

Kapitel 3

Praktisches

3.1 Das molekulare System

Zur Berechnung eines konvergierten ESR-Spektrums des Spinmarkers in der Proteinumgebung ist ein Satz von ca. 70 Trajektorien einer Länge von 500 ns notwendig. Trajektorien dieser Länge für ein ganzes Protein zu berechnen, selbst wenn es, wie das T4 Lysozym, relativ klein ist, zieht jedoch eine Rechenzeit von mehreren Monaten nach sich. Auch wenn die Trajektorien der molekularen Dynamik nur für die Berechnung eines effektiven Potentials verwendet werden, und daher nicht mehr der ganze Satz von 70 Trajektorien berechnet werden muss, ist die Rechenzeit für die Simulation der Potentialfläche eines bestimmten Systems erheblich. Um die verschiedenen Einflüsse der Proteinumgebung auf die Spinsonde und damit das ESR-Spektrum zu charakterisieren und damit eine bessere Interpretation experimenteller Spektren zu ermöglichen, müssen Spektren der Spinsonde an verschiedenen Stellen des Proteinrückgrats berücksichtigt werden. Außerdem ist es von Interesse, die Auswirkungen der Dynamik des Proteinrückgrats und anderer Parameter der molekularen Dynamik auf die Mobilität der Spinsonde zu untersuchen. Die Berechnung von konvergierten Trajektorien für das ganze Protein mit verschiedenen spinmarkierten Bereichen ist im Rahmen einer Promotion mit den heutigen Rechnerleistungen jedoch nicht möglich. Es wurden zwar schon Simulationen für ganze Proteine durchgeführt [32,36], aber nur für einen Zeitraum von 5-20 ns, für den bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Trajektorien keine Konvergenz der Winkelverteilung auftrat. Für die Simulation längerer Trajektorien muss daher ein Modellsystem verwendet werden, welches aufgrund seiner im Vergleich zum Protein geringen Größe die Berechnung einer größeren Anzahl von ESR-Spektren für verschiedene Konfigurationen erlaubt und dennoch alle wichtigen Wechselwirkungen mit der molekularen Umgebung mit einschließt. Als Modellsystem wird hier eine α -Helix aus 19 Aminosäuren verwendet, deren Länge ausreichend ist, um eine unnatürliche Wechselwirkung der Spinsonde mit den Rändern der Helix zu vermeiden. Mit Hilfe dieses Systems kann die wichtige Klasse der experimentellen Spektren simuliert werden, bei denen der Spinmarker in

das Lösungsmittel zeigt und keine tertiären Wechselwirkungen mit den Aminosäuren anderer Bereiche des Proteins eingeht. Für Proteine in Lösung muß man beachten, dass die Rotationsdiffusion des gesamten Moleküls auch auf der Zeitskala der ESR-Spektroskopie abläuft und daher die Linienform des gemessenen ESR-Spektrums beeinflusst. Allerdings lässt sich diese globale Rotation durch eine Erhöhung der Viskosität des Lösungsmittels unterdrücken [73], so dass sie an dieser Stelle vernachlässigt werden kann.

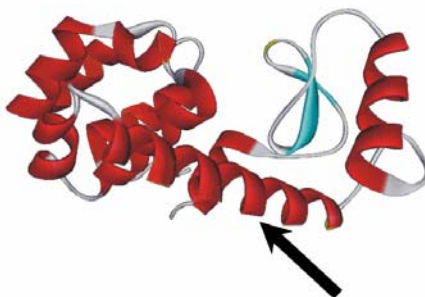


Abbildung 3.1. Verbindungshelix der beiden Domänen als Modellsystem

Zur Konstruktion dieses Modellsystems wurde ein 19 Aminosäuren langer Anteil (5 Helixwindungen) der Verbindungshelix der beiden Domänen aus der Kristallstruktur des Proteins extrahiert. Um eine Wechselwirkung mit den Endbereichen der Helix zu verhindern, wurde der Spinmarker in der Mitte der Helix platziert. Die Aminosäuren in der Umgebung des Spinmarkers konnten dann mit Hilfe des InsightII Biopolymer Moduls [74] zu den gewünschten Aminosäuren des jeweils betrachteten Systems mutiert werden. Mit dieser Methode kann der Spinmarker an jeder gewünschten Stelle des Proteinrückgrats simuliert werden.

