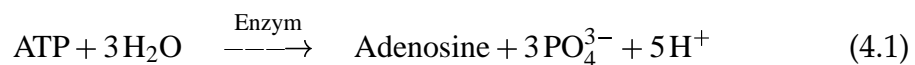


Kapitel 4

Domänenbewegung

4.1 5'-Nucleotidase

Neuronale Information wird durch den synaptischen Spalt chemisch weiter geleitet. Als extrazelluläre Botenstoffe dienen dort ATP, ADP, UDP und Ap₄A, die an den P₂-Rezeptor der Postsynapse binden. Zur Terminierung eines neuronalen Prozesses hydrolysieren Phosphoesterasen diese Moleküle [92], z. B.



und regulieren so die Neurotransmitteraktivität. Zu den Phosphoesterasen gehören die membrangebundene Ecto-Nucleotidase sowie die im synaptischen Spalt freien Nucleotidasen.

Die hier untersuchte 5'-Nucleotidase (5'-NT) aus *E. coli* gehört zur Gruppe der dinuklearen Metallphosphoesterasen und fungiert periplasmatisch als UDP-Zucker-hydrolase und 5'-Nucleotidase. Sie dient vermutlich der Aufnahme von extrazellulären Nucleotiden.

Die Röntgenstruktur des Enzyms wurde von Knöfel und Sträter bei 1.7 Å Auflösung beschrieben [8]. 5'-NT ist ein 58 kDa Protein und besteht aus zwei Untereinheiten (Abb. 4.1), die durch eine α -Helix verbunden sind. C-terminal befindet sich die kleinere Untereinheit, die N-terminale große Untereinheit birgt das katalytische Zentrum des Enzyms an der Grenzfläche der beiden Untereinheiten.

Das katalytische Zentrum für die Hydrolyse besteht aus zwei Metallionen und einer Asparagin/Histidin-Dyade. Im katalytischen Zyklus deprotoniert ein Metallion als Lewissäure das nukleophil angreifende Wassermolekül. Das

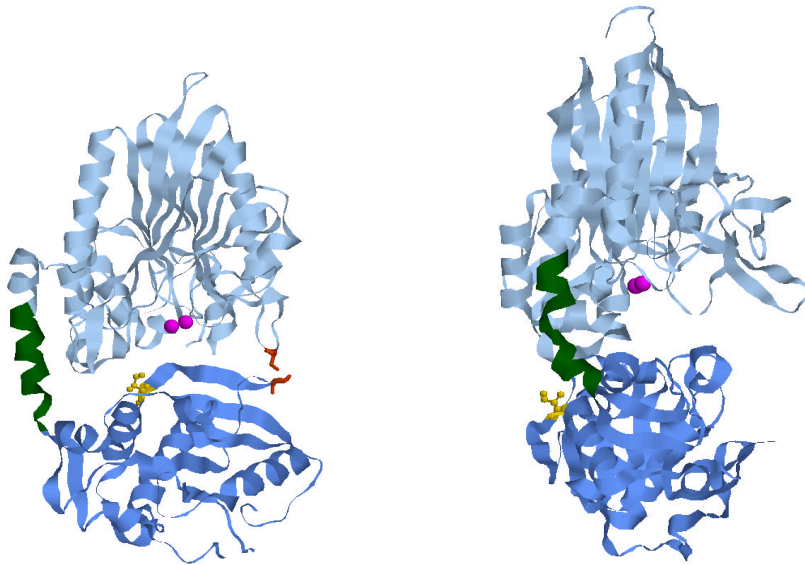


Abbildung 4.1: Röntgenstruktur der 5'-Nucleotidase [93]. Die große Untereinheit (hellblau) enthält ein Dimetallzentrum (rot) und ist über einen Gelenkbereich (grün) mit der kleinen Untereinheit (blau) verbunden, in der die Position 521 (gelb) mit einem Spinlabel markiert wurde. Links: offene Struktur, wird in der SPI-Mutante über eine Disulphidbrücke (Cysteine in rot) verankert. Rechts: geschlossene Struktur.

zweite Metallion unterstützt die Katalyse durch eine Ladungsstabilisierung des Übergangszustands [94]. Die Metallionen werden jeweils fünffach koordiniert, dabei sind vier der Liganden Aminosäurereste. Der fünfte Ligand kann in der offenen Form des Enzyms ein Carbonat sein, in der geschlossenen Form die Phosphatgruppe des Substrats. Zur Natur der beiden Metallionen wurden erst kürzlich neue Anhaltspunkte gefunden [95]. Da die Metallionen im Aufreinigungsprozeß dem Protein verloren gehen wurde das Medium analysiert und Zn^{II} gefunden. Daraus wurde geschlossen, daß mindestens eine Bindungsstelle mit diesem Ion besetzt ist. Die Aktivität des Enzyms mit Zn^{II} ist hundertfach geringer als mit Co^{II} . Wogegen durch Substitution mit Mn^{II} und Cu^{II} sowie $\text{Zn}^{\text{II}}/\text{Co}^{\text{II}}$ die katalytische Aktivität mit vergleichbarem Umsatz wiederhergestellt werden konnte. Die Aktivität des Proteins konnte durch eine Disulphidbrücke, welche die große mit der kleinen Untereinheit verbindet, um einen Faktor 250 reduziert werden. Dies zeigt das für den katalytischen Mechanismus eine Bewegung der beiden Domänen gegeneinander erforderlich ist [96]. Diese Domänenbewegung der 5'-Nucleotidase soll in diesem Kapitel untersucht werden. Zuvor werden qualitativ bekannte Domänenbewegungen vergestellt und vorhandene Information über diesen Prozeß an der 5'-NT erläutert.

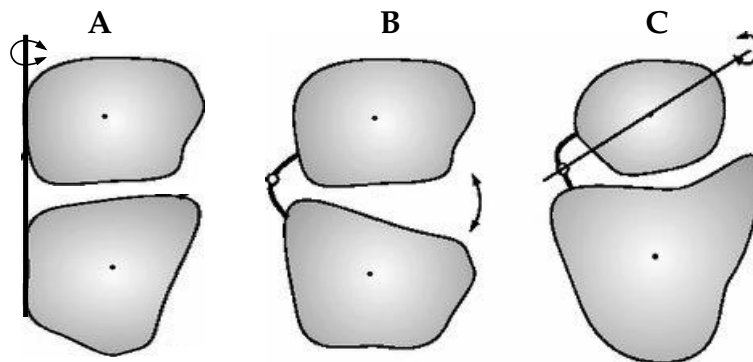


Abbildung 4.2: Drei Klassen der Domänenrotation: **A** reine Drehbewegung, **B** klassische Domänenschließbewegung, **C** Kugelgelenkbewegung. Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Norbert Sträter.

4.1.1 Domänenrotation

Die Bewegung von Proteindomänen über einen Gelenkbereich wird in drei Klassen aufgeteilt [7]. Die klassische Domänenschließbewegung (Abb. 4.2B) kann als gegenläufige Rotation von zwei Subdomänen um eine Achse, welche senkrecht zur Verbindungsachse beider Zentren liegt, verstanden werden. Bei der 'reinen Drehbewegung' (Abb. 4.2A) liegt die Rotationsachse parallel zur Domänenverbindungsachse. Dieser Typ von Domänenbewegung ist mit großen Scherkräften verbunden. Die 'Kugelgelenkbewegung' (Abb. 4.2C) zeichnet sich durch eine Drehachse aus, die innerhalb einer der Domänen liegt. Die eine Proteinuntereinheit rotiert auf der Oberfläche der anderen. Bei den meisten beobachteten Bewegungen diesen Typs liegt die Rotationsachse mehr als 10 Å vom Massenschwerpunkt der Untereinheit entfernt. Auch bei dieser Bewegung müssen Scherkräfte aufgebracht werden. Während sich bei den ersten beiden Rotationstypen bei Öffnen und Schließen die lösemittel-exponierte Oberfläche ändert, bleibt diese Größe bei einer Kugelgelenkbewegung in jeder Position annähernd gleich.

