

Kapitel 4

Die Dynamik der Spinsonde

4.1 Die Simulation des molekularen Systems

Für eine spätere Identifizierung der verschiedenen Einflüsse der Wechselwirkungen der Spinsonde mit der molekularen Umgebung soll zunächst die Dynamik der Spinsonde einzeln betrachtet werden. Hierzu wurde die paramagnetische Seitenkette zwischen dem C_β - und dem C_α -Atom gespalten. Die freie Valenz wurde mit einem Wasserstoffatom gesättigt. Während der Simulation der molekularen Dynamik wurden die S_γ und C_β -Atome durch ein Potential räumlich fixiert, so dass zwar Rotationen um ihre Bindung möglich sind, jedoch die Ausrichtung dieser Bindung nicht frei fluktuieren kann, was auch für eine Bindung der Spinsonde an die α -Helix nicht möglich wäre. Die Spinsonde wurde zur Simulation ihrer Dynamik in einer Box mit expliziten SPC-Wassermolekülen gelöst.

Anhand dieses sehr einfachen Systems sollen nun eine Reihe von methodischen Tests vorgenommen werden, welche die Grundlage für das später verwandte Simulationsverfahren bilden.

Zunächst soll anhand der Dynamik der Spinsonde ein Vergleich von Spektren, die aus MD-Simulationen berechnet wurden, und mit Hilfe der Brownschen Dynamik berechneten ESR-Spektren vorgenommen werden, um die Qualität beider Methoden zu vergleichen. Um Spektren aus Trajektorien der Brownschen Dynamik zu simulieren, müssen die Potentialfläche der molekularen z-Achse und die Diffusionskonstante bekannt sein. Für die Berechnung von Spektren mit Hilfe der Brownschen Dynamik wurden daher zunächst Rechnungen bei einer Temperatur von 600 K durchgeführt, um eine schnelle Konvergenz der Verteilungen der einzelnen Diederwinkel und der Ausrichtung des Normalenvektors der Ringebene der Spinsonde zu ermöglichen, aus der später das effektive Potential der Brownschen Dynamik ermittelt wurde. Diffusionskonstanten für die Berechnung des Spektrums wurden aus 70 MD-Trajektorien einer Temperatur von 270 K ermittelt. Für die Berechnung eines ESR-Spektrums aus MD-Trajektorien wurden so viele Trajektorien der Spinsonde bei 270 K berechnet, bis die Konvergenz des ESR-Spektrums eingetreten war.

Anschließend werden die Spektren aus MD-Trajektorien und Brownschen Trajektorien verglichen.

Im nächsten Schritt sollen die Unterschiede der molekularen Dynamik der Spinsonde zwischen verschiedenen Kraftfeldern beurteilt werden. Hierzu wurden neben dem an ab initio Rechnungen angepassten Kraftfeld auch Spektren der Brownschen Dynamik mit den Kraftfeldern AMBER [55] und CHARMM [56] sowie dem GROMACS-Kraftfeld [57] berechnet. Ein Vergleich mit dem adaptierten Kraftfeld kann so Qualitätsunterschiede aufzeigen.

Zuletzt soll der Temperaturverlauf der ESR-Spektren für die Spinsonde untersucht werden. Dafür wurden Trajektorien bei 270, 275, 280, 285, 290 und 300 K berechnet. Diffusionskonstanten wurden dabei wie zuvor beschrieben aus jeweils zwei MD-Trajektorien für die entsprechenden Temperaturen gewonnen. Anschließend wurden Trajektorien der Brownschen Dynamik zur Simulation des ESR-Spektrums berechnet.

4.2 Die Winkelverteilung der Diederwinkel

Die Winkelverteilung der Diederwinkel ist für die Charakterisierung der molekularen Dynamik von besonderer Bedeutung, da die Rotationsdiffusion der Spinsonde in erster Linie aus Rotationen um die Diederwinkel hervorgeht. Wie in Abschnitt 2.5.3 beschrieben, wird die Potentialfläche der Diederwinkel $\chi_5 = CCCS$ und $\chi_4 = CCSS$ aus ihrer Wahrscheinlichkeitsverteilung in den 600 K Trajektorien berechnet. Sie ist in Abbildung 4.1 gezeigt.