3.2 Parameter zur Simulation der molekularen Dynamik

3.2.1 Simulationsparameter

Alle Simulationen wurden mit dem GROMACS-Programmpaket [52-54] durchgeführt. Um die Rechenzeit der Simulationen zu verkürzen, wurde ein Zeitschritt von 3 fs für die MD-Simulationen verwendet. Hierzu wurden die Bindungslängen der Wasserstoffatome während der Simulationen fixiert, da sich diese auf einer schnelleren Zeitskala bewegen und für eine realistische Beschreibung der Rotationsdynamik der Spinsonde nicht notwendig sind. Die mit dem Spinmarker versehene Helix wurde in eine Box mit expliziten SPC-Wassermolekülen eingebettet [89]. Für alle Simulationen wurden periodische Randbedingungen verwendet. Um eine schnellere Konvergenz der räumlichen Aufenthaltswahrscheinlichkeit der Spinsonde zu

ermöglichen, wurden die Simulationen, die ausschließlich zur Berechnung des effektiven Potentials verwendet wurden, bei einer Temperatur von 600 K durchgeführt. Simulationen zur Bestimmung der Diffusionskonstanten wurden in der Regel bei 300 K durchgeführt. Ausgenommen davon sind die temperaturabhängigen Spektren, die jeweils mit ihrer Simulationstemperatur deklariert sind. Bei den Simulationen mit einer Temperatur von 300 K wurde nach der Geometrieoptimierung des Simulationssystems zur besseren Equilibrierung eine Gleichgewichtsrechnung bei 200 K durchgeführt. Danach wurde das System graduell auf 300 K erhitzt. Koordinaten und Geschwindigkeiten wurden alle 100 ps ausgegeben. In der Kristallstrukturanalyse wird die Unordnung der Atome typischerweise durch einen sogenannten B-Faktor charakterisiert, der wie folgt definiert ist:

$$B(C_\alpha) = \frac{8\pi^2}{3} MSD(C_\alpha) \quad (3.1)$$

MSD steht dabei für Mean Square Deviation und ist definiert als

$$MSD(C_\alpha) = \left\langle \left[\vec{r}_{C_\alpha}(t) - \langle \vec{r}_{C_\alpha} \rangle \right]^2 \right\rangle_t \quad (3.2)$$

Um verschiedene B-Faktoren der Helix zu simulieren, wurde ein restriktives Potential auf die C_α -Atome der Helix ausgeübt, über dessen Kraftkonstanten sich der Bewegungsradius der C_α -Atome steuern lässt und damit die B-Faktoren der Helix festgelegt werden können.

Das restriktive Potential, welches auf die C_α -Atome der Helix ausgeübt wird, verhindert gleichzeitig eine Translation oder Rotationsdiffusion des ganzen Systems, die zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen würde. Auch eine zu starke Änderung der Sekundärstruktur der Helix ist auf diese Weise ausgeschlossen, so dass die Stabilität des Simulationssystems gewährleistet ist.

Als Cut-Off Radien für die Coulomb- und van der Waals-Wechselwirkungen wurde eine Entfernung von 10 Å in den MD-Simulationen verwandt, welche eine gute Beschreibung der Elektrostatik mit einer akzeptablen Rechenzeit verbindet [54].

3.2.2 Parametrisierung des Kraftfeldes

Abbildung 3.2 zeigt die Benennung der Atome der spinmarkierten Seitenkette R1. Da es sich hier um eine nicht natürliche Seitenkette handelt, existiert auch kein Parametersatz für die Beschreibung ihres Potentials in den üblichen Programmen zur Simulation der Dynamik, welche in der Regel auf natürliche Aminosäuren bzw. Proteine ausgerichtet sind und mit wenigen Ausnahmen auch nur für diese Parametersätze enthalten. Die Standardparametersätze können also für die natürlichen Aminosäuren in der molekularen