Die 5'-Nucleotidase (5'-NT) konnte in neun unterschiedlichen Konformationen kristallisiert werden [93]. Die individuellen Domänen zeigen dabei in den verschiedenen Konformationen kaum strukturelle Unterschiede. Die Proteinbewegung kann daher nahezu als Rotation zweier starrer Körper gegeneinander angesehen werden.

4.1.2 Domänenrotation in der 5'-Nucleotidase

Aus der kristallographischen Untersuchungen an der 5'-NT ist keine direkte Information über eine funktionelle Domänenbewegung erhältlich. Aber aufgrund verschiedener relativer Anordnung der beiden Proteinuntereinheiten als Folge unterschiedlicher Kristallisationsbedingungen wurde eine Domänenrotation der 5'-NT als Kugelgelenkbewegung klassifiziert. Die Drehachse liegt dabei 3 Å vom Massenschwerpunkt der C-terminalen Untereinheit entfernt. Die Rotamere unterscheiden sich um Drehwinkel bis zu 96°. Interessant dabei ist, daß nur Strukturen mit Winkeln zwischen 0° – 8° und zwischen 90° – 96° gefunden wurden. Der erste Winkelbereich wird als geschlossene, der zweite als offene Konformation bezeichnet. Zwischen den beiden Konformationen wird eine Energiebarriere postuliert, so daß keine intermediären Winkelpositionen kristallisiert werden. Es ist nicht bekannt in welcher Konformation das Protein in Lösung vorliegt und welche Konformation es in Anwesenheit von Substrat annimmt. Diese Fragestellung soll im Folgenden bearbeitet werden. Dabei wird neben dem spezifischen Interesse an der 5'-NT auch ein methodischer Aspekt verfolgt.

Die Art der Bewegung der beiden Untereinheiten erlaubt eine Konformationsbestimmung allein aus einer Abstandsmessung zwischen einem fixen Punkt auf der großen und einem auf der kleinen Untereinheit. Als Markierung der kleinen Untereinheit wurde ein Isoleucin gegen ein Cystein ausgetauscht (I521C), an welches das Spinlabel MTSL angebracht wurde. Die Position 521 ist Teil eines β -Faltblattes, welches in der offenen Konformation sich in dem Spalt zwischen den beiden Untereinheiten befindet, aber in der geschlossenen Konformation auf die Seite gedreht wird. Insoweit folgt das hier gewählte Vorgehen dem üblichen Ansatz des ortsspezifischen Spinmarkierens.

Für die Markierung der großen Untereinheit wurde jedoch ein unkonventioneller Ansatz gewählt. In der großen Untereinheit befindet sich das katalytisch aktive Dimetall-Zentrum. Es ist möglich, durch stöchiometrische Zugabe von Metallionen die Bindungstasche einfach und homogen zu besetzen. Dieses eine Metallion wurde als Markierung der großen Untereinheit gewählt. Um zu gewährleisten, daß das Ion an der richtigen Stelle bindet, wurde Mn^{II} benutzt mit dem das Protein auch katalytisch aktiv ist. Bislang sind nur wenige Studien publiziert, in denen ein *high-spin* Metallion zur Abstandsbestimmung über die dipolare Wechselwirkung mit einem zweiten paramagnetischen Zentrum eingesetzt werden. Für Kontrollexperimente mit diamagnetisch besetzter Bindungstasche wurde Zn^{II} benutzt. Zur Bestimmung der Konformation

in Substratgegenwart wurde dem Protein ein Überschuß von AMPCP (α - β -Methylen-ADP) zugesetzt. Diese Substanz ist ein ADP-Derivat, welches analog an das Protein bindet. Dort kann es aber nicht umgesetzt werden, da die zu hydrolysierende Sauerstoffbrücke durch ein Methylengruppe ersetzt ist. Der Abstand zwischen Mn^{II} und Spinlabel unterscheidet sich je nach Konformation des Rotamers um bis zu 1.2 nm. Er beträgt in der offenen Konformation des Proteins 10 Å, in der geschlossenen Konformation 22 Å. Prinzipiell sollte ein Abstandsunterschied in dieser Größenordnung zwischen zwei Spins mit EPR deutlich unterscheidbar sein. Ein Abstand von 10 Å entspricht einer Kopplung von ca. 27 G, welche im cw Spektrum direkt als Aufspaltung erkennbar sein sollte. Abstände über 1.5 nm, wo die Aufspaltung geringer wird als die typische Linienbreite für ein Spinlabel bzw. ein Mn^{II} , sind im Prinzip durch ELDOR-Experimente direkt zugänglich.

Weiterhin wurden neben dem Wildtyp des Proteins (I521C wird im weiteren als 'Wildtyp mit Spinlabel' bezeichnet) auch zwei Mutanten untersucht, bei denen die Rotation durch eine Disulphidbrücke zwischen großer und kleiner Untereinheit blockiert wird. Von diesen verankerten Mutanten ist ebenfalls die Kristallstruktur bekannt [39]. Die SP-Mutante, eine (S228C,P513C)-Doppelmutante (Abb. 4.1), ist in der offenen Konformation verankert. Die Disulphidbrücke läßt laut Röntgenstruktur noch eine Rotation um weniger als 12° zu. Die katalytische Aktivität ist stark herabgesetzt. Die Bezeichnung PL steht für die (P90C,L424C)-Doppelmutante. Die 90-424 Disulphidbrücke hält das Protein in einer Konformation die zwischen offenem und geschlossenem Extrem liegt und ca. 40° von der geschlossenen Konformation entfernt ist. In den Bezeichnungen SPI und PLI steht das 'I' für die zusätzliche Mutation I521C und ein Spinlabelling an dieser Position.

4.2 EPR-Messungen an 5'-Nucleotidase

Mittels EPR-Messungen soll der Abstand zwischen zwei Spinmarkern an den beiden Subdomänen der 5'-Nucleotidase bestimmt und damit die Lösungsstruktur der 5'-NT ohne und mit Substrat ermittelt werden. Als einfachster Ansatz wurde versucht die dipolare Kopplung zwischen den beiden Spins mittels ELDOR-Experimenten bei 9 GHz zu bestimmen. Direkt konnte jedoch eine dipolare Kopplung zwischen Spinlabel und Mn^{II} nicht nachgewiesen werden. Dies kann auf unterschiedliche Effekte wie eine große Verteilung des Spin-Spin Abstands oder auf schnelle Spin-Gitter-Relaxation zurückzuführen sein.

Es kann daher nicht geschlossen werden, daß der Abstand der Spins außerhalb des mittels ELDOR detektierbaren Bereichs (von 1.5–8 nm) liegt. Daher wurde versucht, die Größe der Kopplung mit Hochfeld EPR-Messungen zu bestimmen. Vorausgehend wurden die Proteine mit jeweils nur einem paramagnetischen Zentrum charakterisiert. Es werden zuerst W-Band Messungen am Mn^{II} -Zentrum an Proteinen ohne Spinlabel vorgestellt. Für die Messungen am Spinlabel wurde die Bindungstasche unbesetzt gelassen bzw. mit Zn^{II} besetzt. Die Proteine mit Mn^{II} und Spinlabel wurden unter gleichen Bedingungen gemessen. Um diese Spektren möglichst einfach mit den Spektren mit nur einem Spinzentrum vergleichen zu können, wurde versucht die Signale der beiden Spezies mittels kurzer bzw. weicher Pulse (Kap. 2.2.2) zu trennen. Diese Separationsverfahren wurden bisher nur an ungekoppelten Spinsystemen durchgeführt. Daher soll zunächst auf Unterschiede eingegangen werden, die sich bei der Separation gekoppelter Spinsysteme ergeben.

