

Kapitel 5

Einbettung in die molekulare Umgebung: Die Alanin-Helix

5.1 Die Simulation des molekularen Systems

Nachdem die Dynamik der Spinsonde charakterisiert wurde, soll die Spinsonde nun in die molekulare Umgebung eingebettet werden. Dazu soll zunächst die Wechselwirkung der Spinsonde mit benachbarten Aminosäuren minimiert werden, um ihren Einfluß vom dem der Wechselwirkung mit der Helix auf die Dynamik der Spinsonde separieren zu können. Zu diesem Zweck wird zu Beginn eine Alanin-Helix verwendet, da bei Alanin nur geringe sterische und keine elektrostatischen Wechselwirkungen mit der Spinsonde auftreten. Hierfür werden alle Aminosäuren der Helix zu Alanin mutiert. Um die Mobilität der Helix auf einen realistischen Wert zu beschränken, wird ein restriktives Potential auf die C_α -Atome der Helix gelegt, welches eine partielle Entfaltung der Helix sowie eine Rotationsdiffusion des gesamten Systems verhindert. Der Bewegungsradius der C_α -Atome entspricht dann einem bestimmten B-Faktor. Die Eigenschaften des auf diese Weise entstehenden Modellsystems sollen nun auf die gleiche Art charakterisiert werden wie zuvor für die Spinsonde im Lösungsmittel.

Zunächst soll hierzu anhand der Dynamik der Spinsonde ein Vergleich von dem aus MD-Trajektorien berechneten Spektrum und einem mit Hilfe der Brownschen Dynamik berechneten ESR-Spektrum vorgenommen werden, um die Qualität beider Methoden zu vergleichen. Dazu werden Simulationen der molekularen Dynamik bei 600 K durchgeführt, anhand derer die Winkelverteilungen der Diederwinkel, die Ausrichtung der Spinsonde relativ zur Helix und die Potentialfläche berechnet werden können. Anschließend werden MD-Trajektorien bei einer Temperatur von 300 K berechnet, bis die Konvergenz der Trajektorien eingetreten ist. Die Konvergenz wird durch den Vergleich der Winkelverteilungen mit der Erwartung aufgrund der 600 K Rechnungen festgestellt.

Neben der Charakterisierung des Systems ist die Untersuchung der Dynamik der Disulfid-Isomere der Spinsonde von besonderem Interesse. Die Alanin-Helix bietet ein Modellsystem,

mit dessen Hilfe die Dynamik der beiden Isomere in der molekularen Umgebung untersucht werden kann. Insbesondere die Wechselwirkung des Disulfids mit den Atomen des Helixrückgrats und ihr Einfluß auf die Dynamik der Spinsonde ist dabei von Interesse.

Des weiteren kann anhand dieses einfachen Modells die Abhängigkeit der Dynamik der Spinsonde von der Dynamik des Rückgrats der Helix untersucht werden, die sich einfach durch die Wahl der B-Faktoren variieren lässt.

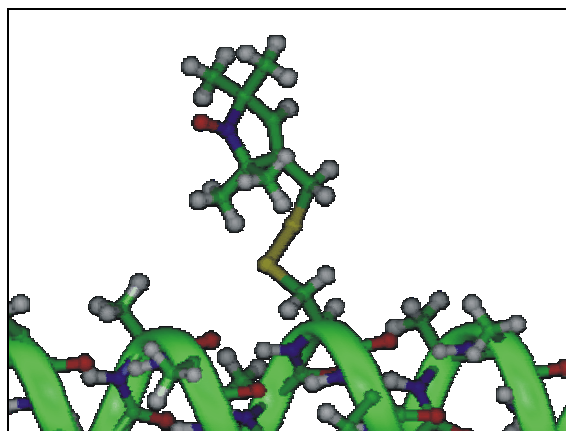


Abbildung 5.1. Die Spinsonde in der molekularen Umgebung der Alanin-Helix.

Dazu werden Rechnungen mit verschiedenen B-Faktoren bei 300 K durchgeführt.

Zur Charakterisierung der Dynamik werden die Diffusionskonstanten der Spinsonde für die verschiedenen B-Faktoren berechnet und verglichen. Anschließend werden MD-Simulationen zur Berechnung der Diffusionskonstanten bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt, um den Temperaturverlauf der mit Brownscher Dynamik berechneten ESR-Spektren zu untersuchen und mit der Entwicklung der Spektren der Spinsonde vergleichen zu können.

5.2 Die Charakterisierung der Dynamik

Für die Darstellung der Ausrichtung der Spinsonde relativ zur Helix-Achse im Verlauf der Simulation wird ein Richtungsvektor eingeführt, welcher vom C_{α} -Atom der Spinsonde zum Stickstoff-Atom des Ringes, an dem der Spin lokalisiert ist, reicht. Die Verteilung dieses Richtungsvektors wird aus den 600 K Trajektorien extrahiert und als Kugeloberflächengraphik dargestellt (Abbildung 5.1). Die Verteilung zeigt zwei relativ breite, mit einander verbundene Maxima, von denen eines in Richtung der Helix-Achse verläuft (5.1 a). Das andere Maximum liegt seitlich zur Helix mit einem Winkel von ca. 45 Grad zur Helix-Achse. Da die sterische Wechselwirkung der Spinsonde mit den Alanin-Aminosäuren relativ klein ist, ist die Position direkt über der Helix für die Spinsonde gut zugänglich, die Intensität des Maximums in dieser Richtung ist vergleichbar mit dem seitlich zur Helix positionierten

Maximum. Ein Maximum mit geringer Wahrscheinlichkeit findet sich entlang der entgegengesetzten Richtung der Helix-Achse (5.1 b). Relativ zur Helix-Achse zeigt die Spinsonde ein sehr asymmetrisches Verhalten, was darauf hindeutet, dass durch die Wechselwirkung mit dem Rückgrat die Konformationen der Spinsonde entlang der einen Seite der Helix-Achse deutlich günstiger sind als entlang der anderen.