Umgebung des Spinmarkers verwendet werden. Den notwendigen Parametersatz für den Spinmarker kann man zwar durch Zuweisung der entsprechenden Parameter für die jeweils gleichen Bindungstypen und Bindungspartner der vorhandenen Parametersätze verschiedener Kraftfelder erhalten. Dieses Vorgehen liefert jedoch unter Umständen nur eine äußerst ungenaue Beschreibung der Rotationsdynamik, da die entsprechenden Konstanten für andere Moleküle optimiert wurden. Einen besser optimierten Parametersatz erhält man aus der Durchführung von ab initio Rechnungen, an welche der Parametersatz der Spinsonde dann angepasst werden kann. Hier wurden sowohl ab initio Rechnungen als auch die Zuweisung von bereits vorhandenen Parametern natürlicher Aminosäuren verwendet, um über einen späteren Vergleich der Ergebnisse eine Einschätzung des Einflusses verschiedener Parametrisierungen zu ermöglichen.

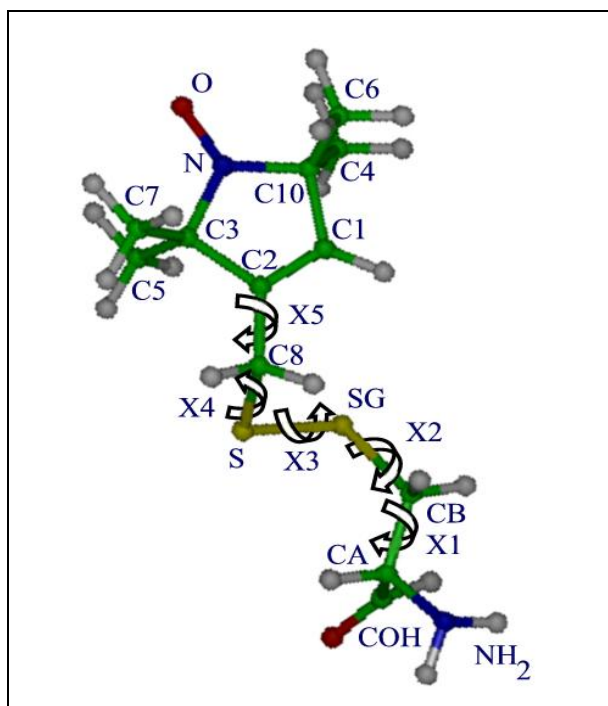


Abbildung 3.2. Die spinmarkierte Seitenkette R1

Die Rotationsdynamik des Spinmarkers wird im wesentlichen durch Rotationen um seine Diederwinkel beschrieben. Geometrische Veränderungen der Ringstruktur sind gering, und auch Änderungen von Bindungslängen und Winkeln des Spinmarkers tragen nur einen kleinen Teil zur Dynamik bei. Die verschiedenen Möglichkeiten der Rotation sind in Abbildung 3.2 gezeigt.

Für die Rotationen um die Diederwinkel $\chi_5 = CCCS$, $\chi_4 = CCSS$ und $\chi_3 = CSSC$ wurden Dichtefunktionaltheorie (DFT)-Rechnungen betrachtet. Die Rechnungen für χ_5 und χ_3 wurden meiner Diplomarbeit [75] entnommen. Für eine vollständigere Beschreibung wurde zusätzlich ein Satz von Rechnungen für die Rotation um χ_4 durchgeführt. Alle Rechnungen