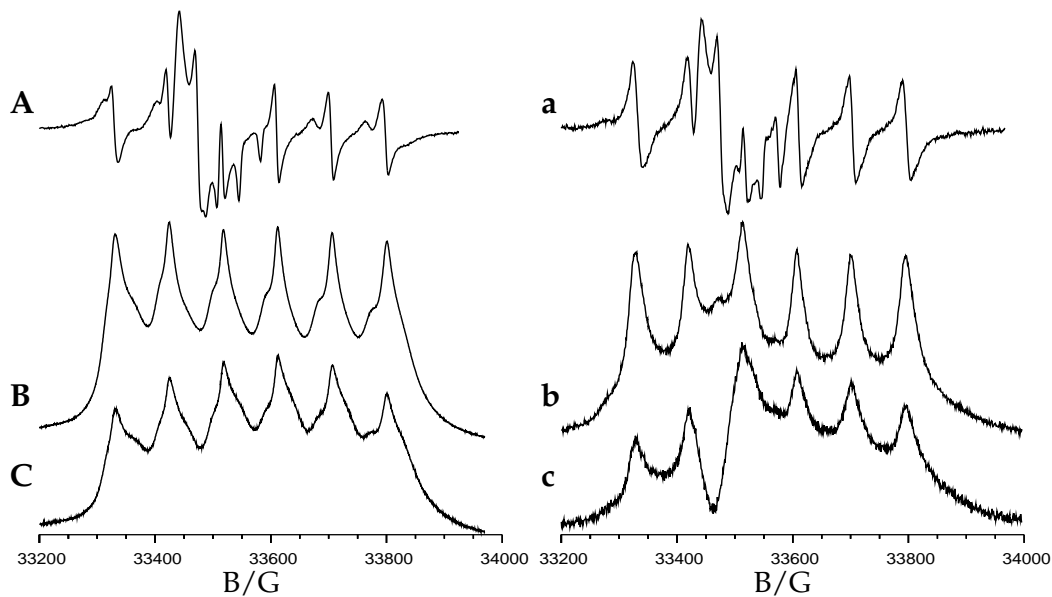


Abbildung 4.3: EPR-Spektren von Mn^{II} und Spinlabel, links: schwach gekoppelt, rechts: stark gekoppelt. Oben: cw-EPR, Mitte: Selektion des Mangan-Signals durch kurze Pulse, Unten: Selektion des Mangan-Signals durch weiche Pulse.

Separation dipolar gekoppelter Zweispinsysteme

Der Hamiltonoperator von zwei dipolar oder Austausch-gekoppelten Spins enthält einen Term, in dem beide Spins vorkommen.

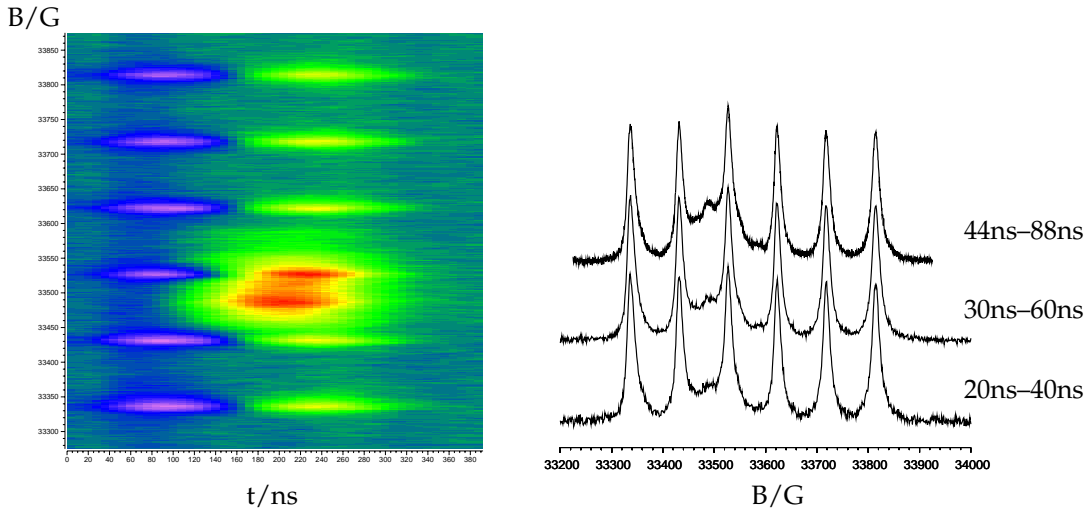


Abbildung 4.4: Separierbarkeit dipolar gekoppelter Spinsysteme. Rechts: Feldabhängigkeit der Echoform eines gekoppelten Zweispinsystems (Spinlabel und Mn^{II}). Pulssequenz: 100 ns – (600 ns) – 100 ns. Nomineller Flipwinkel für $S = 5/2$: 225° , für $S = 1/2 \approx 75^\circ$. Links: 2P EPR-Spektren mit unterschiedlichen Pulslängen. Bei optimalen Pulslängen für das Mn^{II} (44ns – 88 ns) ist noch Spinlabelsignal vorhanden, welches durch suboptimale Pulslängen reduziert wird. Aufgrund der Kopplung der beiden Spezies ist keine spektrale Separation möglich.

$$\hat{H} = a_1 \vec{S}_1 + a_2 \vec{S}_2 + a_3 \vec{S}_1 \vec{S}_2 \quad (4.2)$$

Eine Separation der beiden Spins über die Eigenschaften der einzelnen Spinsysteme ist daher nicht mehr möglich. Das Signal eines Mn^{II} in einer Probe mit einem Spinlabel wurde mittels kurzer Pulse aufgenommen (Bild 4.4). Sind die beiden Spins nicht gekoppelt, ist bei optimaler Pulslänge für das Mn^{II} ($\pi/2 = 40$ ns) das Signal des Spinlabels nicht erkennbar. Unter gleichen Bedingungen ist bei einer Kopplung der beiden Spins noch deutlich das Signal des Spinlabels im Spektrum enthalten. Durch suboptimale Pulslängen kann noch vorhandenes Spinlabelsignal weiter unterdrückt werden, zwar nimmt die Intensität des Mn^{II} -Echos mit ab, doch eine Verkürzung der Pulssequenz hat durch die schnelle Relaxation des Mn^{II} -Signals auch einen positiven Effekt auf die Echointensität.

Bei einer starken Kopplung wurden die Pulslängen deutlich unter ideale Werte reduziert (20 ns – 40 ns), trotzdem konnte das Echo des Spinlabels nicht vollständig unterdrückt werden (Abb. 4.4 links). Die Intensität, mit der das Signal des Spinlabels im Mn^{II} -Spektrum auftritt, hängt von der Größe der dipolaren Kopplung und dem Verhältnis der Relaxationsraten beider Spins ab.