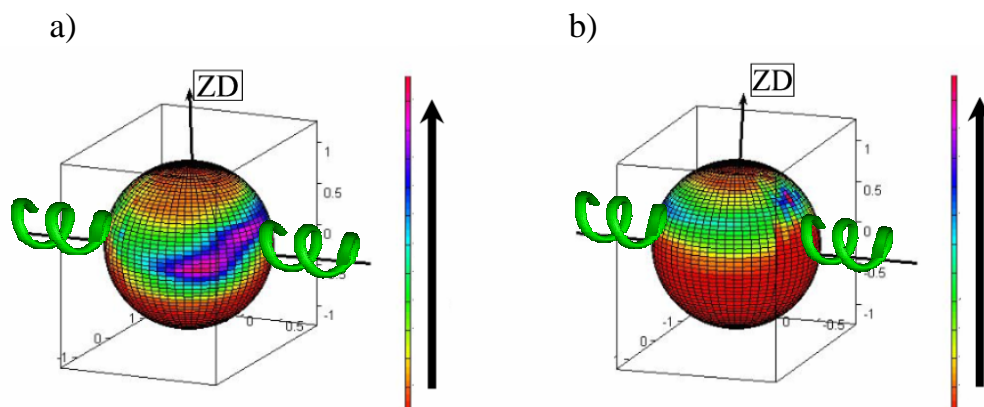


Abbildung 5.1. Wahrscheinlichkeitsverteilung des $N-C_{\alpha}$ Vektors der Spinsonde in der molekularen Umgebung der Alanin-Helix im Proteinkoordinatensystem. Die Intensität steigt entlang der indizierten Richtung. Die Kugel wird von beiden Seiten dargestellt. Die Orientierung des Direktors ZD wird durch einen Pfeil dargestellt.

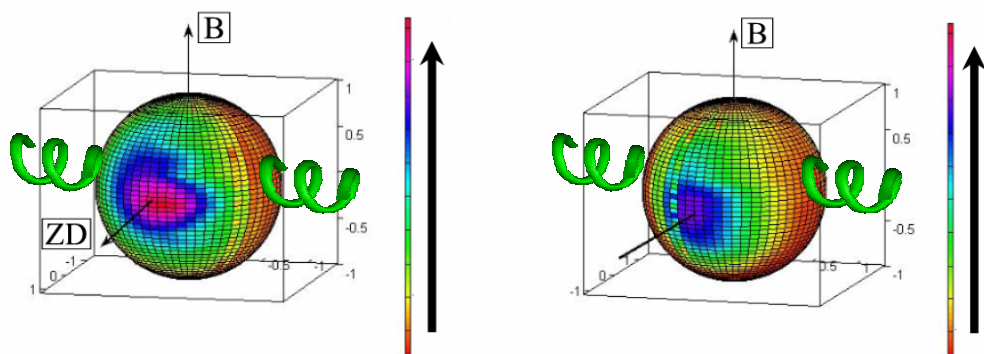


Abbildung 5.2. Orientierungsverteilung der molekularen z-Achse im Laborkoordinatensystem. Die Intensität steigt entlang der indizierten Richtung. Die Kugel wird von beiden Seiten dargestellt. Die Orientierung des Direktors ZD wird durch einen Pfeil dargestellt. Das Magnetfeld liegt in diesem Fall entlang der z-Achse, wird jedoch für die Berechnung des ESR-Spektrums über alle Orientierungen gemittelt.

Abbildung 5.2 zeigt die Wahrscheinlichkeitsverteilung der molekularen z-Achse der Spinsonde im Laborkoordinatensystem als Kugeloberflächengraphik. Die Verteilung zeigt zwei Maxima, deren Lage durch eine Rotation um die Helix-Achse um nahezu 180° in einander übergeht. Die Intensität des einen Maximums ist dabei deutlich höher als die des anderen. Obwohl die Verteilung der $N-C_{\alpha}$ Achse sehr asymmetrisch ist, zeigt die Verteilung der molekularen z-Achse ein fast axialsymmetrisches Verhalten. Da diese

Verteilung nicht isotrop ist, wird zur Durchführung von Simulationen der Brownschen Dynamik die Definition eines Direktors notwendig. Als Definition der Direktorachse wird hier die Richtung maximaler Intensität gewählt, da durch diese Achse beide Maxima gut beschrieben werden. Diese Definition der Direktororientierung hat die Wahl eines Winkel zwischen dem Molekülkoordinatensystem und dem Diffusionskoordinatensystem von $\beta_D = 0^\circ$ zur Folge. Daher kann in diesem Fall die Potentialfläche direkt aus der Verteilung der molekularen z-Achse berechnet werden, da hier das Molekülkoordinatensystem und das Diffusionskoordinatensystem identisch sind. Die Direktorachse ist sowohl in Abbildung 5.2 als auch in der $N - C_\alpha$ Verteilung eingezeichnet. Der Übergang zwischen den beiden Blickwinkeln auf die Verteilungen (Abb. 5.1 und 5.2) erfolgt durch eine Rotation von 90° um die Helix-Achse. Im Proteinkoordinatensystem, in dem die $N - C_\alpha$ Verteilung dargestellt ist, liegt die Richtung des Direktors sehr nahe zur z-Achse. Da zusätzlich die Maxima der Verteilung der molekularen z-Achse relativ schmal sind, bedeutet dies, dass sich die Ringebeine der Spinsonde stets sehr nahe zur x/y-Ebene befindet. Befindet sich die Spinsonde in dem Maximum direkt über der Helix-Achse, sind die sterischen Wechselwirkungen mit dem Rückgrat für diese Position der Ringebeine am geringsten, sie wird daher von der Spinsonde bevorzugt eingenommen, auch in Positionen, die nicht direkt über der Helix liegen, obwohl die sterischen Gründe hierfür nicht offensichtlich sind. Es findet also lediglich eine Verschiebung der Ringebeine zwischen den Maxima der $N - C_\alpha$ Verteilung statt. Übergänge zwischen den beiden Maxima in der Verteilung der molekularen z-Achse treten durch eine Rotation der Ringebeine um annähernd 180° auf, die in erster Linie durch eine Rotation des Diederwinkels $\chi_5 = CCCS$ erfolgt. Diese Übergänge treten während der Simulation relativ selten und nur dann auf, wenn sich die Spinsonde nicht in der Orientierung des $N - C_\alpha$ Vektors über der Helix befindet, da eine Rotation der Ringebeine in dieser Position energetisch sehr ungünstig wäre (siehe Diskussion der Diederwinkel in den nächsten Abschnitten). Es tritt jedoch keine Korrelation zwischen den Maxima der Verteilung der molekularen z-Achse und der $N - C_\alpha$ Verteilung auf, d.h. nach erfolgter Rotation der Ringebeine sind der Spinsonde wieder sämtliche auftretenden Orientierungen relativ zur Helix-Achse zugänglich. Aus der Wahrscheinlichkeitsverteilung der molekularen z-Achse kann nun die zugehörige Potentialfläche berechnet werden. Sie ist in Abbildung 5.3 dargestellt.

