

Kapitel 1

Einleitung

Proteine übernehmen in einem funktionierenden Organismus vielfältige Funktionen, unter anderem dienen sie als Biokatalysatoren, bestimmen den Zellaufbau als Strukturproteine oder sind für den Transport körperwichtiger Substanzen zuständig, wie z.B. Hämoglobin und Transferrin im Blutkreislauf. Die funktionale Aktivität der Proteine wird dabei durch ihre dreidimensionale Struktur sowie ihre Dynamik bestimmt. Die Charakterisierung der Struktur und Dynamik von Proteinen und deren Zusammenhang mit funktionalen biologischen Eigenschaften wird im Rahmen der biophysikalischen und medizinischen Entwicklung immer bedeutender. Sie dient als Grundlage für die Erforschung vieler Erbkrankheiten, die durch Gendefekte entstehen und einen fehlerhaften Aufbau von Proteinen zur Folge haben, durch den ihre Funktion im Organismus ganz oder teilweise gestört wird.

Eine der wichtigsten experimentellen Methoden zur Aufklärung der Proteinstruktur ist die Kristallstrukturanalyse, die in den letzten Jahrzehnten bei einer Vielzahl von Proteinen sehr erfolgreich eingesetzt wurde [1]. Die hierfür benötigten Kristalle zu erzeugen ist allerdings schwierig und bisher aufgrund komplizierter Kristallisationsprozesse weitgehend für wasserlösliche Proteine erfolgt. Daher ist zum Beispiel die wichtige Klasse der Membranproteine noch weitgehend unerforscht, obwohl sie im Genom 25% aller Proteine umfasst und daher von fundamentaler Bedeutung ist. Auch Strukturveränderungen der Proteine durch Kristallkontakte können bei dieser Methode nicht ausgeschlossen werden. Dabei ist die Untersuchung von Proteinen unter physiologischen Bedingungen von besonderer Bedeutung. Besser geeignet ist hierfür die NMR-Spektroskopie, welche die Ermittlung der Proteinstruktur in Lösung ermöglicht [2]. Allerdings steigt die Komplexität der Resultate mit der Größe des Proteins. Die Lösung des Proteinstrukturproblems verlangt mehrdimensionale Experimente, welche für größere Membranproteine aufgrund dipolarer Wechselwirkungen nicht mehr funktionieren, so dass hier auf Festkörper NMR spektroskopische Methoden zurückgegriffen werden muß. Dieses Verfahren kompliziert die Strukturbestimmung beträchtlich und ist bislang nur für wenige solcher Systeme zufriedenstellend gelungen [3].

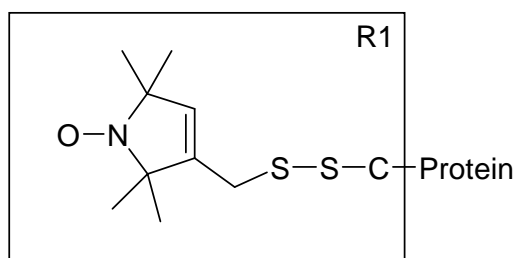


Abbildung 1.1 Die spinmarkierte Seitenkette R1

Neben diesen beiden klassischen Methoden der Strukturbestimmung wurden in den letzten Jahren dynamische Prozesse und Strukturen von Proteinen sehr erfolgreich mit Hilfe der ESR-Spektroskopie untersucht, welche ebenfalls die Erforschung von Proteinen unter physiologischen Bedingungen ermöglicht. Die Einführung der molekularbiologischen Technik des „Site-directed spin-labeling“ (SDSL) [4-7] hat diesen grundlegenden Erfolg möglich gemacht. Sie basiert auf der selektiven Mutation nativer Proteine, wodurch jede beliebige Stelle der Aminosäuresequenz mit einer Spinsonde versehen werden kann. Strukturelle Veränderungen durch die Einführung dieser Spinsonde sind in der Regel so gering, dass sie vernachlässigt werden können, wie mit Hilfe von Kristallstrukturuntersuchungen festgestellt wurde [8]. Mit dieser Methode können auch von Natur aus diamagnetische Moleküle ESR-spektroskopisch untersucht werden. Aus der Analyse des ESR-Spektrums der Spinsonde lassen sich dann sowohl Informationen über die Sekundärstruktur des Proteins an dieser Position als auch über die molekulare Dynamik extrahieren, wenn die experimentellen Bedingungen so gewählt werden, dass die Rotationsdynamik der Spinsonde auf der Zeitskala der ESR-Spektroskopie stattfindet. Als Spinsonden werden in der Regel Nitroxide in verschiedenen Varianten verwendet. Sie werden durch Cystein-Mutation und anschließende Reaktion mit einem Spinmarker in das Protein integriert. Als eine der beliebtesten Spinsonden fungiert MTSSL (s. Abbildung 1.1). Durch die Kopplung des Disulfides an das Proteinrückgrat fließt die Dynamik des Rückgrats neben der Wechselwirkung der Spinsonde mit der Proteinumgebung explizit in das ESR-Spektrum ein.