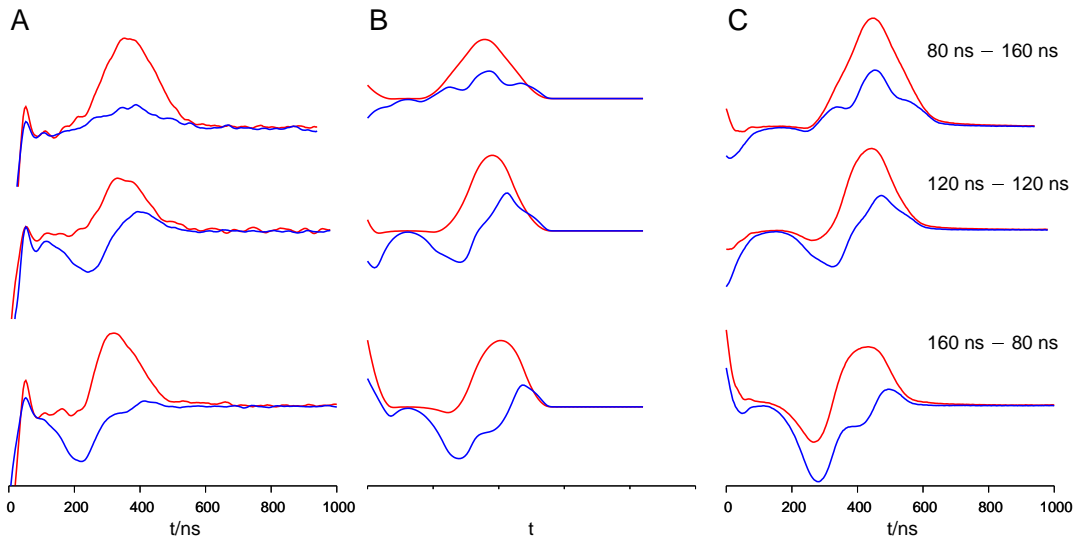


Abbildung 4.5: Echoformen im *soft pulse*-Experiment bei verschiedenen Pulssequenzen. Rot: Spinlabel (33488 G, Spektrum in Abb. 4.6); blau: Mn^{II} (33622 G). **A** experimentelle Echoformen von schwach gekoppelten Spins; **B** Simulation der Echoformen von $S = 1/2$ und $S = 5/2$ ohne Kopplung; **C** experimentelle Echoformen gekoppelter Spins.

Auch durch *soft pulse*-Experimente lassen sich dipolar gekoppelte Spinsysteme nicht vollständig separieren. In der 2D-Darstellung des Experiments an einem gekoppelten Spinsystem (Abb. 4.4 rechts) ist gut erkennbar, daß es kein Zeitbereich das Signal einer Spezies allein enthält. So sollte z. B. im späteren Zeitbereich von 200 ns – 250 ns nur das Spinlabel echo auftauchen, es sind aber auch deutlich Resonanzen des Mn^{II} zu erkennen. Durch Verkürzen des Integrationsfensters kann die Intensität z.B. des Spinlabels im Mn^{II} -Spektrum reduziert, aber nicht vollkommen unterdrückt werden (Abb. 4.3b).

Unterschiedlichen Pulsfolgen Die Magnetisierung der Spins bei einem *soft pulse*-Experiment hängt in erster Linie vom nominellen Flipwinkel der Gesamtsequenz ab [26]. Im Folgenden soll die Abhängigkeit der Echoform von der Pulssequenz dargestellt werden. In Abb. 4.5 sind experimentelle Echoformen von einem Spinlabel und einem Mn^{II} nach einer $2t - 4t-$ (oben), $3t - 3t-$ (mitte) und einer $4t - 2t$ -Sequenz ($t = 40$ ns) dargestellt. Nach der Hahn-Echosequenz ($2t - 4t$) refokussiert die Magnetisierung beider Spins zur gleichen Zeit, wobei die Intensität der Mn^{II} -Echos deutlich geringer ist. Die $3t - 3t$ Sequenz führt zu einem gaußförmigen Spinlabel echo. Das Mn^{II} -

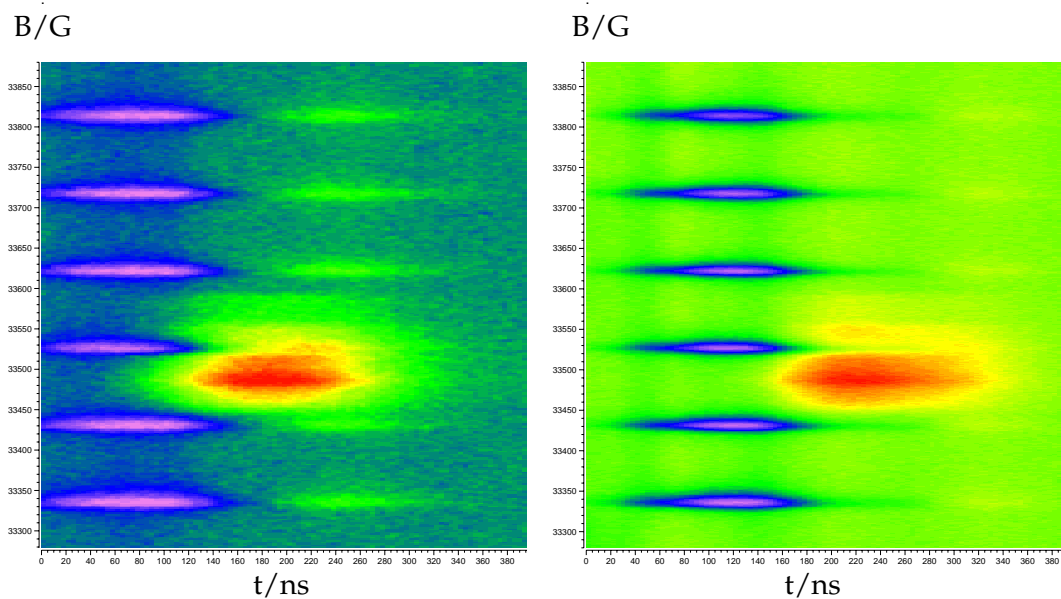


Abbildung 4.6: Abhängigkeit der Echoform von der Pulssequenz bei gleichem nominellem Flipwinkel. Die Echoform eines schwach gekoppelten Zweispinsystems (Spinlabel und Mn^{II}) wurde feldabhängig abgetastet. Links: 120 ns – 120 ns. Rechts: 160 ns – 80 ns.

Signal beginnt etwas früher mit negativer Intensität, hat im Maximum des Spinlabel-Echos einen Vorzeichenwechsel und endet zeitgleich mit dem Spinlabel-Echo. Das Mn^{II} -Signal kann durch Integration im frühen Zeitbereich selektiert werden. Die Selektion des Spinlabelsignals ist durch Integration über einen kleinen Zeitbereich um den Nulldurchgang des Mn^{II} -Echos möglich. Bei der 160 ns – 80 ns Sequenz sind die Echos zeitlich am stärksten gegeneinander verschoben. Das negative Mn^{II} -Echo beginnt ca. 100 ns vor dem Spinlabel-Echo. Im Maximum des Spinlabel-Echo endet das Mn^{II} -Echo zwar nicht, bewegt sich aber mit nur geringer Intensität um Null, so daß das Spinlabelsignal über einen Zeitbereich von über 100 ns integriert werden kann. Ein weiterer Vorteil der $4t - 2t$ -Sequenz ist die gute Separation auch schwach gekoppelter Spins. In Abb. 4.6 sind zwei *soft pulse*-Experimente mit unterschiedlichen Pulssequenzen an einem dipolar gekoppelten Zweispinsystem dargestellt. Nach den 120 ns – 120 ns Pulsen sind über den gesamten Zeitbereich die sechs Mn^{II} -Linien erkennbar. Das Spinlabel-Echo reduziert schon im frühen Zeitbereich die Intensität der 2. und 3. Mn^{II} Linie. Die feldabhängigen Echoformen nach den 160 ns – 80 ns Pulsen zeigen im frühen Zeitbereich kein Spinlabelsignal. Das Mn^{II} zieht sich bis zum Maximum des Spinlabel-Echos, hat aber im zweiten Teil des Echos keine Intensität mehr. Die bessere Separation

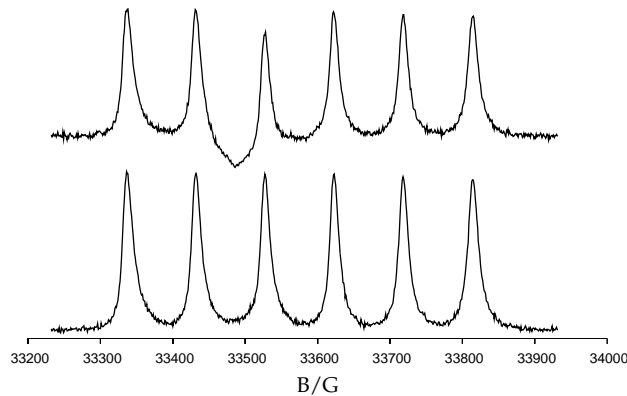


Abbildung 4.7: Abhängigkeit von der Pulssequenz bei der Selektion eines Mn^{II} -Signals, welches schwach mit einem Spinlabel koppelt. Oben: 120 ns–120 ns; unten: 160 ns–80 ns

der Spezies zeigt sich auch am integrierten Mn^{II} -Signal, welches im ersten Fall noch Spinlabel signal enthält, im zweiten Fall ein reines Mn^{II} -Signal zeigt. Der Vorteil einer $4t - 2t$ -Sequenz zeigt sich in der großen Zeitverschiebung der Signale. Es werden Integrationsfenster möglich, die bei kurzen Akkumulationszeiten zu guten Signal/Rausch-Verhältnissen führen. Weiterhin können auch die Magnetisierungen von schwach gekoppelten Systemen besser separiert werden.