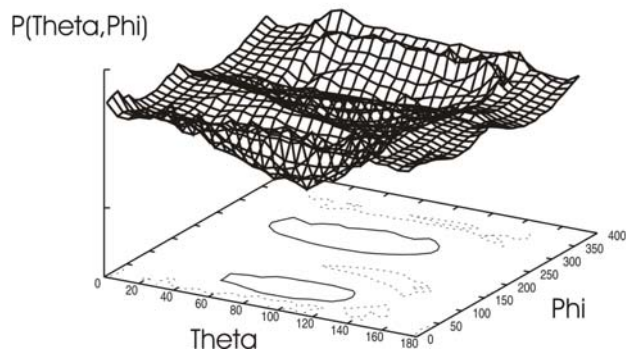


Abbildung 5.3. Potentialfläche der Polarwinkel der molekularen z-Achse im Laborkoordinatensystem.

5.3 Verteilungen der Diederwinkel

Zur Analyse der Diederwinkel-Verteilungen wird zunächst die Potentialfläche der Diederwinkel $\chi_5 = CCCS$ und $\chi_4 = CCSS$ berechnet, von denen angenommen wird, dass sie einen großen Anteil an der Dynamik der Spinsonde haben (Abbildung 5.4). Für Winkelkombinationen, die während der Simulation nicht auftreten, wird das Potential wie zuvor definiert abgeschnitten (siehe Kap. 4), da es bei einer Aufenthaltswahrscheinlichkeit von Null sonst unendlich werden würde. Für $\chi_4 = CCSS$ ist der komplette Winkelbereich während der Simulation bei 600 K zugänglich. Minima der Potentialfläche liegen bei 60° und 300° , die Barriere zwischen den Maxima liegt für eine Temperatur von 300 K bei $1.7 k_B T$. Dieser Diederwinkel trägt also tatsächlich in bedeutsamer Weise zur Dynamik der Spinsonde bei und zeigt eine ähnliche Dynamik wie bei der Simulation der Spinsonde ohne Alanin-Helix. Der Diederwinkel $\chi_5 = CCCS$ zeigt dagegen ein sehr unterschiedliches Verhalten.

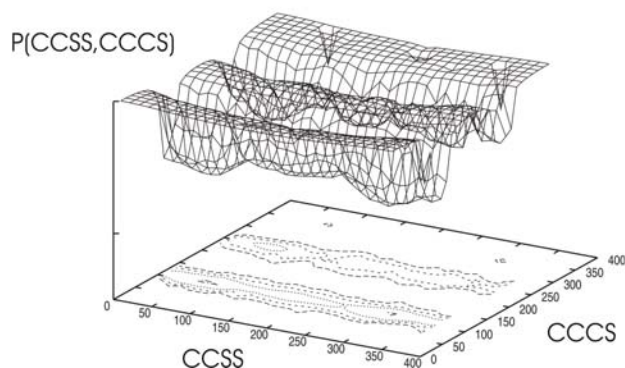


Abbildung 5.4. Potentialfläche der Diederwinkel $\chi_5 = CCCS$ und $\chi_4 = CCSS$.

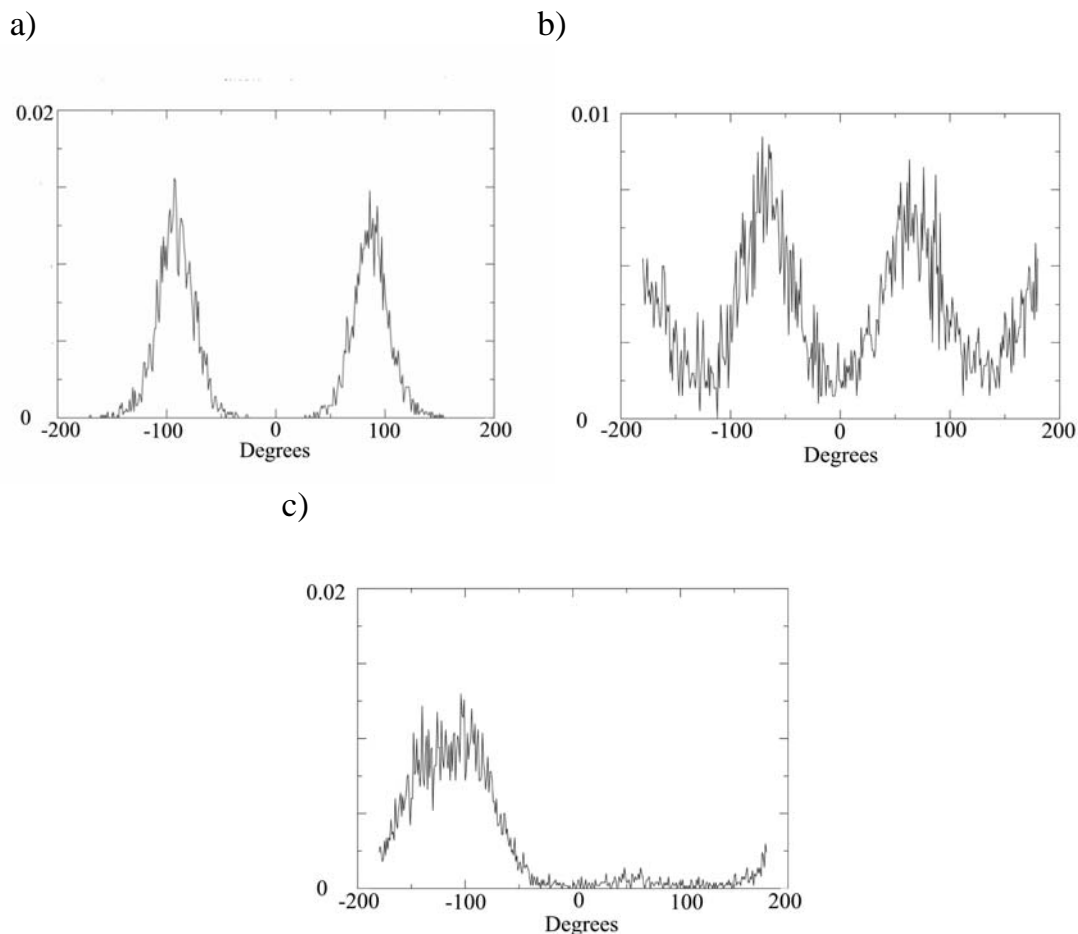


Abbildung 5.5. Wahrscheinlichkeitsverteilung des Diederwinkels a) χ_3 , b) χ_2 und c) χ_1 .

