Karolinska Institut in Huddinge bei Stockholm für die Arbeit bedeutsam; bei beiden möchte ich mich für die temporäre Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und die erfolgreichen Kooperationen bedanken. Besonders erwähnen möchte ich hierbei Dr. Assen Koumanov.

Bei Prof. Dr. Tilman Schirmer, Biozentrum Basel, bedanke ich mich herzlich für die Hilfe bei Brownian-Dynamics-Simulationen.

Herzlich danke ich Dr. Kornelius Zeth für viele hilfreiche Hinweise und Gespräche über "seine" Struktur von Omp32.

Bei den übrigen Mitgliedern der Abteilung Baumeister bedanke ich mich für die nette Arbeitsatmosphäre und die Hilfsbereitschaft, wann immer ich Fragen hatte. Besonders erwähnen möchte ich hierbei Friedrich Förster, Dr. Reiner Hegerl, William Del Net, Dr. Beate Rockel und Drs. Gundula und Jürgen Bosch. Christine Kofler danke ich für eine Menge an Aufmunterungen und Manner-Waffeln.

Gabriele Schweikert danke ich – u.a. – für das sorgfältige und hilfreiche Korrekturlesen der Arbeit.

Meinen Eltern und meiner Großmutter Martha Tschierschke danke ich sehr herzlich für die Unterstützung während des gesamten Studiums.