Im Folgenden werden kurze Pulse und weiche Pulse mit unterschiedlichen Pulssequenzen benutzt, um Signale zu trennen, entsprechend den hier erläuterten Vorteilen und Restriktionen.

4.2.1 Mn^{II} in der Bindungstasche

Die cw-EPR Spektren bei 94 GHz von Mn^{II} in der einfach besetzten Bindungstasche der untersuchten Proteine sind in Abbildung 4.8 dargestellt. Der Wildtyp (WT) zeigt die sechs Linien eines typisches Mn^{II} -Spektrums mit einer Hyperfeinkopplung von $A(\text{Mn}^{\text{II}})=270$ MHz und einer Linienbreite von 9 G. Zwischen den sechs prominenten Linien sind mit einer geringen Intensität Übergänge erkennbar, welche in oktaedrischer Koordinationssphäre aus Symmetriegründen verboten sind, hier aber durch eine leicht asymmetrische Bindung des Mn^{II} erlaubt werden. Die Spektren der beiden Mutanten SP und PL werden durch Parameter in gleicher Größe wie der Wildtyp charakterisiert. Die Hyperfeinaufspaltung beträgt bei beiden 270 MHz, die Linienbreite ist mit 10 G leicht erhöht (Tabelle in Bild 4.8). Im Spektrum von SP gewinnen

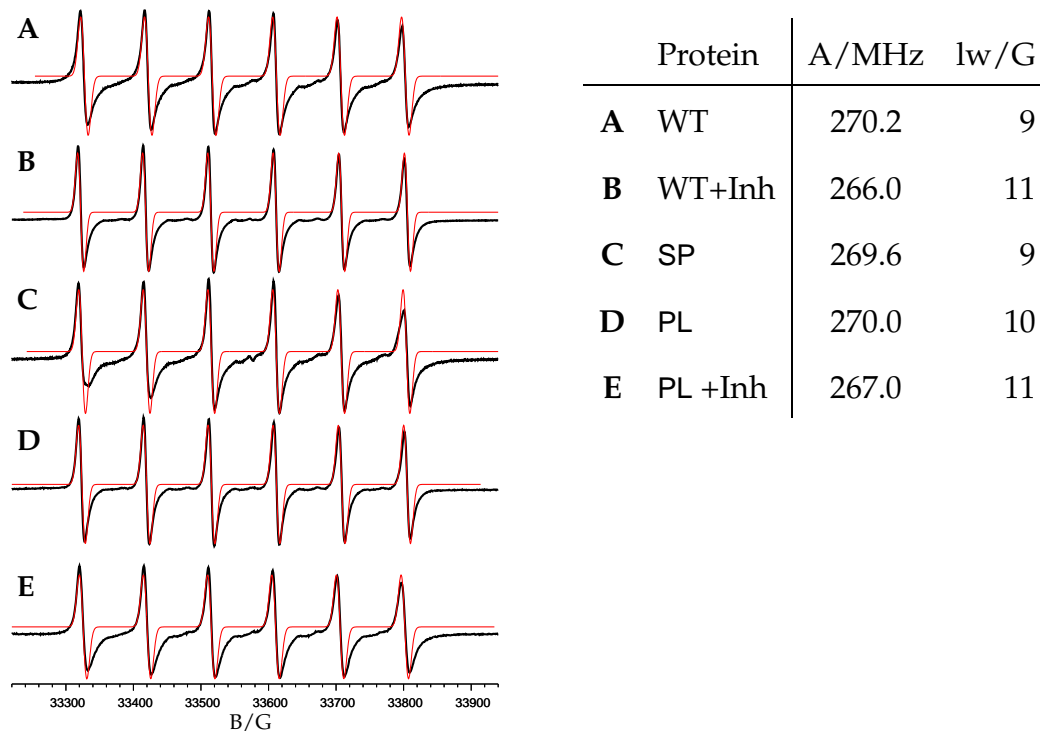


Abbildung 4.8: Einfluß der Proteinumgebung auf A_{iso} und Linienbreite des Mn^{II} . Links: cw EPR-Signal bei 94 GHz von **A** WT+ Mn^{II} , **B** WT+ Mn^{II} +Inh, **C** SP + Mn^{II} , **D** PL + Mn^{II} , **E** PL + Mn^{II} +Inh. Die Simulationen (rot) von A_{iso} und der Linienbreite (lw) entnommenen Werte sind rechts tabelliert.

die verbotenen Übergänge an Intensität, vermutlich wird die Symmetrie der Bindungstasche durch die eingebrachte Disulphidbrücke gestört. Zugabe des Substratanalogons AMPCP (im Folgenden als Inhibitor bezeichnet) führt zu einer Reduktion der Hyperfeinkopplung des Mn^{II} und einer Erhöhung der Linienbreite. Diese Phänomene können durch eine Übertragung von einem kleinen Teil der Spindichte auf den Inhibitor als Mn^{II} -Ligand erklärt werden. Die Reduktion der Spindichte am Mn^{II} hat eine Absenkung der Hyperfeinkopplung zur Folge, die Spindichte auf der Phosphatgruppe eine Kopplung an ^{31}P , was die Erhöhung der Linienbreite erklären kann.

4.2.2 Proteine mit Spinlabel

Bei strukturellen Änderungen des Proteins kann das Spinlabel in einer veränderten Umgebung vorliegen. Konformationsunterschiede zum Apoprotein können bei Substratzugabe und bei Besetzung der Bindungstasche entstehen.