Sein Winkelbereich ist deutlich eingeschränkt. Für χ_5 treten nur zwei Konformationen um 100° und 250° auf, die den beiden Maxima in der Verteilung der molekularen z-Achse zugeordnet werden können. Die Wahrscheinlichkeit des Auftretens der 100° -Konformation ist dabei ungefähr viermal so hoch wie die der 250° -Konformation und entspricht dem Maximum der molekularen z-Achse mit höherer Intensität, während die 250° -Konformation dem Maximum mit niedrigerer Intensität entspricht. Da sich zwischen beiden Konformationen die höchste Energiebarriere befindet, stellt ihr Auftreten auch das Auftreten aller anderen für die Simulation der molekularen Dynamik relevanten Konformationen sicher. Winkel zwischen diesen Konformationen treten für die hier verwandten Zeitschritte für die Datenausgabe von 100 ps auch während der Hochtemperaturtrajektorien nicht auf, dieser Diederwinkel zeigt also ein sehr restriktives Verhalten mit seltenen Übergängen zwischen beiden Konformationen, die allerdings relativ schnell erfolgen. Dieses muss durch die Wechselwirkung mit der molekularen Umgebung zustande kommen, da für die Rechnung ohne die Alanin-Helix ein deutlich größerer Winkelbereich zugänglich war. Berücksichtigt man, dass die Rotation um

χ_5 die Ringebeine der Spinsonde relativ zur Helix-Achse verdreht, sind die hohen Energiebarrieren der Rotation leicht zu verstehen, da schon geringe Auslenkungen aus der x/y-Ebene in der Position der Spinsonde über der Helix zu einer deutlichen Erhöhung der sterischen Wechselwirkung führen. Daher können Übergänge zwischen beiden Konformationen nur dann auftreten, wenn sich die Spinsonde in der Position seitlich zur Helix-Achse befindet, und auch dann treten diese Übergänge relativ selten auf. Die starke sterische Wechselwirkung für diese Rotation tritt bei der Spinsonde im Lösungsmittel nicht auf, daher entfallen hier die hohen Potentialbarrieren für die Rotation um χ_5 .

Bei Hochtemperaturrechnungen treten beide Disulfid-Isomere der Spinsonde mit gleicher Wahrscheinlichkeit auf (Abbildung 5.5 a)). Bei dieser Temperatur finden zwischen den beiden Konformationen von χ_3 häufige Übergänge statt. Für eine Simulationstemperatur von 300 K ist ein Übergang zwischen den beiden Isomeren auf der Zeitskala der ESR-Spektroskopie äußerst unwahrscheinlich und ist auch in keiner der hier durchgeführten Simulationen aufgetreten.

Dies macht eine separate Untersuchung der Dynamik beider Isomere notwendig (siehe Abschnitt 5.4).

Die Wahrscheinlichkeitsverteilung des Diederwinkels χ_2 zeigt eine ähnlich breite Verteilung wie χ_4 . Obwohl drei ausgeprägte Maxima vorhanden sind, ist der gesamte Winkelbereich hier während einer Hochtemperatursimulation zugänglich. Die Rotationsgeschwindigkeit ist in diesen Fall jedoch nur halb so groß wie im Fall von χ_4 , so dass χ_2 trotz der relativ breiten Verteilung weniger als χ_4 zur Dynamik der Spinsonde beiträgt. χ_4 zeigt eine deutlich höhere Rotationsgeschwindigkeit als alle anderen Diederwinkel und ist damit für den größten Teil der Dynamik der Spinsonde verantwortlich.

Die Rotation um den ersten Diederwinkel der Spinsonde, χ_1 , ist auf einen Winkelbereich von ca. 50° beschränkt. Er kann also nur innerhalb dieses Bereiches zur Dynamik beitragen und weist zudem zusammen mit χ_2 die geringste Rotationsgeschwindigkeit auf.

Die obige Diskussion zeigt, dass die molekulare Rotationsdynamik der Spinsonde relativ kompliziert ist und die einzelnen Diederwinkel z.T. ausgeprägte Maxima in ihrer Verteilung aufweisen. Im Hinblick auf eine weitergehende Analyse dieser Verteilungen ist es hilfreich, nach den Korrelationen der verschiedenen Maxima der Wahrscheinlichkeitsverteilungen zu fragen. Es muss also der Frage nachgegangen werden, ob bestimmte Konformationen der Spinsonde bevorzugt auftreten. Diese Fragestellung wird in den nächsten Abschnitten diskutiert.

5.4 Die Dynamik der Disulfid-Isomere

Die Linienform mancher ESR-Spektren lässt darauf schließen, dass die Spinsonden zwei unterschiedliche dynamische Zustände innerhalb des Ensembles annehmen können. Daher liegt die Vermutung nahe, dass in diesen Fällen zwei Konformationen des Systems mit unterschiedlichen dynamischen Eigenschaften vorhanden sind. Diese unterschiedlichen Eigenschaften sollen als zwei Komponenten der Dynamik bezeichnet werden. Da aus experimentellen und theoretischen Untersuchungen das Vorliegen einer relativ großen Aktivierungsbarriere hervorgeht [77-79,65], können die verschiedenen Populationen nicht einfach durch eine Wechselwirkung zwischen Spinsonde und Protein entstehen. Es gibt zwei Vermutungen bezüglich der Existenz der zwei verschiedenen Spinpopulationen. Eine so hohe Energiebarriere kann entweder durch zwei verschiedene Konformationen des gesamten Proteins oder durch die Rotationsbarriere der beiden Disulfid-Isomere entstehen. Die Verantwortlichkeit der Disulfid-Isomere für die verschiedenen Spinpopulationen ist allerdings deutlich wahrscheinlicher, da das Auftreten der zwei Komponenten der Dynamik wesentlich von der Position der Spinsonde im Protein abhängt. Sollten zwei verschiedene Konformationen des gesamten Proteins die Ursache sein, wäre diese starke Abhängigkeit von der Position der Spinsonde unwahrscheinlich. Zudem passt die Höhe der Energiebarriere mit den Untersuchungen zur Rotationsbarriere des Disulfids [77-79] überein, und auch die zuvor gezeigten ab initio-Rechnungen unterstützen diese These. Ein erstes Anzeichen für das Vorhandensein von dynamischen Unterschieden der Disulfid-Isomere wurde von Murzyn et. al. [80] gefunden. Die Simulationen für beide Isomere wiesen allerdings hohe Unterschiede im B-Faktor des Proteins aus, welcher einen bedeutenden Einfluß auf die Dynamik der Spinsonde hat. Aufgrund der kurzen Simulationszeit (10 ns) ist unklar, ob die unterschiedlichen B-Faktoren statistischer Natur sind oder tatsächlich durch die unterschiedlichen Konformationen verursacht werden.