Um Informationen über das Protein zu erhalten, werden verschiedene Ansätze verwendet [7,9]. Zu den wichtigsten SDSL Techniken gehört die Abtastung bestimmter Proteinabschnitte zur Analyse der Sekundärstruktur [10-13]. Dafür wird die Aminosäuresequenz fortlaufend mit einer Spinsonde versehen. Aus der Periodizität charakteristischer Größen der ESR-Spektren lassen sich dann Rückschlüsse auf die Sekundärstrukturelemente des markierten Abschnitts ziehen. Auf diese Weise können zum Beispiel α -Helices und β -Faltblätter eindeutig voneinander unterschieden werden.

Reaktionen des Proteins mit dem Substrat oder anderen Liganden oder Adsorption des Proteins auf einer Oberfläche gehen in der Regel mit einer Strukturveränderung des Proteins einher. Die Linienformanalyse des ESR-Spektrums an einer von der Konformationsänderung betroffenen Stelle im Proteinrückgrat kann hierüber Aufschluss geben [14-19].

Die Zugänglichkeit einer Spinsonde zum Lösungsmittel kann durch die Kollisionsrate des Nitroxids mit geladenen paramagnetischen Reagenzien analysiert werden [20,21]. Dies ermöglicht z. B. die Bestimmung der Einbettungstiefe eines Membranproteins [22,23].

Eine ebenfalls wichtige Technik ist die Einführung von zwei Spinsonden an verschiedenen Stellen der Aminosäuresequenz. Aus der Bestimmung des Abstandes zwischen beiden kann die Entfernung zweier Sekundärstrukturelemente bestimmt werden, welche zuvor durch das Abtasten mit Spinsonden charakterisiert wurden. Der Abstand zwischen den Spins im Bereich von 8-20 Å kann aus der spektralen Linienverbreiterung gewonnen werden, die aufgrund der Dipol-Dipol-Wechselwirkung der Spins im ESR-Spektrum auftritt [24-27]. Größere Abstände im Bereich von 20-70 Å können mit Puls-ESR Techniken wie z.B. DCQ (double quantum coherence) bestimmt werden [28-30]. Mit Hilfe der Sekundärstrukturcharakterisierung und der Abstandsmessung ist es dann prinzipiell möglich, auch die Tertiärstruktur des Proteins zu bestimmen.

Trotz der erfolgreichen Anwendung all dieser Techniken ist die Interpretation der Linienform von cw-ESR-Spektren immer noch schwierig, da diese von der komplexen Dynamik der Spinsonde beeinflusst werden. Diese ist sowohl von der Wechselwirkung der Spinsonde mit der lokalen Proteinumgebung als auch von der Dynamik des Proteinrückgrats abhängig, an das die Spinsonde gekoppelt ist. Zur Analyse der ESR-Spektren wird die Dynamik der Spinsonde mit stark vereinfachten Bewegungsmodellen beschrieben, und obwohl die Linienform damit teilweise sehr gut beschrieben werden kann, ist es nicht ohne weiteres möglich, das einfache Bewegungsmodell mit einem molekularen Bild zu verknüpfen. Hierfür wird standardmäßig der SLE (stochastic Liouville equation)-Ansatz von Freed et al. verwendet [31], der die Rotationsdynamik der Spinsonde in einem restriktiven, symmetrischen Potential beschreibt [19,32], welches allerdings nur eine stark vereinfachte Beschreibung der molekularen Dynamik möglich macht. Die verschiedenen Parameter, welche für eine Simulation des Spektrums notwendig sind, lassen sich jedoch anhand experimenteller Spektren aufgrund der komplexen Dynamik der Spinsonde in der Proteinumgebung auch nicht eindeutig identifizieren. So kann beispielsweise ein Spektrum geringer Mobilität entweder durch eine Bewegung geringer Amplitude und hoher Diffusionskonstante oder durch eine Bewegung großer Amplitude und geringer Diffusionskonstante beschrieben werden.