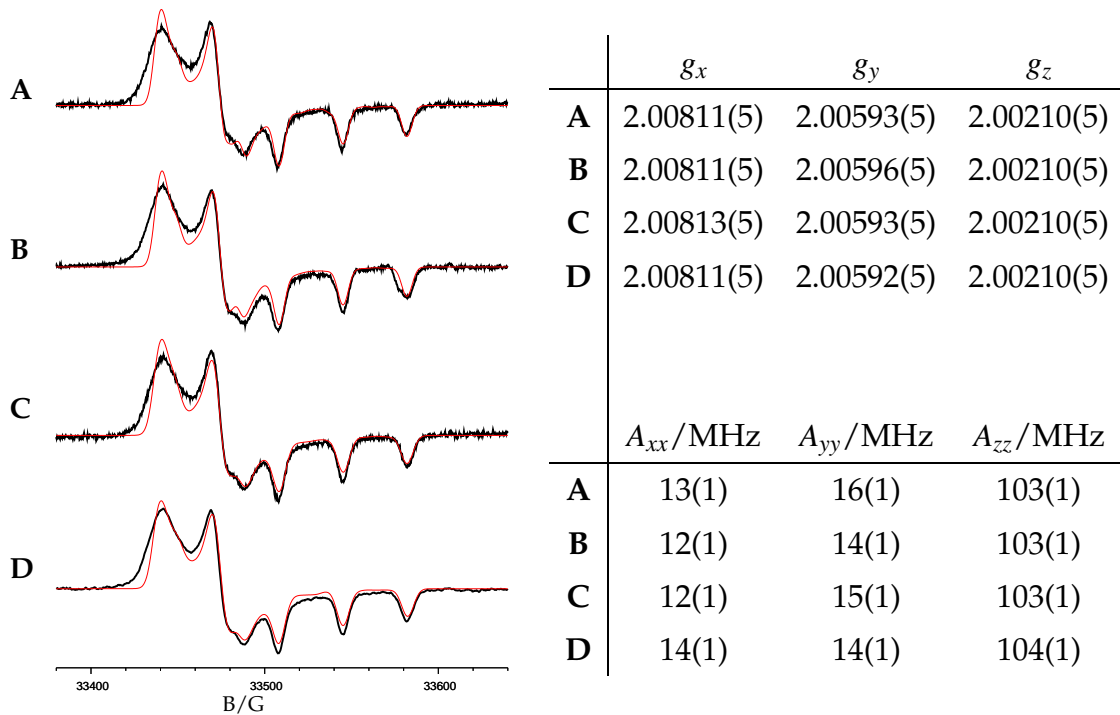


Abbildung 4.9: Einfluß des Proteins auf g - und A -Werte des Spinlabels. Rechts: cw EPR-Signal bei 94 GHz von **A** I521C+SL, **B** I521C+SL+Inh, **C** I521C+SL+Zn^{II}, **D** I521C+SL+Inh+Zn^{II} mit Simulation (rot). Links: g - und A -Werte aus der Simulation

Um letzteres zu prüfen wurde die Metallbindungsstelle mit Zn^{II} rekonstituiert. Auch mit Zn^{II} ist die Aktivität des Enzyms wiederhergestellt, so daß von einer korrekten Bindung ausgegangen werden kann. In den Spektren (Abb. 4.9) der vier Varianten: Wildtyp, Wildtyp mit Zn^{II}, Wildtyp mit Inhibitor (Inh), Wildtyp mit Zn^{II} und Inhibitor zeigt das Spinlabel-Signal keinen Unterschied. Sie weisen g -Werte, Hyperfeinkopplungen und Linienbreiten auf, welche innerhalb des Fehlers gleich sind. An den Werten von g_x und A_{zz} läßt sich die Polarität und Protizität der Umgebung abschätzen [17]. Die hier gemessenen Werte entsprechen einer wässrigen Umgebung.

4.2.3 Trennbarkeit der Signale

Um die Größe der Wechselwirkung zwischen den beiden Spins zu bestimmen wurden die spinmarkierten Proteine stöchiometrisch mit Mn^{II} versetzt. Die cw-EPR Spektren vom Wildtyp, vom Wildtyp mit Inhibitor und der SPI-Mutante (Abb. 4.10 links) zeigen eine Überlagerung der Spektren beider Spezies. Direkt sind keine Aufspaltungen durch dipolare Kopplung erkennbar. Das

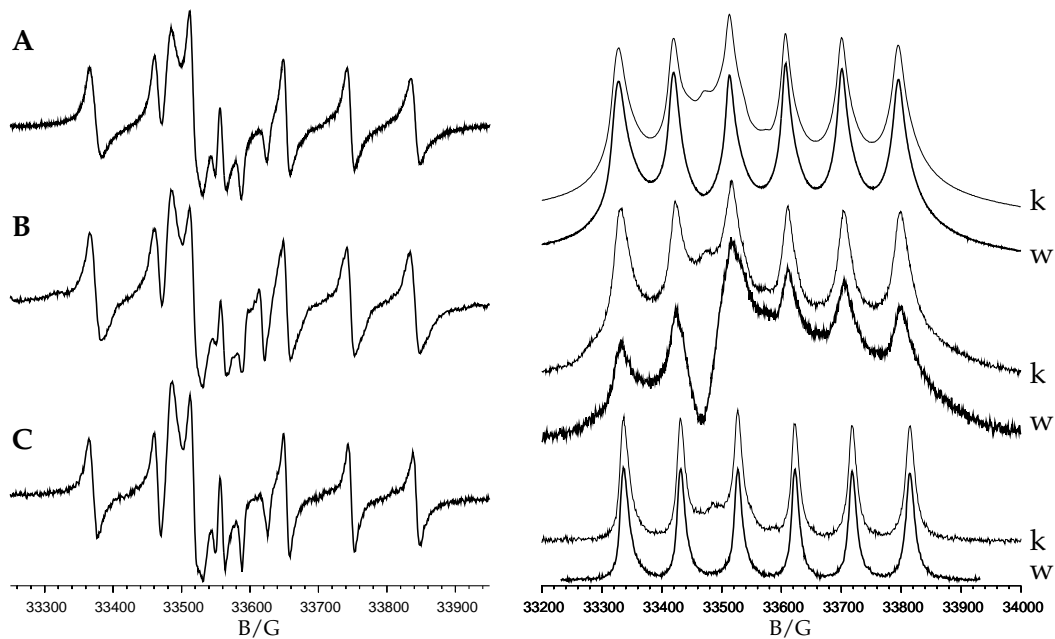


Abbildung 4.10: cw-EPR Spektren (links) der spinmarkierten Proteine mit Mn^{II}: A Wildtyp B SPI-Mutante C Wildtyp mit Inhibitor. Rechts dargestellt sind die separierten Mn^{II}-Signale, (k) mittels kurzer Pulse, (w) mittels weicher Pulse.

Spektrum von PLI mit Mn^{II} (Spektrum nicht abgebildet) zeigt sechs Linien mit einer Aufspaltung von 270 MHz und einer Linienbreite von ca. 50 G, bei Zugabe von Inhibitor erhöht sich die Linienbreite auf ca. 70 G. Die PLI-Mutante wurde daher nicht für eine weitere Auswertung herangezogen.

Zu besserer Analyse der spinmarkierten Proteine mit besetzter Bindungstasche wurden die Spinlabel- und Mangansignale getrennt aufgezeichnet. Aus der Trennbarkeit der Signale kann die Größenordnung der Spin-Spin-Kopplung abgeschätzt werden (Kap. 4.2). Das Mn^{II}-Signal konnte durch kurze Pulse (Abb. 4.10k) in keinem der Fälle vollständig separiert werden. In allen drei Spektren ist Restsignal des Spinlabels erkennbar. Mit weichen Pulsen kann im Wildtyp mit Inhibitor das Mn^{II}-Signal selektiert werden (Abb. 4.10Cw). In Wildtyp und SPI ist das Spinlabel noch erkennbar. Das größere Spinlabelsignal im SPI-Spektrum ist nicht notwendigerweise auf eine stärkere Kopplung zurückzuführen - aufgrund geringerer Probenkonzentration wurde über einen etwas längeren Zeitbereich integriert, was die Intensität des Spinlabels erhöhte. Unabhängig von Integrationsfenstern sind 2D-Spektren, welche die Echoform feldabhängig zeigen. Im Spektrum des Wildtyps (Bild 4.11 links) ist eine Kopplung der beiden Spinsysteme erkennbar, welche sich bei Zugabe von In-