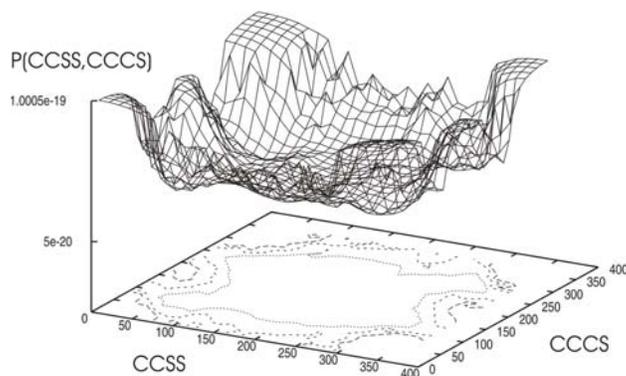


Abbildung 4.1. Potentialfläche der Diederwinkel $\chi_5 = CCCS$ und $\chi_4 = CCSS$.

Die zweidimensionale Darstellung des Potentials der Diederwinkel-Rotationen aus den ab initio Rechnungen kann so mit Hilfe der MD-Simulationen auf mehrere Dimensionen erweitert werden. Die Potentialfläche spiegelt die relativ hohe Mobilität der Spinsonde wider. Aufgrund des großen, flachen Bereiches in der Mitte der Potentialfläche kann geschlossen werden, dass ein großer Teil der verschiedenen Konformationen der Diederwinkel leicht

zugänglich ist. Nur wenige Konformationen treten während der Simulation nicht auf. In Bereichen, in denen die Wahrscheinlichkeit Null ist, wird das Potential an einem konstanten Wert von $10^{-19} J$ abgeschnitten, welcher so gewählt wurde, dass die Struktur der Potentialfläche gut zu erkennen ist. Dieser Wert für die Begrenzung des Potentials wird auch für die später betrachteten Potentialflächen der Diederwinkel verwendet.

Die Wahrscheinlichkeitsverteilung des Diederwinkels $\chi_3 = CSSC$ ist in Abbildung 4.2 gezeigt. In einer MD-Simulation mit einer Temperatur von 600 K ist für diesen Diederwinkel ein Übergang zwischen den beiden Isomeren der Spinsonde möglich, es können daher auf diese Weise beide Konformationen des Moleküls für die Berechnung der Potentialfläche berücksichtigt werden. Dies ist relevant, da experimentell stets beide Isomere im Lösungsmittel vorliegen. Bei der Simulation der molekularen Dynamik liegen beide möglichen Diederwinkel mit annähernd gleicher Wahrscheinlichkeit vor, die durch die Potentialfläche vorgegebene Verteilung wird also korrekt dargestellt.

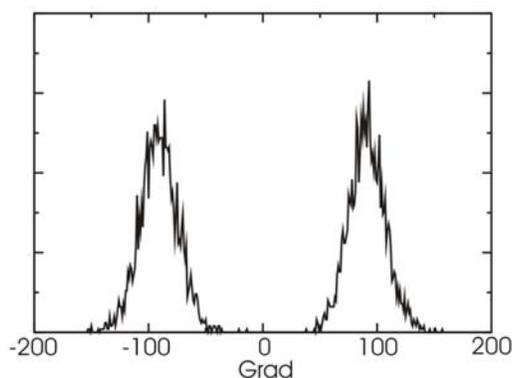


Abbildung 4.2. Wahrscheinlichkeitsverteilung des Diederwinkels $\chi_3 = CSSC$.

4.3 Das ESR-Spektrum aus MD-Trajektorien

Das ESR-Spektrum der Spinsonde aus MD-Trajektorien wird nach der in Kapitel 2 beschriebenen Methodik berechnet. Um eine Konvergenz des Spektrums zu erzielen, war die Berechnung von 70 Trajektorien einer Länge von 500 ns für die Spinsonde im Lösungsmittel notwendig. Um die Konvergenz der Winkelverteilung zu überprüfen, wurde die für die gewählte Simulationstemperatur von 270 K zu erwartende Winkelverteilung aus der Winkelverteilung einer 600 K Rechnung mit Hilfe von Gleichung 2.91 ermittelt und mit der tatsächlichen Winkelverteilung verglichen. Für die aus 70 Trajektorien berechnete Winkelverteilung stimmte das Resultat mit der konvergierten Verteilung aus der 600 K Rechnung überein. Das ermittelte Spektrum für eine Simulationstemperatur von 270 K ist in

Abbildung 4.3 dargestellt. Aufgrund der relativ geringen Temperatur zeigt das ESR-Spektrum ein sehr immobiles Verhalten der Spinsonde. Ein Spektrum dieser Form kann entweder durch eine begrenzte Amplitude der molekularen z-Achse oder/und durch eine langsame Bewegung entstehen. Welche der beiden Varianten vorliegt, kann aufgrund der spektralen Linienform in einem mittleren Bereich der Dynamik nur schwer zugeordnet werden und kann daher besser durch eine Analyse des Radius der Bewegung anhand der Potentialfläche der molekularen z-Achse sowie der Diffusionskonstanten festgestellt werden.