Um ein besseres Verständnis der molekularen Dynamik zu erzielen, welches einen mikroskopischen Einblick in die Wirkungsweise von Biomolekülen wie Enzymen oder

anderen Proteinen verspricht, wurden Methoden entwickelt, um ESR-Spektren theoretisch aus einem Satz von Trajektorien zu simulieren. Bereits 1992 wurde von Robinson et al. [33] gezeigt, dass die Linienform eines cw-ESR-Spektrums aus einem Satz von Trajektorien der Magnetisierung generiert werden kann, der mit Hilfe von Simulationen der Brownschen Dynamik (BD) für ein einfaches isotropes Modell berechnet wurde. Um die verschiedenen Wechselwirkungen auf atomarer Ebene mit der Proteinumgebung und dem Lösungsmittel mit einzubeziehen, wurden später von Hubbell und Steinhoff [34] Simulationen der molekularen Dynamik (MD) für kleine Peptidsequenzen verwendet. Für die korrekte Berechnung von ESR-Spektren ist jedoch ein Satz von mindestens 70 sehr langen Trajektorien notwendig (ca. 500 ns), um auch langsame Rotationen mit Korrelationszeiten von bis zu 50 ns noch adäquat beschreiben zu können. Da dies für komplexere Systeme sehr lange Rechenzeiten nach sich zieht, wurde das Verfahren vorgeschlagen, MD-Simulationen nur noch zur Bestimmung eines effektiven Einteilchen-Potentials zu verwenden. Diese Potential dient dann als Grundlage für die weitaus weniger rechenintensiven BD-Simulationen [35,36]. Außerdem können die Ergebnisse der MD-Simulationen durch eine Anpassung der Freed'schen Potentialparameter für die Simulation eines ESR-Spektrums mit Hilfe des Freed'schen Programms verwendet werden [32]. Als Alternative dient die Simulation deutlich kürzerer Trajektorien, welche mittlerweile auch für ganze Proteine möglich ist [37]. Die Ergebnisse müssen jedoch aufgrund mangelnder Konvergenz der Winkelverteilung der molekularen z-Achse mit Vorsicht betrachtet werden.

Zielsetzung dieser Arbeit ist es, die einzelnen Einflüsse der Proteinumgebung auf die Spinsonde und damit das ESR-Spektrum zu charakterisieren, um eine bessere Interpretation experimenteller Spektren zu ermöglichen. Insbesondere die unterschiedlichen Auswirkungen der Dynamik des Proteinrückgrats und der Wechselwirkungen sowohl mit dem Rückgrat als auch mit den benachbarten Aminosäuren auf die Konformation und Dynamik der Spinsonde sind dabei von Interesse.

Dazu muß nach der Parametrisierung des Kraftfeldes für die Spinsonde zunächst gezeigt werden, dass ESR-Spektren, die aus BD-Simulationen mit Hilfe eines MD-Potentials generiert werden, qualitativ gleichwertig sind mit solchen, welche ausschließlich aus MD-Trajektorien berechnet werden. Diese Methodik kann dann auf die verschiedenen zu untersuchenden Systeme angewandt werden. Ihr großer Vorteil besteht darin, dass die auftretenden Wechselwirkungen größtenteils einzeln analysiert werden können. Dynamik und Struktur des untersuchten Proteinabschnitts können dabei im Rahmen eines Modellsystems an die jeweilige Fragestellung angepasst werden.

Als übergeordnete Fragestellungen lassen sich dabei folgende formulieren:

- Wie groß ist der Einfluss der Dynamik des Proteinrückgrats auf das ESR-Spektrum ?
- Welche Ursache haben Zwei-Komponenten-Spektren, und unter welchen Umständen treten diese auf ?
- Welche Bedeutung kommt elektrostatischen Wechselwirkungen der Spinsonde sowohl mit der Proteinumgebung, d.h. mit geladenen Aminosäuren, als auch mit Ionen im Lösungsmittel zu ? Welchen Einfluss hat die Größe benachbarter Aminosäuren ?
- Lassen sich winkelabhängige Spektren des auf einer Oberfläche adsorbierten Proteins mit der angewandten Methodik reproduzieren ?

Als Modellprotein dient hierfür das T4 Lysozym, dessen Struktur und Dynamik bereits umfassend untersucht wurde [z.B. 38-43]. Es handelt sich hierbei um ein kleines, globuläres Protein, bestehend aus zwei unterschiedlich großen Domänen. Als Verbindung zwischen den Domänen dient eine lange α -Helix, die sich hervorragend als Modellsystem eignet, da für viele Bereiche der Helix bereits umfassende experimentelle Daten vorliegen.

Die theoretischen Grundlagen der ESR-Spektroskopie und die Parameter der durchgeführten Simulationen werden in Kapitel 2 und 3 beschrieben. Kapitel 4 beschreibt die Dynamik der Spinsonde, während Kapitel 5 die Einbettung der Spinsonde in die molekulare Umgebung einer Alanin-Helix darstellt, wodurch die Wechselwirkungen zwischen Spinsonde und Helix analysiert werden können. Die Einbettung in verschiedene Proteinumgebungen und die Analyse experimenteller ESR-Spektren wird in Kapitel 6 beschrieben. In Kapitel 7 wird die Simulation winkelabhängiger Spektren des Proteins auf einer Lipidoberfläche dargestellt.