wurden auf DFT Basis mit B3LYP und einem 6-31G* Basissatz vorgenommen. Die Rechnungen wurden mit dem Programmpaket GAUSSIAN98 [76] für den Spinmarker im Vakuum durchgeführt. Zur Berechnung der Potentialkurven wurde eine Reihe von Rechnungen mit festgelegten Werten der relevanten Diederwinkel (χ_3 - χ_5) durchgeführt, wobei sich die Potentialdiagramme aus den Gesamtenergien der geometrieoptimierten Strukturen für die jeweils gewählten Werte ergeben. Dabei ergibt sich für die Rotation um χ_3 eine hohe Energiebarriere (siehe Abbildung 3.3) zwischen den beiden stabilen Konformationen von 90° und 270° , deren Höhe auch durch die Literatur bestätigt wird [77-79,83]. Da der Verlauf der Energie für diesen Diederwinkel rotationssymmetrisch ist, wurde er nur für einen Bereich von 180° dargestellt. Die Höhe (8.5 kcal/mol) der Barriere, deren Maximum bei einer Konformation von $\chi_3=180^\circ$ liegt, wurde zusätzlich durch MP2-Rechnungen verifiziert. Durch diese Barriere, die bei 300 K auf der Zeitskala der ESR-Spektroskopie nicht überschritten wird, entstehen zwei Isomere¹ des Spinmarkers, die beide bei der Aufnahme von experimentellen Spektren vorhanden sind. Auch die Rotation um χ_5 ist wegen der sterischen Wechselwirkung des Disulfids mit den Methyl-Gruppen des Rings relativ stark eingeschränkt. Hier gibt es ebenfalls zwei globale Minima gleicher Energie (siehe Abbildung 3.4), für die allerdings auch bei Raumtemperatur ein Übergang stattfindet, da keine beidseitige hohe Barriere zwischen ihnen vorliegt. Die Asymmetrie des Potentials kommt hauptsächlich dadurch zustande, dass der Abstand zwischen den Methylgruppen des Rings und dem Schwefelatom, welches dem Ring am nächsten liegt, während der Rotation nicht symmetrisch ist und es so zu verschiedenen starken Repulsionen kommt.

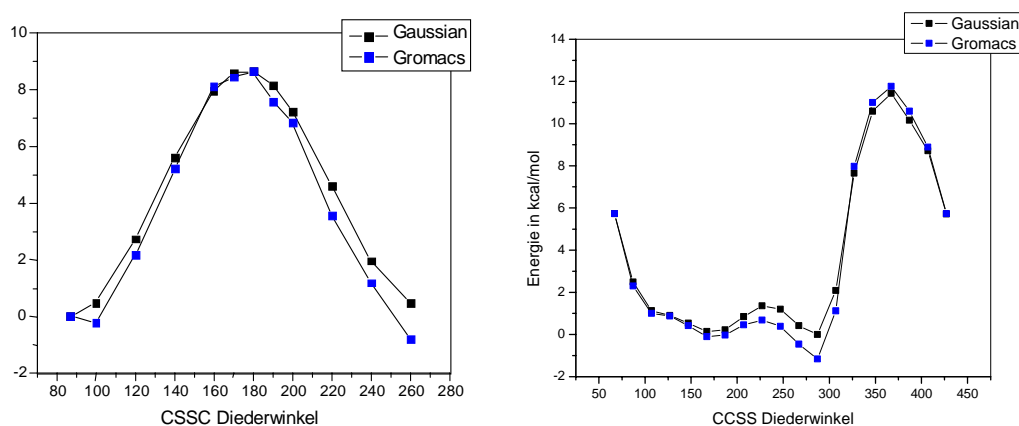


Abbildung 3.3. Links: Energieverlauf der spinmarkierten Seitenkette für Rotation um $\chi_3 = CSSC$ aus DFT-Rechnungen (schwarz) und dem adaptierten Potential in Gromacs (blau). Rechts: Energieverlauf für Rotation um $\chi_4 = CCSS$ aus DFT-Rechnungen (schwarz) und dem adaptierten Potential in Gromacs (blau).

¹ Eigentlich sind dies zwei Konformere des Moleküls. Da aber auf der Zeitskala der ESR-Spektroskopie keine Übergänge zwischen ihnen stattfinden, werden diese in der Literatur auch als Isomere bezeichnet, daher soll auch hier dieser Ausdruck verwandt werden. Im folgenden sind bei der Erwähnung von Isomeren stets die Disulfid-Isomere gemeint.

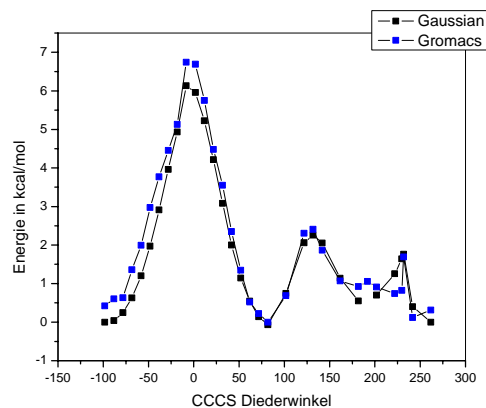


Abbildung 3.4. Energieverlauf der spinmarkierten Seitenkette für Rotation um $\chi_5 = CCCS$ aus DFT-Rechnungen (schwarz) und dem adaptierten Potential in Gromacs (blau).