Dieser Zusammenhang wird im nächsten Abschnitt untersucht.



Abbildung 4.3. ESR-Spektrum aus 70 MD-Trajektorien der Spinsonde bei einer Temperatur von 270 K.

4.4 Das ESR-Spektrum aus Trajektorien der Brownschen Dynamik

4.4.1 Die Potentialfläche der molekularen z-Achse

Abbildung 4.4 zeigt die Potentialfläche der molekularen z-Achse im Laborkoordinatensystem, welche aus den MD-Trajektorien extrahiert wurde. Die Potentialfläche weist eine annähernd isotrope Verteilung auf, die Immobilität des ESR-Spektrums kommt also durch eine langsame Bewegung zustande, die durch die geringe Temperatur des Systems erklärt wird.

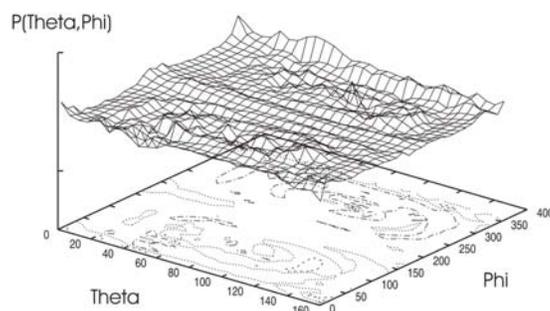


Abbildung 4.4. Potentialfläche der molekularen z-Achse im Laborkoordinatensystem.

Betrachtet man die Dynamik der Spinsonde ohne den Einfluss der Proteinumgebung, so entstehen nur Einschränkungen für gewisse Kombinationen von Diederwinkeln durch sterische Wechselwirkung zwischen den einzelnen Atomen der Spinsonde. Eine Einschränkung für den Bewegungsradius der molekularen z-Achse besteht jedoch unter diesen Umständen nicht.

Abbildung 4.5 zeigt die Wahrscheinlichkeitsverteilung der molekularen z-Achse als Kugeloberflächengraphik. In dieser Darstellung ist die fast isotrope Verteilung gut zu erkennen. Vereinzelt Punkte höherer Intensität kommen hier durch Randeffekte des Glättungsalgorithmus zustande und können daher vernachlässigt werden. Aufgrund der Isotropie tritt in diesem Fall die Problematik zur richtigen Wahl des Direktorkoordinatensystems nicht auf, da es praktisch kein ausrichtendes Potential gibt. Als Winkel zwischen dem Diffusionskoordinatensystem und dem Molekülkoordinatensystem wird $\beta_D = 0^\circ$ verwendet. Eine Änderung dieses Winkels hat aufgrund der annähernd isotropen Verteilung und der isotropen Diffusionskonstante(s. 4.4.2) jedoch keinen Einfluß auf das ESR-Spektrum.

Unterschiede in der Dynamik der beiden Disulfid-Isomere bezüglich ihres Bewegungsradius oder ihrer Diffusionskonstante bestehen für die Bewegung der Spinsonde im Lösungsmittel nicht.

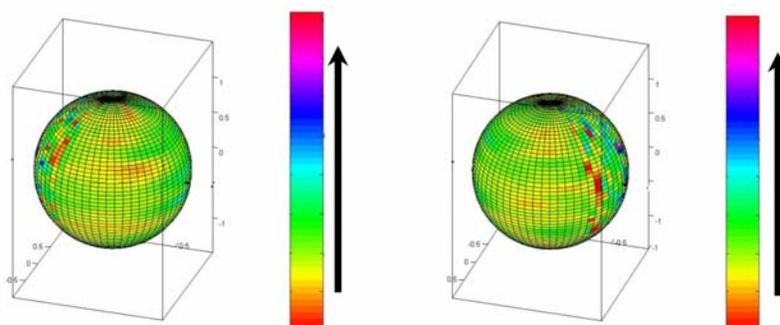


Abbildung 4.5. Wahrscheinlichkeitsverteilung der molekularen z-Achse für den Spinmarker.