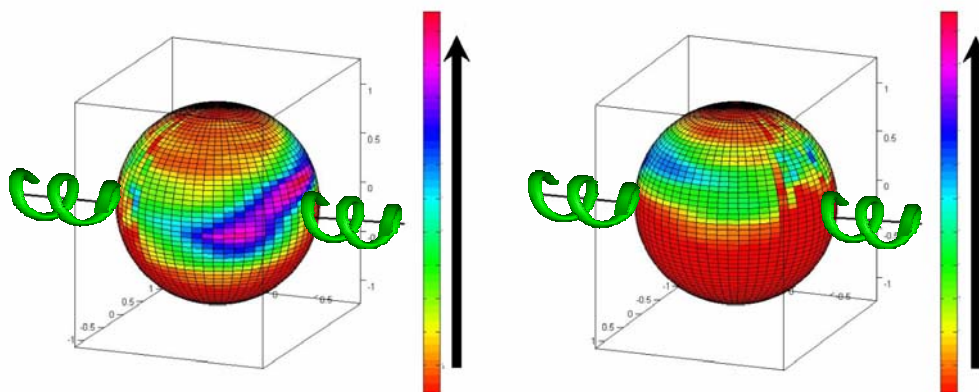


Abbildung 5.6. Wahrscheinlichkeitsverteilung des $N - C_{\alpha}$ Vektors für $\chi_3 = -90^{\circ}$. Die Intensität steigt in der angezeigten Richtung. Die Kugel wird von beiden Seiten dargestellt.

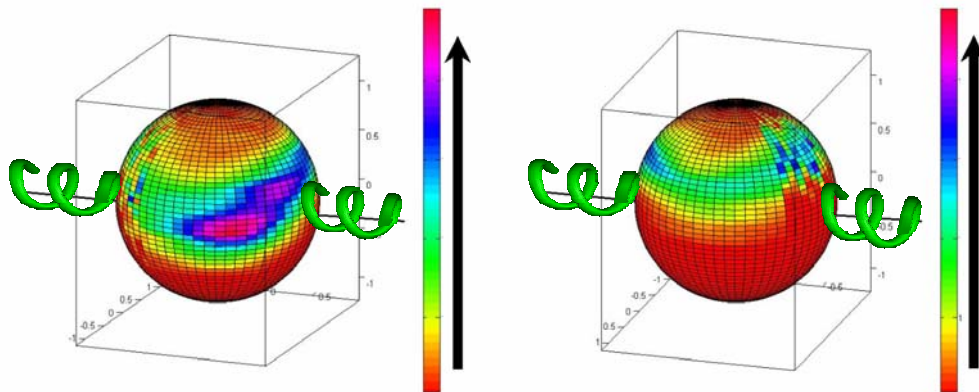


Abbildung 5.7. Wahrscheinlichkeitsverteilung des $N - C_{\alpha}$ Vektors für $\chi_3 = +90^{\circ}$. Die Intensität steigt in der angezeigten Richtung. Die Kugel wird von beiden Seiten dargestellt.

Der Grund, warum die zwei Komponenten der Dynamik nur für manche Positionen der Spinsonde im Protein auftreten, könnte in den unterschiedlichen Wechselwirkungen der Isomere der Spinsonde und besonders des Disulfids mit den Atomen des Proteinrückgrates bzw. den benachbarten Aminosäuren liegen.

Um diese Wechselwirkungen an verschiedenen Positionen des Proteins zu untersuchen, sind Simulationen der molekularen Dynamik hervorragend geeignet, da auf diese Weise die verschiedenen Beiträge zur Dynamik der Spinsonde einzeln betrachtet werden können. Zunächst sollen hier die Wechselwirkungen der Isomere der Spinsonde mit dem Proteinrückgrat anhand der Simulationen der Alanin-Helix untersucht werden.

Hierzu werden die verschiedenen Konformationen aus den Hochtemperaturtrajektorien nach ihrem Diederwinkel χ_3 sortiert und jeweils einem der Isomere zugeordnet.

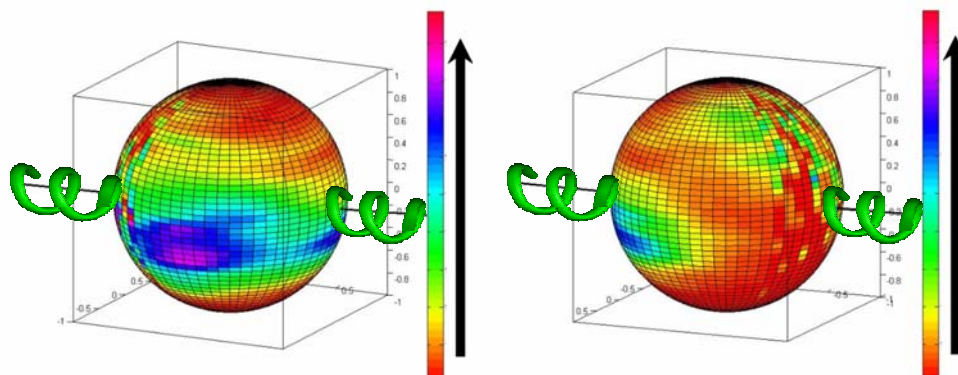


Abbildung 5.8. Wahrscheinlichkeitsverteilung des S-S Vektors für $\chi_3 = -90^{\circ}$ im Proteinkoordinatensystem. Die Intensität steigt in der angezeigten Richtung. Die Kugel wird von beiden Seiten dargestellt.

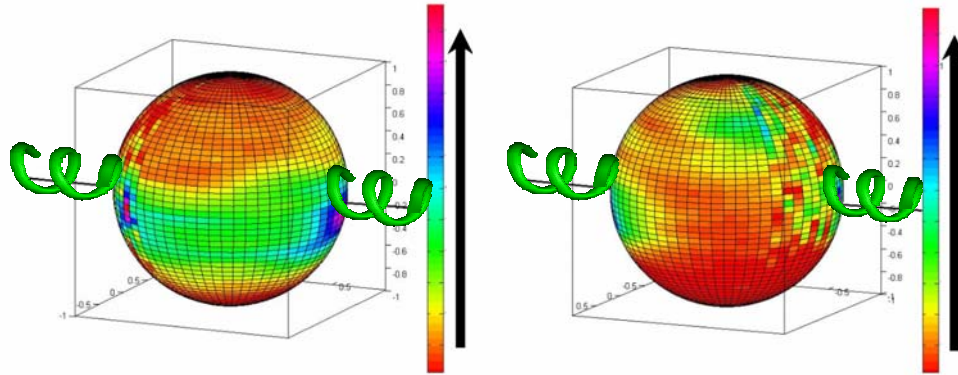


Abbildung 5.9. Wahrscheinlichkeitsverteilung des S-S Vektors für $\chi_3 = +90^\circ$ im Proteinkoordinatensystem. Die Intensität steigt in der angezeigten Richtung. Die Kugel wird von beiden Seiten dargestellt.