Für die Rotation um χ_4 (Abbildung 3.3 rechts) ist ein relativ großer Winkelbereich frei zugänglich, da die sterischen Wechselwirkungen in diesem Bereich geringer ausfallen. Die kleinste Barriere hat für diese Rotation eine Höhe von 60% der kleinsten Barriere der χ_5 -Rotation. Der restliche Winkelbereich ist wegen seiner hohen Barriere bei Raumtemperatur unzugänglich. Die Rechnungen für die Rotationen um χ_4 und χ_5 wurden für das Isomer mit $\chi_3 = -90^\circ$ durchgeführt. Das Kraftfeld der spinmarkierten Seitenkette kann nach Durchführung der DFT-Rechnungen an den so bestimmten Energieverlauf angepasst werden. Dazu werden die Kraftkonstanten und Gleichgewichtswerte mit Hilfe eines least-square-Verfahrens so angefitet, dass sie den Energieverlauf der DFT-Rechnungen wiedergeben. Der Energieverlauf mit dem so bestimmten Kraftfeld ist in den Abbildungen 3.3 und 3.4 in blau wiedergegeben. Das genaue Verfahren ist in [75] beschrieben. Mit Hilfe dieses Verfahrens ist eine gute Darstellung der Energieverläufe der ab initio Rechnungen möglich.

3.2.2.1 Partiaalladungen

Die Partiaalladungen der einzelnen Atome werden in MD-Simulationen benötigt, um die jeweiligen Coulomb-Wechselwirkungen zwischen ihnen bestimmen zu können. Sie sind jedoch keine Observablen, und es existiert in der Theorie keine eindeutige Vorschrift für ihre Berechnung. Die Partiaalladungen der spinmarkierten Seitenkette wurden hier durch ab initio Rechnungen bestimmt. Die Genauigkeit der einzelnen Methoden ist dabei umstritten und die Ergebnisse müssen daher mit Vorsicht betrachtet werden. Es wurden zwei Rechnungen mit DFT(B3LYP) und MP2 und jeweils einem 6-31G* Basissatz durchgeführt. Die Partiaalladungen wurden mit einer Mulliken Populationsanalyse bestimmt. Die Ergebnisse für die relevanten Atome sind in Tabelle 3.1 aufgeführt.

Atom	DFT	MP2
N	-0.041	-0.172
O	-0.429	-0.413
C3	0.149	0.157
C10	0.188	0.170

Tabelle 3.1. Partialladungen der relevanten Atome mit den verschiedenen Methoden. Zur Bezeichnung der Atome siehe Abbildung 3.2.

Beide Rechnungen unterscheiden sich in signifikanter Weise nur in der Partialladung des Stickstoffatoms, welche für die MP2-Rechnung vom Betrag her deutlich höher ist. Als Ausgangspunkt für die MD-Simulationen werden die Partialladungen der DFT-Rechnung gewählt, da sie anderen, bereits veröffentlichten Partialladungen der spinmarkierten Seitenkette am nächsten kommen [36,81]. Der Einfluß der Partialladungen auf das simulierte System wird später anhand ihrer Variation untersucht.

3.3 Die Güte der verwandten Näherungen

Um eine effiziente Berechnung von ESR-Spektren zu gewährleisten, werden, wie zuvor beschrieben, zwei Näherungen nach dem Vorbild von Steinhoff und Hubbell [34] gemacht. Zum einen wird der Spin-Hamiltonoperator nicht vollständig, sondern mit Hilfe der „intermediate-field“ Näherung beschrieben. Zum anderen wird die Liouville-Gleichung nicht exakt, sondern nur näherungsweise gelöst, was eine analytische Betrachtung möglich macht. Vor allen die Annahme einer langsamen Änderung des Spindichteoperators ist für den Bereich der schnellen Bewegung keine gute Näherung mehr. Die Güte der mit Hilfe dieser Näherungen berechneten ESR-Spektren soll nun anhand eines Vergleiches mit dem Freed'schen Programm bestimmt werden, welches sowohl den exakten Spin-Hamiltonoperator berücksichtigt als auch eine exakte numerische Lösung der Liouville-Gleichung bietet. Dieser Vergleich wurde für die freie Brownsche Diffusion bereits von Steinhoff und Hubbell [34] vorgestellt, soll aber hier zur Überprüfung des eigenständig angefertigten Simulationsprogramms dienen. Dazu werden Trajektorien der freien Brownschen Diffusion, also mit einem konstanten Potential, für verschiedene Diffusionskonstanten berechnet. Aus den mit der beschriebenen Methodik entstehenden ESR-Spektren kann dann die Güte der Näherungen durch einen Vergleich mit Spektren des Freed'schen Programms mit den gleichen Diffusionskonstanten für die verschiedenen relevanten Bereiche der Dynamik bestimmt werden. In Abbildung 3.5 ist der Vergleich der Spektren gezeigt.