4.4.2 Die Berechnung der Diffusionskonstanten

Die Diffusionskonstanten werden wie in Kapitel 2.5.3.2 beschrieben aus den 70 Trajektorien der molekularen Dynamik berechnet. Dafür werden die Autokorrelationsfunktionen der Polarwinkel für jede Trajektorie berechnet. Zur Anpassung der Diffusionskonstanten werden dann die mittleren Autokorrelationsfunktionen über alle Trajektorien verwendet. Dabei ergibt sich eine isotrope Diffusionskonstante von

$$D = (1.57 \pm 0.05)10^7 \text{ s}^{-1}$$

für die Spinsonde. Für die Spinsonde im Lösungsmittel ergeben sich dabei keine Unterschiede in der Diffusionskonstante der beiden Disulfid-Isomere. Abbildung 4.6 zeigt die aus den MD-Trajektorien berechnete Autokorrelationsfunktion im Vergleich zum exponentiellen Fit.

Der Fehler entspricht den Abweichungen der Autokorrelationsfunktion von der exponentiellen Form, da die Diffusionskonstante bei einer Anzahl von 70 Trajektorien prinzipiell konvergiert ist. Diese Abweichungen bestehen aufgrund der Tatsache, dass es sich nicht um einen simplen monoexponentiellen Zerfall handelt, wie hier näherungsweise angenommen wird. Für den Fit wurde die Analyse verschiedener Bereiche der Autokorrelationsfunktion getestet. Die beste Übereinstimmung mit dem aus MD-Trajektorien berechneten Spektrum ergibt sich jedoch für eine Berücksichtigung des gesamten Zeitbereiches. Mit Hilfe der Diffusionskonstante und der zuvor berechneten Potentialfläche können nun Brownsche Trajektorien für die Berechnung des ESR-Spektrums produziert werden.

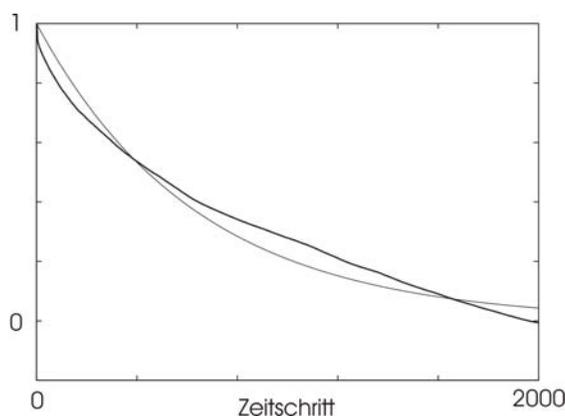


Abbildung 4.6. Autokorrelationsfunktion der Polarwinkel aus den MD-Trajektorien (fette Linie) im Vergleich zum exponentiellen Fit (schmale Linie) in Abhängigkeit des Zeitschrittes der MD-Trajektorien (1 Zeitschritt= 100 ps).

4.4.3 Das ESR-Spektrum aus Brownschen Trajektorien

Für die Berechnung des Spektrums wurden 200 Trajektorien der Brownschen Dynamik produziert. Abbildung 4.7 zeigt den Vergleich der beiden ESR-Spektren aus den MD-Simulationen und Simulationen der Brownschen Dynamik.

Die Unterschiede zwischen den Spektren beider Methoden sind sehr gering, so dass sich mit beiden Ansätzen ein vergleichbares Ergebnis erzielen lässt. Dies liegt insbesondere daran, dass die Reduktion der Dynamik auf eine Fourierkomponente (s. monoexponentieller Zerfall der Autokorrelationsfunktion) eine brauchbare Näherung darstellt. Es konnte daher gezeigt

werden, dass sich eine ergodische MD-Trajektorie genau wie Trajektorien der Brownschen Dynamik zur Berechnung eines qualitativ guten ESR-Spektrums eignet.

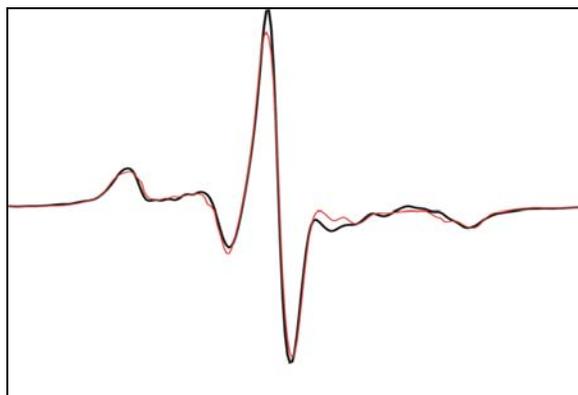
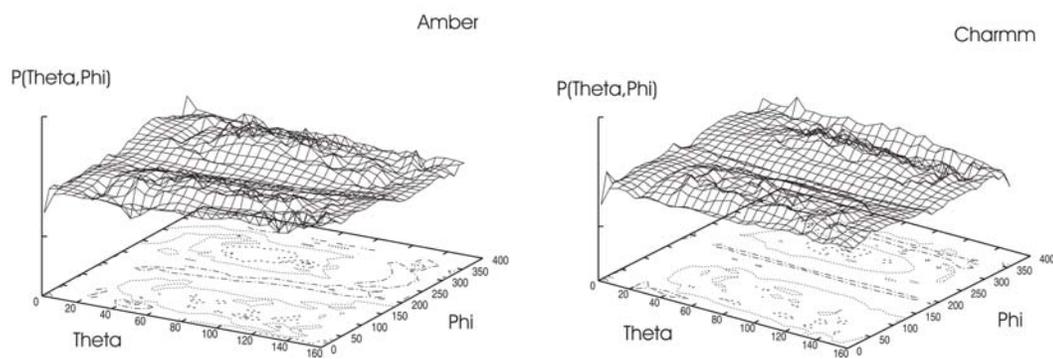