Die Verteilungen des $N - C_\alpha$ Vektors für beide Disulfid-Isomere sind in den Abbildungen 5.6 und 5.7 dargestellt. In den Verteilungen beider Isomere treten die schon in der Gesamtverteilung (Abbildung 5.1) beobachteten Maxima auf, das erste Maximum entlang der Achse der Alanin-Helix, das zweite Maximum seitlich zur Helix-Achse. Die Intensitätsverteilung weist allerdings deutliche Unterschiede auf.

Für das Isomer mit $\chi_3 = -90^\circ$ ist die Intensität des Maximums entlang der Helix deutlich höher ausgeprägt als die des anderen Maximums. Das Gegenteil ist für das Isomer mit $\chi_3 = +90^\circ$ der Fall. Hier ist die Intensität des seitlichen Maximums deutlich höher ausgeprägt als die des Maximums entlang der Achse der Alanin-Helix. Um die Wechselwirkungen des Disulfids mit dem Rückgrat der Helix für beide Isomere zu untersuchen, wird nun die Wahrscheinlichkeitsverteilung des Schwefel-Schwefel-Vektors in Relation zur Helix-Achse untersucht (Abbildungen 5.8 und 5.9). Schwefel-Atome weisen wegen ihrer hohen Polarisierbarkeit relativ starke van der Waals-Wechselwirkungen auf. Für das Isomer mit $\chi_3 = -90^\circ$ liegt die hauptsächliche Orientierung der Schwefel-Schwefel-Bindung senkrecht zur Helix-Achse, entlang des Verlaufs der Helix-Windung. Im Gegensatz hierzu liegt die hauptsächliche Orientierung der Schwefel-Schwefel-Bindung für das Isomer mit $\chi_3 = +90^\circ$ entlang der Helix-Achse, also senkrecht zur Helix-Windung.

Um die unterschiedlichen Orientierungen beider Isomere zu analysieren, werden in Abbildung 5.10 die beiden Geometrien der Isomere in der Position entlang der Alanin-Helix gezeigt, die während der Simulation mit der größten Wahrscheinlichkeit auftreten. Die einzelnen Anteile der Energie der Spinsonde lassen sich mit Hilfe der Simulationen der molekularen Dynamik untersuchen.

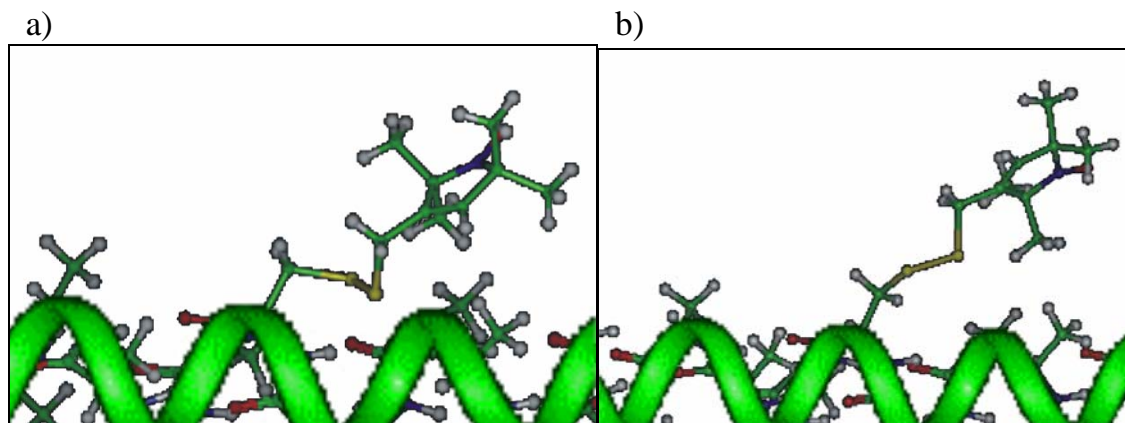


Abbildung 5.10. Wahrscheinlichste Konformationen der Isomere mit a) $\chi_3 = -90^\circ$ und b) $\chi_3 = +90^\circ$ in der Position entlang der Alanin-Helix.

Vergleicht man die beiden wahrscheinlichsten Konformationen, so führen die unterschiedlichen Wechselwirkungen mit den Atomen des Rückgrats der Helix zu verschiedenen Energien der Spinsonde in der Position entlang der Helix. Das Isomer mit $\chi_3 = -90^\circ$ weist einen geringen Abstand zwischen dem Disulfid und den Atomen des Rückgrats auf. Wegen der attraktiven van der Waals-Wechselwirkung mit diesen Atomen ist die Energie dieses Isomers in der Position über der Helix niedriger als für das Isomer mit $\chi_3 = +90^\circ$, bei dem der Abstand zwischen Disulfid und Rückgrat deutlich höher ist. Dieses Resultat wird auch von Rechnungen mit dem CVFF-Kraftfeld [90] bestätigt, bei denen der van der Waals Kontakt des Isomers mit $\chi_3 = -90^\circ$ nach einer Optimierung der Geometrie deutlich höher war [65], was zu einer geringeren Gesamtenergie führte. Dies führt zu einer höheren Aufenthaltswahrscheinlichkeit des Isomers mit $\chi_3 = -90^\circ$ in der Position des $N-C_\alpha$ Maximums entlang der Helix, während diese Position durch das andere Isomer deutlich seltener besetzt wird. Da die energetische Barriere für die Position der Spinsonde über der Helix jedoch für beide Disulfid-Isomere wegen der relativ geringen sterischen Wechselwirkung mit den Alanin-Aminosäuren klein ist, ist es für beide Isomere möglich, die Position entlang der Helix einzunehmen. Die Unterschiede in der Wahrscheinlichkeitsverteilung des $N-C_\alpha$ Vektors sind daher relativ gering und führen nicht zu Unterschieden in der Wahrscheinlichkeitsverteilung der molekularen z-Achse, da beide Maxima der molekularen z-Achse auch in beiden Maxima der $N-C_\alpha$ Verteilung auftreten. Die Potentialflächen beider Isomere sind also identisch. Obwohl dies hier keine Auswirkung hat, soll zusätzlich erwähnt werden, dass es durchaus möglich ist, unterschiedliche Orientierungen der molekularen z-Achse für die gleiche Ausrichtung des $N-C_\alpha$ Vektors vorzufinden, da beide Vektoren keine direkte Korrelation aufweisen.

Die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen, die in einigen experimentellen Untersuchungen für andere Aminosäuren beobachtet wurde [85,86], trat in den hier durchgeführten Simulationen nicht auf. Dabei muß berücksichtigt werden, dass aufgrund der Fixierung der Wasserstoff-Bindungen die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen nicht richtig beschrieben werden kann.