Die Werte der g - und Hyperfeintensoren für die Spinsonde wurden für die Berechnung der ESR-Spektren der Literatur entnommen [66]:

g_x	g_y	g_z	$A_{xx} [G]$	$A_{yy} [G]$	$A_{zz} [G]$
2.0076	2.0050	2.0023	6.2	5.9	37.0

Tabelle 3.2. Magnetische Parameter der Spinsonde für die Simulation von ESR-Spektren

Dabei wurden für beide Simulationsarten anstelle der x - und y -Komponenten des Hyperfeintensors ihr Mittelwert verwandt, da für die Berechnung des Spektrums aus den Trajektorien die Näherung eines axialsymmetrischen Tensors vorausgesetzt wird.

Die ESR-Spektren zeigen in allen Bereichen der Dynamik eine relativ gute Übereinstimmung der spektralen Form und Breite mit den exakten Spektren des Freedschen Programms. Die verwandten Näherungen bilden daher eine gute Grundlage für die Simulation von Spektren für die spinmarkierte Seitenkette. Abweichungen ergeben sich aus den verwandten Näherungen vor allen im mittleren Bereich der Dynamik mit einer Diffusionskonstante von $3 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$. Die Bereiche mit den größten Abweichungen sind in Abb. 3.5 durch Pfeile markiert.

In der Proteinumgebung liegt natürlich keine freie Bewegung im Lösungsmittel vor, sondern die Spinsonde wird durch die umgebenden Gruppen in ihrer Bewegung eingeschränkt. Theoretisch wird dieser Einschränkung durch die Einführung eines Potentials, welches die Amplitude der Bewegung begrenzt, Rechnung getragen. Um die Güte der Beschreibung eines solchen Potentialbeitrags zu charakterisieren, wurden vergleichende Simulationen mit dem Freed'schen Programm und der Brownschen Dynamik durchgeführt, denen das selbe Potential und die gleichen Diffusionskonstanten zugrunde lagen.

Für diesen Vergleich wurde das Freed-Potential in das hier verwandte Simulationsprogramm implementiert. Ein Vergleich beider ESR-Spektren ist in Abbildung 3.6 gezeigt. Für das Freedsche Potential wurde dabei für beide Simulationen nur der erste Term mit einem Koeffizienten von $c_0^2 = 2.15$ verwandt. Es wurde für beide Simulationen eine isotrope Diffusionskonstante von $D = 7.8 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$ festgelegt.

Die zuvor bereits aufgetretenen Abweichungen werden nun durch Anwesenheit des Potentials noch leicht verstärkt. Die signifikanteste Abweichung findet man im Hochfeldteil der senkrechten Hyperfeinkomponente, die durch einen Pfeil in Abb. 3.6 markiert ist. Dies zeigt, dass etwaig beobachtete Abweichungen in diesen Bereichen des Spektrums mit den verwandten Näherungen zusammenhängen können.