Abbildung 4.7. Vergleich der ESR-Spektren aus MD-Trajektorien (rote Linie) und Brownschen Trajektorien (schwarze Linie)

4.5 Vergleich der verschiedenen Kraftfelder

Um die Auswirkung verschiedener Kraftfelder auf die Berechnung eines ESR-Spektrums für die Spinsonde zu überprüfen, werden MD-Trajektorien einer Temperatur von 600 K mit den Kraftfeldern AMBER [55], CHARMM [56] und GROMACS [57] für die Spinsonde simuliert. Hierfür wurden Kraftkonstanten und Gleichgewichtswerte aus den Standardparametrisierungen der Kraftfelder für die jeweils gleichen Bindungstypen den Bindungen der Spinsonde zugeordnet. Das gleiche Verfahren wird für Winkel und Diederwinkel durchgeführt.

Aus den Hochtemperaturtrajektorien werden dann ebenfalls die Potentialflächen der molekularen z-Achse im Laborkoordinatensystem für die einzelnen Kraftfelder berechnet und zur Simulation eines ESR-Spektrums verwendet. Abbildung 4.8 zeigt die Potentialflächen der verschiedenen Kraftfelder.



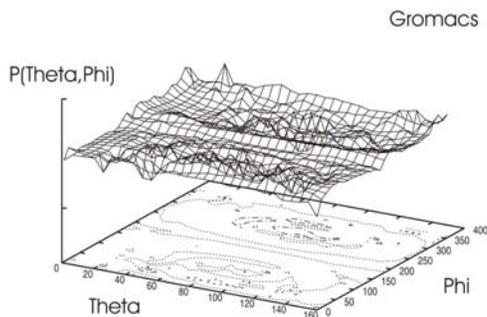


Abbildung 4.8. Potentialflächen der molekularen z-Achse für die Kraftfelder Amber, Charmm und Gromacs aus 600 K MD-Trajektorien

Alle Potentialflächen der molekularen z-Achse weisen eine leicht höhere Anisotropie auf als die Potentialfläche des an die ab initio-Rechnungen angepassten Kraftfeldes.

Die Unterschiede entstehen dabei durch die verschiedenen Parametrisierungen, die zu Differenzen in den Verteilungen der Diederwinkel χ_4 und χ_5 und hierdurch auch zu Änderungen in der Winkelverteilung der molekularen z-Achse führen. Die zugehörigen ESR-Spektren werden für den Vergleich der Kraftfelder aus Trajektorien der Brownschen Dynamik berechnet und mit dem Spektrum des angepassten Kraftfeldes in Abbildung 4.9 gezeigt.

Die drei Standard-Kraftfelder zeigen dabei eine sehr ähnliche Spektrenform. Zwischen den Standard-Kraftfeldern und dem angepassten Kraftfeld existieren leichte Abweichungen in den ESR-Spektren, die aus den leicht unterschiedlichen Potentialflächen hervorgehen. Trotz der hier nur leichten Abweichungen ist die Konstruktion eines an die speziellen Eigenschaften der Spinsonde angepassten Kraftfeldes sinnvoll, da in komplizierteren molekularen Umgebungen auch kleine Abweichungen in der Winkelverteilung zu unterschiedlichen Wechselwirkungen mit der Umgebung führen können.