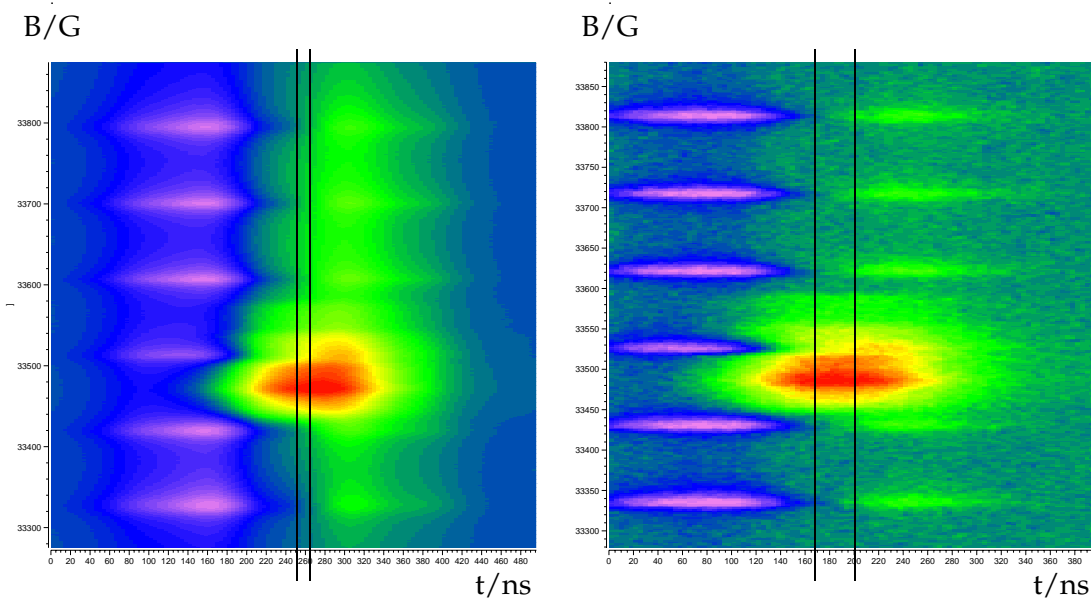


Abbildung 4.11: 2D *soft pulse* Spektren vom Wildtyp (links) und Wildtyp mit Inhibitor (rechts). Pulssequenz: 120 ns–120 ns. Markiert sind die Integrationsfenster in denen das Spinlabellsignal nahezu ohne Mn^{II} -Signal aufgenommen werden kann.

hibitor (Bild 4.11 rechts) reduziert aber weiterhin sichtbar ist. In den Spektren sind die Integrationsfenster markiert, in denen das Spinlabellsignal aufgenommen werden kann und in denen die Intensität des Mn^{II} -Signals gering ist. Dieses Integrationsfenster ist beim Wildtyp wesentlich kleiner als beim Wildtyp mit Inhibitor, was auf eine reduzierte dipolaren Kopplung in Substratgegenwart spricht.

Ein weiterer Anhaltspunkt für die Spinkopplung ist das Relaxationsverhalten der Spins. Die Pulsspektren vom Wildtyp mit Inhibitor konnten bei 80 K aufgenommen werden. Im Wildtyp und SPI konnte aufgrund schneller Relaxation beider Spinsysteme bei 80 K kein Echo beobachtet werden. Die Spektren mußten daher bei 10 K akkumuliert werden.

4.2.4 Dipolare Kopplung im Mn^{II} -Spektrum

In diesem Abschnitt soll der Einfluß des Spinlabels auf die Spektren des Mn^{II} untersucht werden. In Abb. 4.12 sind cw-EPR Spektren und pseudomodulierte 2P-Spektren von Mn^{II} in Proteinen ohne Spinlabel im Vergleich mit dem selektierten Mn^{II} -Signal aus den spinmarkierten Proteinen dargestellt. Der Vergleich von cw- und 2P-Experiment soll die Unabhängigkeit von der Aufnahmetechnik verdeutlichen. Es werden jeweils die gleichen Hyperfeinkopplun-

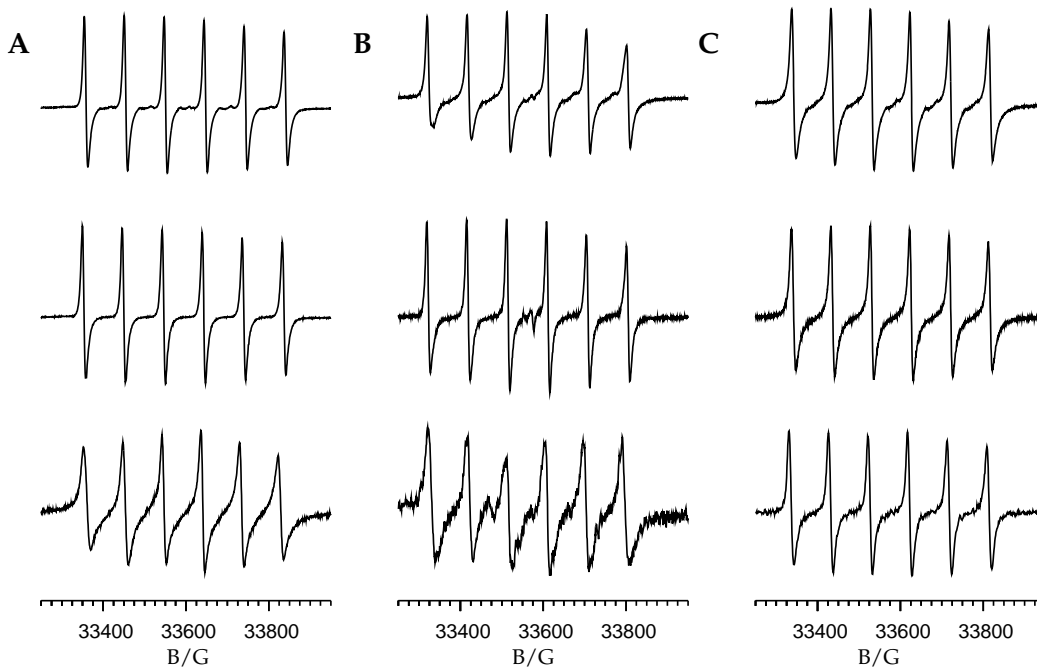


Abbildung 4.12: Mn^{II} -Spektren bei 94 GHz. **A** Wildtyp, **B** SPI-Mutante, **C** Wildtyp mit Inhibitor. Oben: cw-Spektren der Proteine einfach mit Mn^{II} markiert. Mitte: pseudomodulierte (4 G) 2P-Spektren. Unten: Selektierte Mn^{II} -Resonanzen aus spinmarkierten Proteinen mit Mn^{II} , pseudomoduliert (4 G)

gen und Linienbreiten zur Simulation der Spektren benötigt. Damit sind Änderungen im Spektrum vom spinmarkierten Protein mit Mn^{II} allein auf das Spinlabelling zurückzuführen. Im Wildtyp und in der SPI-Mutante reduziert sich die Hyperfeinkopplung von $A(\text{Mn}^{\text{II}}) = 270$ MHz auf 260 MHz. Die Linienbreite steigt beim Wildtyp von 9 G auf 14 G, bei SPI von 9 G auf 15 G (unter Berücksichtigung der Verbreiterung durch die Pseudomodulation). Bei Wildtyp mit Inhibitor bleiben Hyperfeinkopplungskonstante und Linienbreite des Mn^{II} nahezu unverändert.

4.2.5 Dipolare Kopplung im Spinlabelspektrum

Bei der Separation des Spinlabelsignals werden, insbesondere bei tiefen Temperaturen, stets Spinzustände $S \approx 1/2$ des Mn mitselektiert. Sie liegen als breiter Untergrund unter dem Spektrum des Spinlabels, werden aber durch die Pseudomodulation mit wenigen Gauß Amplitude unterdrückt. Das reine Spinlabelspektrum vom Wildtyp hat eine anisotrope Linienbreite welche entlang g_x durch g -strain mit $lw(x) = 11$ G größer ist als entlang g_z ($lw(z)=5$ G).

Tabelle 4.1: Hyperfeinkonstanten und Linienbreiten für Mn^{II} in drei Proteinen. cw: cw-EPR (kein Spinlabel); 2P - pseudomoduliertes 2P-Spektrum (kein Spinlabel); SL - selektiertes Signal bei spinmarkiertem Protein mit Mn^{II}

Protein		A(Mn^{II})/MHz	lw/G
WT	cw	270.2	9(1)
	2P	270.8	9(1)
	SL	261.8	14(1)
spi	cw	269.6	9(1)
	2P	270.2	9(1)
	SL	260.4	15(1)
WT+Inh	cw	266.0	11(1)
	2P	266.0	11(1)
	SL	267.9	10(1)

Ähnliche Werte finden sich für das Spinlabelsignal im spinmarkierten Wildtyp mit Inhibitor mit und ohne Mn^{II} . Wird aus dem spinmarkierten Wildtyp mit Mn^{II} das Spinlabelsignal selektiert findet man Linien, die um ca. 50% verbreitert sind, entlang g_x erhöht sich die Linienbreite auf 15 G, entlang g_z auf ca. 8 G. Die Linienbreiten entlang g_y sind in den Simulationen nicht gut reproduziert, so daß sie für die eine Auswertung nicht herangezogen werden.