Trotz dieser geringen Unterschiede in der $N-C_\alpha$ Verteilung variieren die Diederwinkel beider Isomere erheblich. Das Isomer mit $\chi_3 = -90^\circ$ zeigt eine Konformation von $\chi_2 = -90^\circ$ und $\chi_1 \approx -90^\circ$. Um in die Geometrie des anderen Isomers mit $\chi_3 = +90^\circ$ zu wechseln, ist eine Änderung der Diederwinkel zu $\chi_2 = +90^\circ$ und $\chi_1 \approx -145^\circ$ notwendig. Durch diese Übergänge wird die $C_\beta-S-S$ Ebene der Spinsonde um annähernd 180° gedreht. Zusammen mit der Änderung in χ_3 führt dies zu einer relativ stabilen Position der χ_4 -Bindung, wodurch die geringen Unterschiede in der $N-C_\alpha$ Verteilung beider Isomere erklärt werden. Die Konformationen der beiden Isomere verknüpfen also die Wahrscheinlichkeitsverteilungen der einzelnen Diederwinkel der Spinsonde. Aus der Kristallstrukturanalyse sind verschiedene Konformationen der Spinsonde für (χ_1, χ_2) bekannt: (g^+, g^+) , (t, g^-) [8], $(g^-, g^-) \approx (300^\circ, 300^\circ)$ [97], und $(t, g^+) \approx (180^\circ, 90^\circ)$ [95]. Die letzten beiden Konformationen passen relativ gut zu den aus der Analyse der Diederwinkel entstandenen Orientierungen der Spinsonde, die den Zuständen $(\chi_1, \chi_2, \chi_3) = (g^-, g^-, g^-)$ und (t, g^+, g^+) entsprechen.

5.5 Korrelationen der Diederwinkel

Wie im vorigen Abschnitt beschrieben, existieren verschiedene Konformationen der Diederwinkel (χ_3, χ_2, χ_1) für die beiden Disulfid-Isomere. Nun sollen die Korrelationen zwischen dem Diederwinkel χ_5 , dessen zwei Konformationen für die beiden Maxima in der Verteilung der molekularen z-Achse verantwortlich sind, und den übrigen Diederwinkeln untersucht werden.

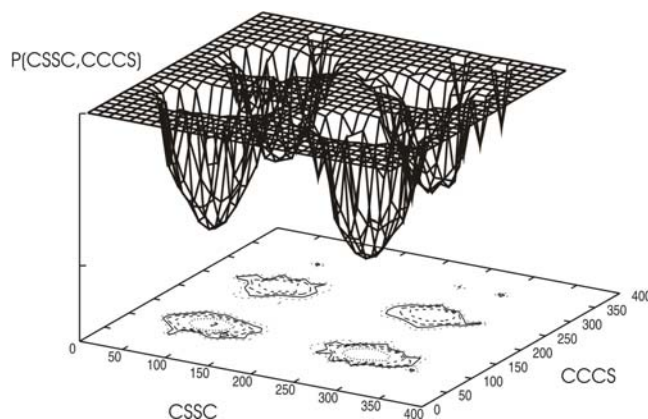


Abbildung 5.11. Potentialfläche der Diederwinkel χ_5 und χ_3 .

Dazu muss zunächst geklärt werden, ob ein Zusammenhang zwischen den Konformationen von χ_5 und den beiden Disulfid-Isomeren besteht. Zu diesem Zweck wird die Potentialfläche der Diederwinkel χ_5 und χ_3 berechnet und in Abbildung 5.11 dargestellt.

Beide Disulfid-Isomere treten dabei in beiden Konformationen von $\chi_5 = CCCS$ mit gleicher Wahrscheinlichkeit auf, wie es auch in der Gesamtverteilung von $\chi_3 = CSSC$ der Fall ist. Auch die anderen Diederwinkel weisen in beiden Konformationen von χ_5 die gleiche Verteilung auf. Es liegt daher keine Korrelation zwischen χ_5 bzw. den Maxima in der Wahrscheinlichkeitsverteilung der molekularen z-Achse und den Diederwinkelkombinationen der Disulfid-Isomere vor. Daraus resultierend ergibt sich für die beiden Konformationen von χ_5 auch keine unterschiedliche Verteilung des $N - C_\alpha$ Vektors, da für beide Konformationen die $N - C_\alpha$ Verteilung mit der Gesamtverteilung der Trajektorie identisch ist.

5.6 Vergleich der ESR-Spektren der Alanin-Helix

Für das System der Alanin-Helix wurden ebenso wie für die Spinsonde Trajektorien der molekularen Dynamik in ausreichender Anzahl für die Berechnung eines ESR-Spektrums simuliert. Um die Konvergenz der Winkelverteilung zu erreichen, waren 70 Trajektorien bei einer Temperatur von 300 K notwendig. Für einen Vergleich des aus MD-Trajektorien berechneten ESR-Spektrums mit einem Spektrum der Brownschen Dynamik wurden unter Verwendung der Potentialfläche der molekularen z-Achse der Spinsonde für die Alanin-Helix (Abbildung 5.3) 200 Trajektorien der Brownschen Dynamik berechnet. Die dazu notwendige Diffusionskonstante wurde aus einem exponentiellen Fit an die gemittelten Autokorrelationsfunktionen aus den MD-Trajektorien zu einem isotropen Wert von

$$D = (1.63 \pm 0.05) 10^8 \text{ s}^{-1}$$

bestimmt. Dabei treten für die beiden Disulfid-Isomere keine Unterschiede in der Diffusionskonstante auf, in Bezug auf die Dynamik der molekularen z-Achse sind sie also identisch. Die Trajektorien zur Berechnung der Potentialfläche der molekularen z-Achse sowie der Diffusionskonstanten wurden bei einem B-Faktor der C_α -Atome der Alanin-Helix von

$$B = 3.2 \text{ \AA}^2$$

simuliert. Ein Vergleich der aus beiden Methoden berechneten ESR-Spektren ist in Abbildung 5.12 zu sehen.

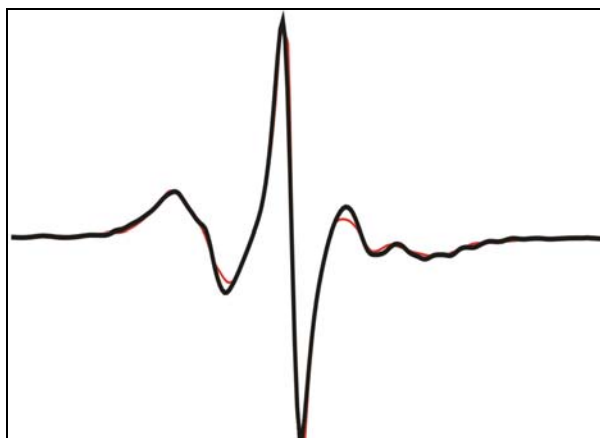


Abbildung 5.12. Vergleich der ESR-Spektren der Spinsonde an der Alanin-Helix aus MD-Trajektorien (schwarze Linie) und Brownschen Trajektorien (rote Linie).