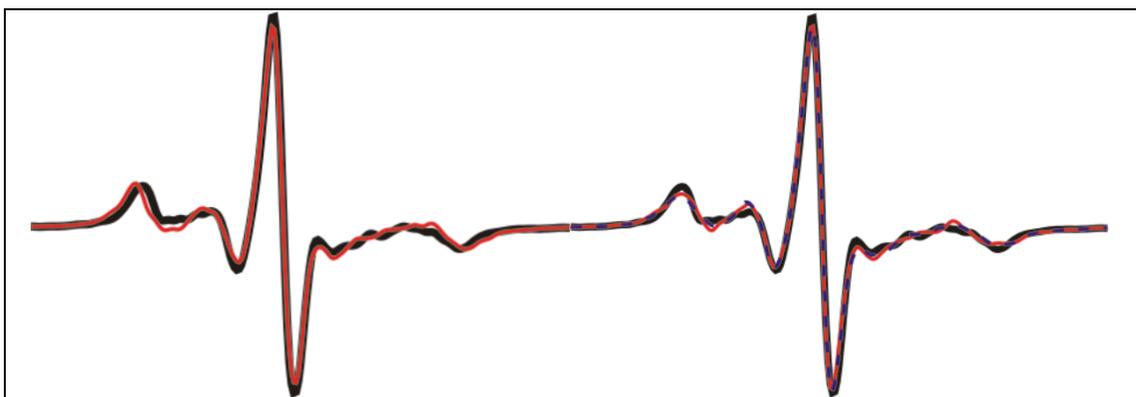


Abbildung 4.9. Vergleich der ESR-Spektren der verschiedenen Kraftfelder bei 270 K: Schwarze Linie: angepasstes Kraftfeld, Links: rote Linie: AMBER, rechts: rote Linie: CHARMM, blaue Linie: GROMACS.

4.6 Der Temperaturverlauf der Spektren der Spinsonde

Für einen späteren Vergleich mit den ESR-Spektren der Spinsonde unter Einbeziehung der Wechselwirkung mit Teilen der Proteinumgebung ist es interessant, den Temperaturverlauf der Spektren für die Spinsonde zu betrachten.

Dafür werden Spektren mit Hilfe der Brownschen Dynamik aus je 200 Trajektorien berechnet. Für die Simulation der Trajektorien wird die zuvor bestimmte Potentialfläche verwendet, die Diffusionskonstanten für die jeweiligen Temperaturen werden aus jeweils zwei Trajektorien der molekularen Dynamik für die Spinsonde bestimmt.

Temperatur [K]	Diffusionsk.
400	$9.0 * 10^8 s^{-1}$
300	$5.0 * 10^8 s^{-1}$
290	$1.5 * 10^8 s^{-1}$
285	$6.2 * 10^7 s^{-1}$
280	$3.1 * 10^7 s^{-1}$
275	$1.9 * 10^7 s^{-1}$

Tabelle 4.1. Diffusionskonstanten der Spinsonde für die verschiedenen Temperaturen

ESR-Spektren werden für Temperaturen von 400, 300, 290, 285, 280 und 275 K berechnet. Die zugehörigen Diffusionskonstanten sind in Tabelle 4.1 gegeben. Abbildung 4.10 zeigt die zugehörigen ESR-Spektren.

Für das Spektrum, welches für eine Temperatur von 400 K aus Brownschen Trajektorien berechnet wurde, wurde zum Vergleich das aus einer einzelnen MD-Trajektorie gewonnene Spektrum gezeigt, die bei dieser Temperatur für die Konvergenz der Winkelverteilung ausreichend ist. Daher ergibt sich hier auch bei der Verwendung von nur einer MD-Trajektorien kein Unterschied zwischen beiden Spektren. In diesem Temperaturbereich befindet sich die Spinsonde schon nahezu im Grenzfall schneller Bewegung, das Spektrum zeigt den isotropen Linienabstand. Dies ist auch bei 300 K noch der Fall. Mit sinkender Temperatur wächst aufgrund einer durch die deutlich langsamere Bewegung unvollständigen Erfassung des Winkelbereiches die spektrale Breite deutlich an.

Das Spektrum bei 275 K ist bereits sehr immobil und vom Grenzfall der langsamen Bewegung nicht mehr weit entfernt. Für das Spektrum bei 290 K wurde zur Veranschaulichung der Konvergenz ein nicht konvergiertes ESR-Spektrum aus einer Trajektorie der molekularen Dynamik dem konvergierten Spektrum aus Brownschen Trajektorien gegenübergestellt.