4.2.6 Ergebnis

In den ersten beiden Abschnitten wurde der Einfluß der Proteinstruktur und Substratgegenwart auf die einzelnen Spinsysteme untersucht. Das Spektrum des Spinlabels bleibt unter den verschiedenen Bedingungen unverändert. Die Aminosäure 521 befindet sich im Randbereich der Interdomänenregion. Die Seitenkette des Cysteins kann in die wäßrige Umgebung herausragen oder sich zwischen den Subdomänen befinden. Die Möglichkeit das Spinlabel mit dem gefalteten Protein kovalent zu verbinden, spricht dafür, daß die Seitenkette zugänglich ist und damit in die wäßrige Umgebung herausragt. Auch die g - und A -Werte des Spinlabels sprechen für eine wäßrige Umgebung. Doch zwischen den Proteinuntereinheiten befinden sich viele polare Aminosäureseitenketten, die durch einige Wassermoleküle verbunden werden. Diese können Wasserstoffbrücken zum Spinlabel ausbilden und so die g - und A -Werte gegenüber der apolaren Proteinumgebung verschieben. In dieser Situation wäre

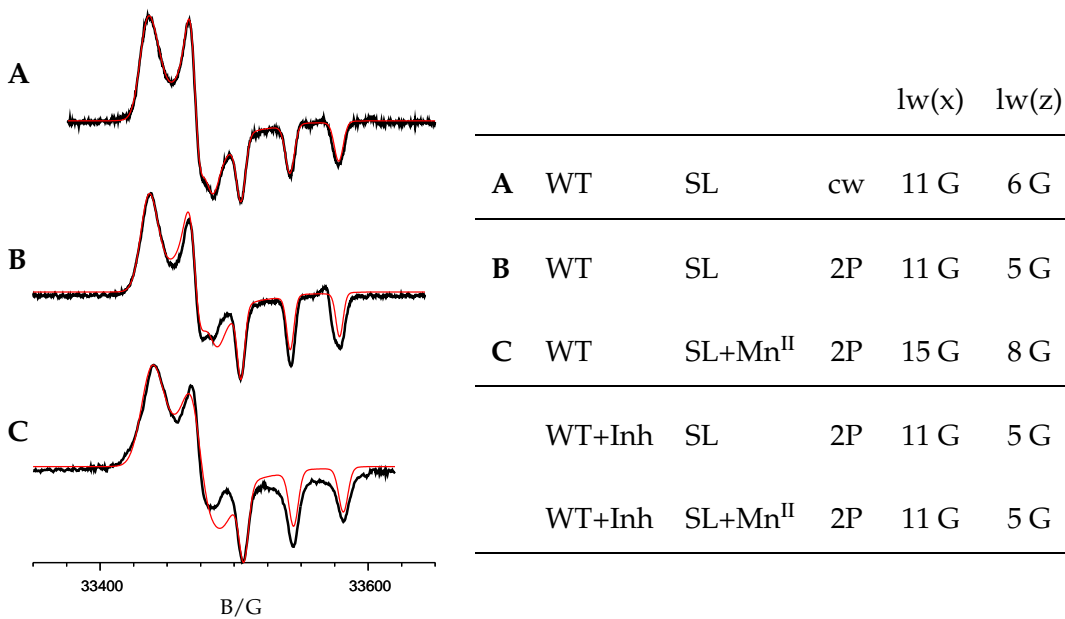


Abbildung 4.13: Spektren (schwarz) und Simulation (rot) vom Spinlabelsignal in 5'-NT bei 94 GHz. **A** spinmarkierter Wildtyp, cw-Spektrum **B** spinmarkierter Wildtyp, 2P Spektrum, **C** spinmarkierter Wildtyp mit Mn^{II}, mit weichen Pulsen wurde das Spinlabelsignal selektiert. In der Tabelle sind die Linienbreiten (*lw*) entlang g_x und g_z angegeben. Weiterhin sind die Werte für den Wildtyp mit Inhibitor angegeben (ohne Spektren).

jedoch eine Änderung der Werte bei einer Konformationsänderung zu erwarten, was nicht beobachtet wird.

Im Mn^{II}-Spektrum reduziert sich bei Zugabe von Inhibitor die Hyperfeinkonstante auf $A(\text{Mn}^{\text{II}}) \approx 266$ MHz und die Linienbreite erhöht sich geringfügig. Messungen an den spinmarkierten Proteinen mit Mn^{II} zeigen in der Trennbarkeit der Signale eine dipolare Kopplung zwischen Mn^{II} und dem Spinlabel in allen Proteinen. Im Wildtyp und der SPI-Mutante ist die Kopplung größer als im Wildtyp mit Inhibitor. Vergleicht man die Mn^{II}-Spektren der einfach und doppelt gelabelten Proteine, so erhöht sich im Wildtyp und der SPI-Mutante die Linienbreite durch das Spinlabel von $lw = 10$ G auf $lw(\text{WT}) = 14$ G bzw. $lw(\text{SPI}) = 15$ G. In der offenen Konformation des Proteins sind Mn^{II} und das S-Atom des gelabelten Cysteins (I521C) 10 Å entfernt. Die Größe der Kopplung zwischen dem Nitroxidradikal und dem Mn^{II}-Ion hängt von der Konformation des MTSL-Labels ab und kann prinzipiell zwischen 7-80 G liegen. Da das Spinlabel aus der Interdomänenregion heraus vom Mn^{II}-Zentrum weg weist, ist eine Kopplung von 7-15 G zu erwarten. Eine Linienverbreiterung von 10 G auf ca. 15 G ist mit einer dipolaren Kopplung von höchstens 8 G vereinbar.

Dies liegt in dem für die offene Konformation soeben abgeschätzten Bereich. Beim Wildtyp mit Inhibitor wird die Linienbreite des Mn^{II} durch das Spinlabel nicht erhöht. In der geschlossenen Konformation liegen das S-Atom und Mn^{II} 22 Å entfernt. Die Kopplung beträgt je nach Konformation des Spinlabels zwischen 1-5 G und sollte die 10 G breiten Mn^{II} -Linien auf höchstens 12 G verbreitern. Dies trifft auf den Wildtyp mit Inhibitor zu, ist aber mit der SPI-Mutante und dem Wildtyp nicht vereinbar.

Das Spinlabelpektrum wird beim Wildtyp mit Inhibitor durch Gegenwart von Mn^{II} nicht beeinflusst, während sich beim Wildtyp die Linienbreite erhöht. Dort wird eine Erhöhung der Linienbreite um 4 G entlang g_x und um 3 G entlang g_z bei besetzter Bindungstasche beobachtet. Die Experimente zeigen konsistent Kopplungen ähnlicher Größe in Wildtyp und SPI-Mutante während die Kopplung im Wildtyp mit Inhibitor deutlich kleiner ist.

Unter der Annahme, daß zwischen offener und geschlossener Konformation eine Energiebarriere besteht, treten keine stabilen Konformationen in dem Zwischenbereich auf.

Die hier erhaltenen Ergebnisse sind demnach für den Wildtyp ohne Substrat und die SPI-Mutante mit einer offenen Konformation vereinbar. Dagegen ist für das mit den Substratanalog beladene Protein nur eine geschlossene Konformation mit den EPR-Ergebnissen in Einklang zu bringen.