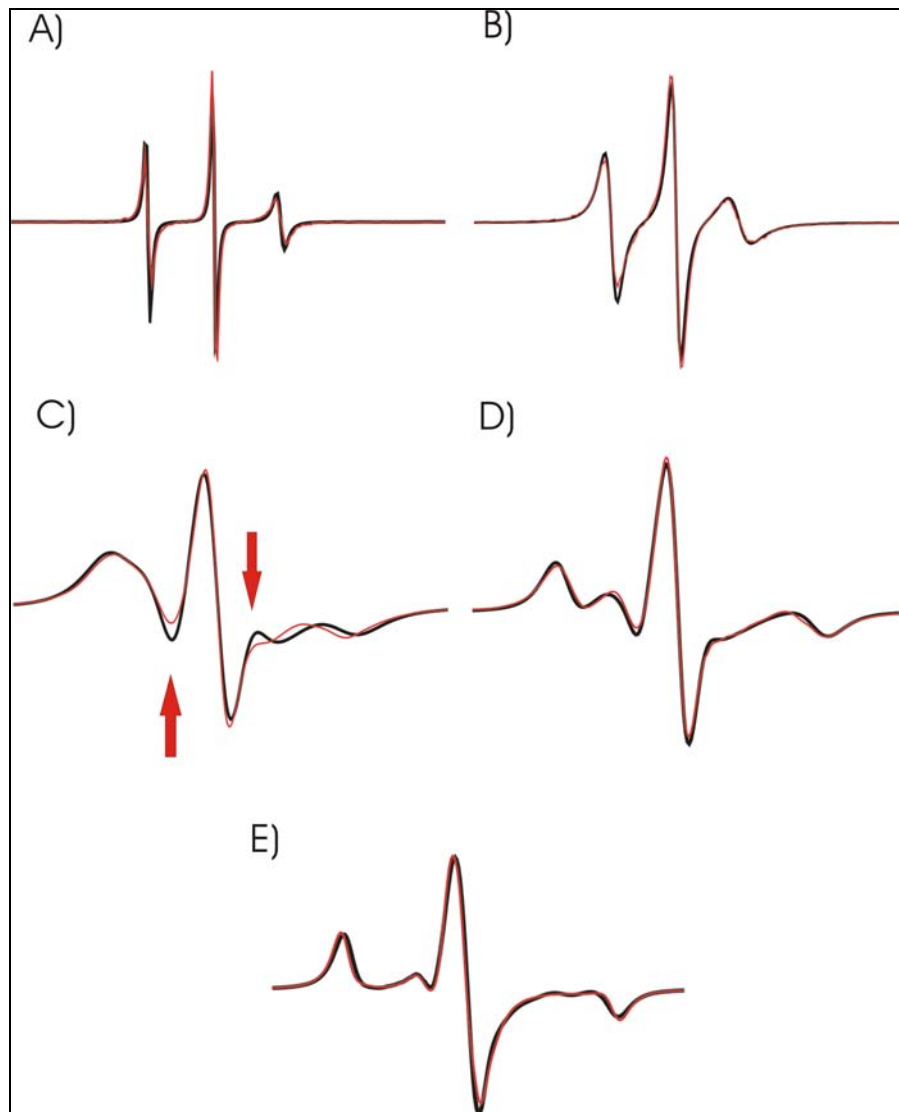


Abbildung 3.5. Vergleich der mit Hilfe der Näherungslösung und Brownscher Dynamik berechneten Spektren (rote Linie) mit Spektren des Freedschen Programms (schwarze Linie). Diffusionskonstanten: a) $3 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}$, b) $1 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}$, c) $3 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$, d) $1 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$, e) $3 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$. Die Linienbreite wurde jeweils an das Spektrum des Freedschen Programms angepasst.

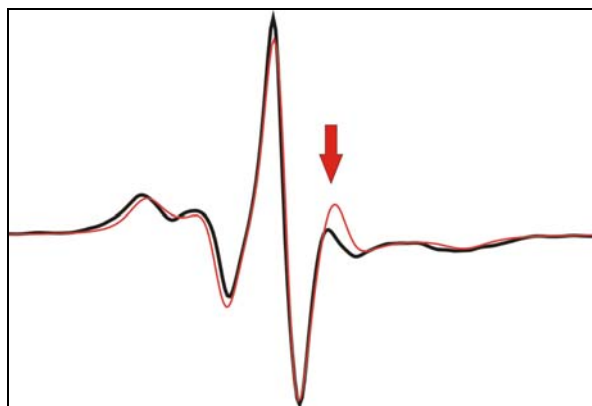


Abbildung 3.6. Vergleich der ESR-Spektren aus dem Freedschen Programm (rot) und der Simulation mit den zuvor beschriebenen Näherungen (schwarz).