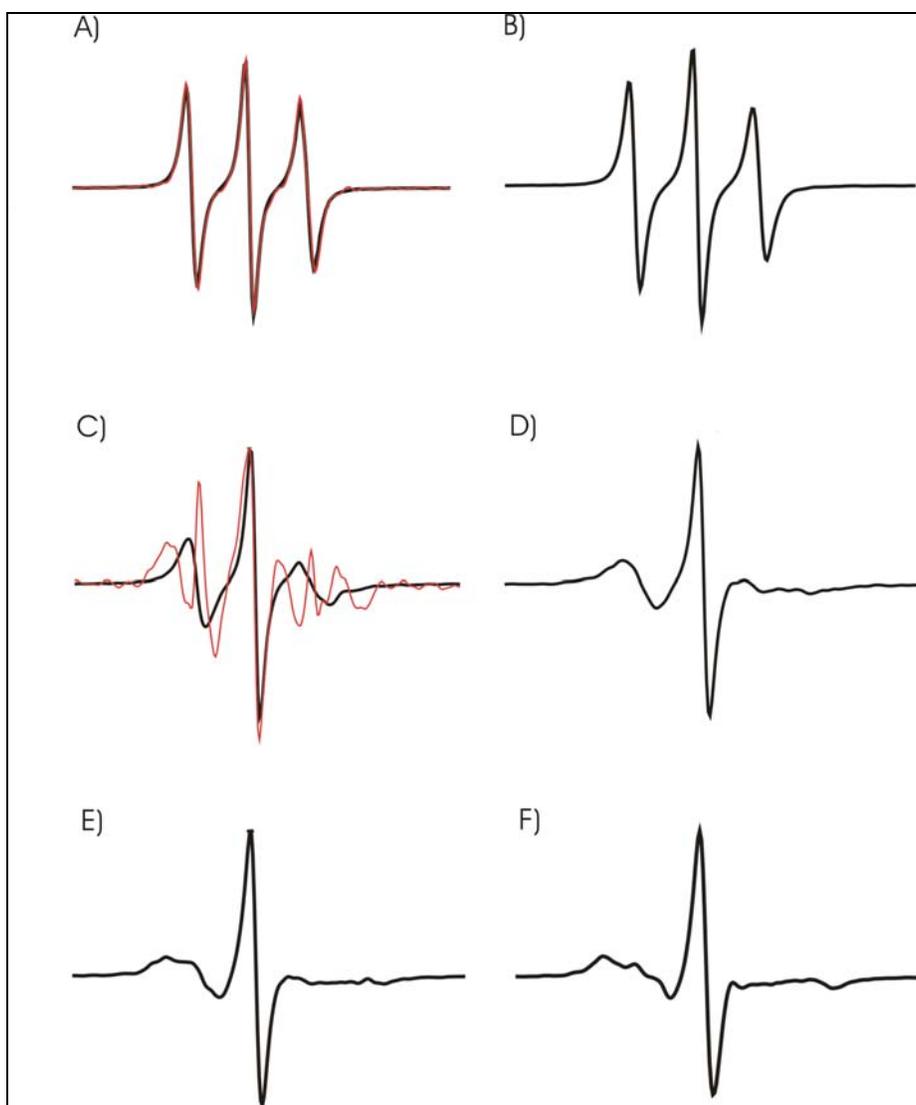


Abbildung 4.10. ESR-Spektren für die verschiedenen Temperaturen. A: 400 K, schwarze Linie: Brownsche Trajektorien, rote Linie: MD-Trajektorie; B: 300 K, C: 290 K schwarze Linie: Brownsche Trajektorien, rote Linie: MD-Trajektorie, D: 285 K, E: 280 K, F: 275 K.

Vergleicht man den Temperaturverlauf der Spektren mit experimentellen Spektren der Spinsonde in der Proteinumgebung, so erhält man für die Spinsonde im Lösungsmittel ein in allen Temperaturbereichen deutlich mobileres Verhalten, da der Radius der Bewegung hier nicht durch Wechselwirkungen mit der Umgebung eingeschränkt ist. Obwohl die Richtung der C-S-Bindung hier konstant ist, was in der Proteinumgebung nicht der Fall ist, tragen sowohl die freie Rotation um diese Bindung als auch der größere Bewegungsradius des Diederwinkels χ_5 (vergl. nächstes Kapitel) zur erhöhten Mobilität bei. Auch die relative spektrale Änderung ist daher im Vergleich für die freie Spinsonde größer.

4.7 Fixierung der CSS-Ebene

Zunächst wurde nur die Ausrichtung der C-S Bindung fixiert, eine Rotation um diese Bindung war jedoch uneingeschränkt möglich. Da diese Rotation durch die Wechselwirkung mit einer Helix stark eingeschränkt ist (vgl. Kap. 5), soll nun ein anderer Grenzfall betrachtet werden, bei dem neben der C-S Bindung auch die S-S Bindung im Raum fixiert ist. Dies ist für die spätere Analyse der Dynamik in der Proteinumgebung noch von Interesse. Das unter diesen Voraussetzungen aus den MD-Trajektorien berechnete Spektrum im Vergleich zu dem Spektrum für freie Rotation um die C-S Bindung ist in Abbildung 4.11 dargestellt.

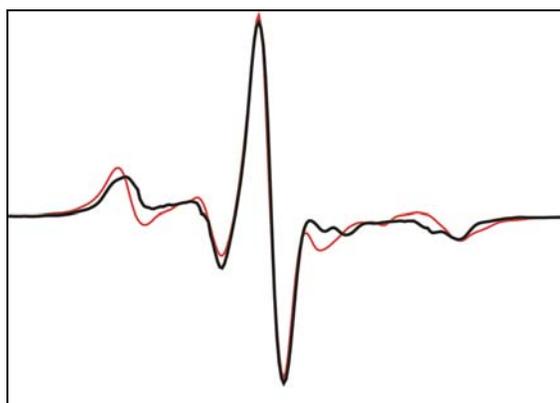


Abbildung 4.11. ESR-Spektrum für die fixierte S-S Bindung (rot) im Vergleich zum Spektrum für freie Rotation um die C-S Bindung (schwarz) aus MD-Trajektorien für 270 K.

Verwendet man anstelle der fixierten $C_{\beta} - S$ Bindung ein System, für das zusätzlich die Schwefel-Schwefel-Bindung räumlich fixiert ist, so erhält man noch einmal eine deutliche Immobilisierung im ESR-Spektrum, da abgesehen vom Übergang zwischen den Isomeren nur noch Rotationen um χ_5 und χ_4 möglich sind. Die Reorientierung der $S - S$ Bindung spielt also für die Dynamik der freien Spinsonde durchaus eine Rolle. Für eine genauere Charakterisierung soll auch hier die Potentialfläche der molekularen z-Achse aus den Hochtemperaturtrajektorien bestimmt werden. Sie wird in Abb. 4.12 dargestellt.

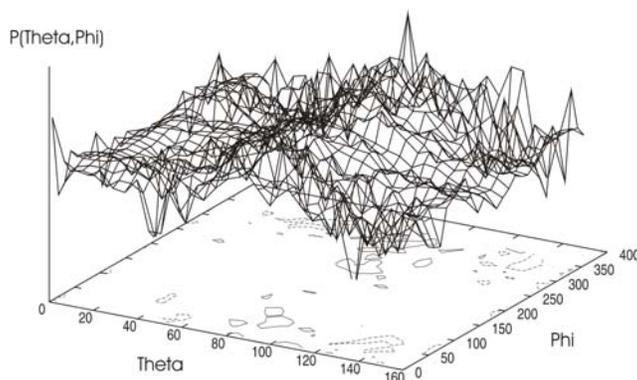


Abbildung 4.12. Potentialfläche der molekularen z-Achse aus Hochtemperaturtrajektorien für eine fixierte S-S Bindung.

Für diesen Fall erhält man keine isotrope Winkelverteilung mehr, sondern eine Beschränkung der Amplitude durch zwei ausgeprägte Maxima. Zum späteren Vergleich mit der Helix wurde mit Hilfe Brownscher Trajektorien ein Spektrum für dieses System für 300 K berechnet (Abb. 4.13).

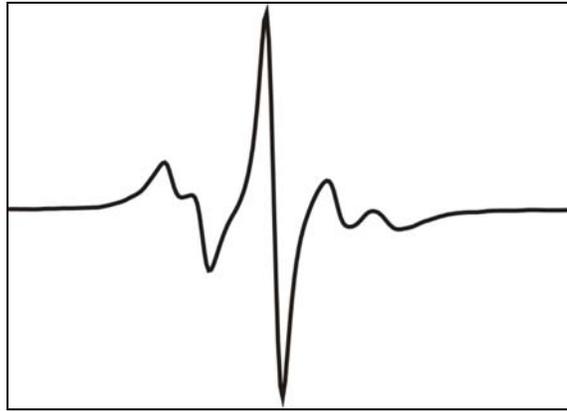


Abbildung 4.13. ESR-Spektrum für die fixierte S-S Bindung bei 300 K.

Auch hier ist die eingeschränkte Amplitude der Bewegung deutlich zu erkennen, da sie zu einer Aufspaltung der x/y- und z-Komponenten der Hyperfeinlinien führt. Im Vergleich zu dem Spektrum bei 270 K nimmt aufgrund der höheren Mobilität der Spinsonde die spektrale Breite deutlich ab.