Die ESR-Spektren zeigen die Linienform einer relativ anisotropen Verteilung der molekularen z-Achse. Vergleicht man die Spektren mit dem Spektrum der Spinsonde ohne Alanin-Helix mit der fixierten C-S Bindung für die gleiche Temperatur (Abb. 4.10 B)), so ist das Spektrum des Systems mit Alanin-Helix deutlich immobilierter. Dies wird dadurch erklärt, dass durch die Berücksichtigung der molekularen Umgebung der Spinsonde sowohl der Bewegungsradius als auch die Rotationsgeschwindigkeit der molekularen z-Achse eingeschränkt wird, die zuvor isotrope Bewegung ist nun durch zwei Minima in der Potentialfläche charakterisiert, da molekular durch die Wechselwirkung der Spinsonde mit der Umgebung sowohl die Rotation um χ_5 als auch die Ausrichtung der S-S Bindung stark eingeschränkt sind. Betrachtet man allerdings die Bewegung der Spinsonde im Lösungsmittel mit fixierter S-S Bindung, so ist die Mobilität noch einmal geringer (Abb. 4.13), was darauf hindeutet, dass die noch mögliche Reorientierung der S-S Bindung im Raum einen nicht unwesentlichen Anteil an der Dynamik der Spinsonde in der molekularen Umgebung der Alanin-Helix hat. Für die Spinsonde im Lösungsmittel wird die Fixierung der S-S Bindung durch die freiere Rotation um den Diederwinkel $\chi_5 = CCCS$ nur teilweise kompensiert.

Die Spektren aus den MD-Trajektorien und den Brownschen Trajektorien stimmen gut überein, es ist also auch für ein komplexeres System unter Einbeziehung der molekularen Umgebung der Spinsonde prinzipiell möglich, mit den beiden hier verwandten Methoden ein qualitativ gleichwertiges ESR-Spektrum zu simulieren. Für das System der Alanin-Helix war allerdings eine einfache Definition der Direktororientierung anwendbar, die eine Berechnung der Potentialfläche direkt aus den molekulardynamischen Daten ermöglichte. Im folgenden wird die Methodik der Brownschen Trajektorien für die Berechnung der ESR-Spektren aller Systeme verwendet, da die Erzeugung einer ausreichenden Anzahl von MD-Trajektorien für verschiedene Systeme rechentechnisch zu zeitaufwändig ist.

5.7 Die Abhängigkeit der Dynamik der Spinsonde vom B-Faktor der Alanin-Helix

In den letzten Jahren wurde die Dynamik des Proteinrückgrats mit Hilfe von NMR-Techniken bereits umfassend untersucht [92-94]. Auch ESR-spektroskopische Untersuchungen belegen, dass die Dynamik des Rückgrats einen erheblichen Einfluß auf die Mobilität der Spinsonde besitzt [66,69] und damit auch die Form des ESR-Spektrums entscheidend beeinflusst. Diese Abhängigkeit soll nun anhand des Modellsystems der Alanin-Helix untersucht werden. Auch für diesen Zweck sind Simulationen der molekularen Dynamik optimal geeignet, da die Mobilität des Rückgrats hier beliebig gesteuert werden kann. Dazu wurden die Kraftkonstanten des restriktiven Potentials auf den C_α -Atomen der Alanin-Helix fortlaufend so geändert, dass sich während der Simulation die gewünschten B-Faktoren ergeben. Zur Charakterisierung der Dynamik der Spinsonde wurde anschließend die für das ESR-Spektrum relevante Diffusionskonstante D_g bestimmt. Dazu wurden für jeden der verschiedenen B-Faktoren zwei Trajektorien der molekularen Dynamik mit einer Länge von jeweils 500 ns berechnet. Die Abhängigkeit der Diffusionskonstanten von den B-Faktoren ist in Abbildung 5.13 dargestellt. Zwischen D_g und D_ϕ treten dabei leichte Abweichungen auf.

Dabei zeigt sich eine annähernd lineare Abhängigkeit zwischen der Dynamik der Spinsonde und der Dynamik des Rückgrats der Alanin-Helix. Die Vermutung, dass die Dynamik des Rückgrats einen erheblichen Einfluss auf das ESR-Spektrum ausübt, bestätigt sich also anhand dieser Ergebnisse. In Abbildung 5.14 wird der Bewegungsradius der C_α -Atome der Alanin-Helix zur besseren Veranschaulichung für B-Faktoren von $B = 3.2 \text{ \AA}^2$ und 12.9 \AA^2 dargestellt, bei denen das immobilste bzw. mobilste ESR-Spektrum berechnet wurde.

Die zu den einzelnen B-Faktoren gehörenden Spektren werden mit Hilfe der Simulation von jeweils 200 Trajektorien der Brownschen Dynamik berechnet. Die Abhängigkeit der ESR-Spektren der Spinsonde an der Alanin-Helix von zunehmenden B-Faktoren ist in Abbildung 5.15 gezeigt. Die zuvor berechnete Potentialfläche wurde für die Berechnung aller ESR-Spektren verwendet, es wird hier also nur die Änderung der Diffusionskonstante betrachtet. Der Fehler der Diffusionskonstanten wurde hier aus der Abweichung der Diffusionskonstanten vom ihrem Mittelwert für die Trajektorien bei 300 K und einem B-Faktor von $B = 3.2 \text{ \AA}^2$ berechnet, für welche Bedingungen genug Trajektorien für die Konvergenz vorliegen.

Die starke Abhängigkeit der Mobilität der Spinsonde von der Dynamik des Rückgrats ist deutlich zu erkennen. Während das Spektrum in 5.15 a) eine relativ hohe Mobilität und nur eine leichte Anisotropie aufweist, nimmt die spektrale Breite mit abnehmendem B-Faktor deutlich zu, weil sich die Mobilität der Spinsonde beträchtlich verringert. Der Zusammenhang

zwischen der Mobilität der Helix und der Dynamik der Spinsonde liegt in der relativ starren Anbindung der Schwefel-Atome an das Rückgrat begründet. Durch einen größeren Bewegungsradius des C_α -Atoms wird daher auch die Rotationsdynamik der Spinsonde verstärkt.

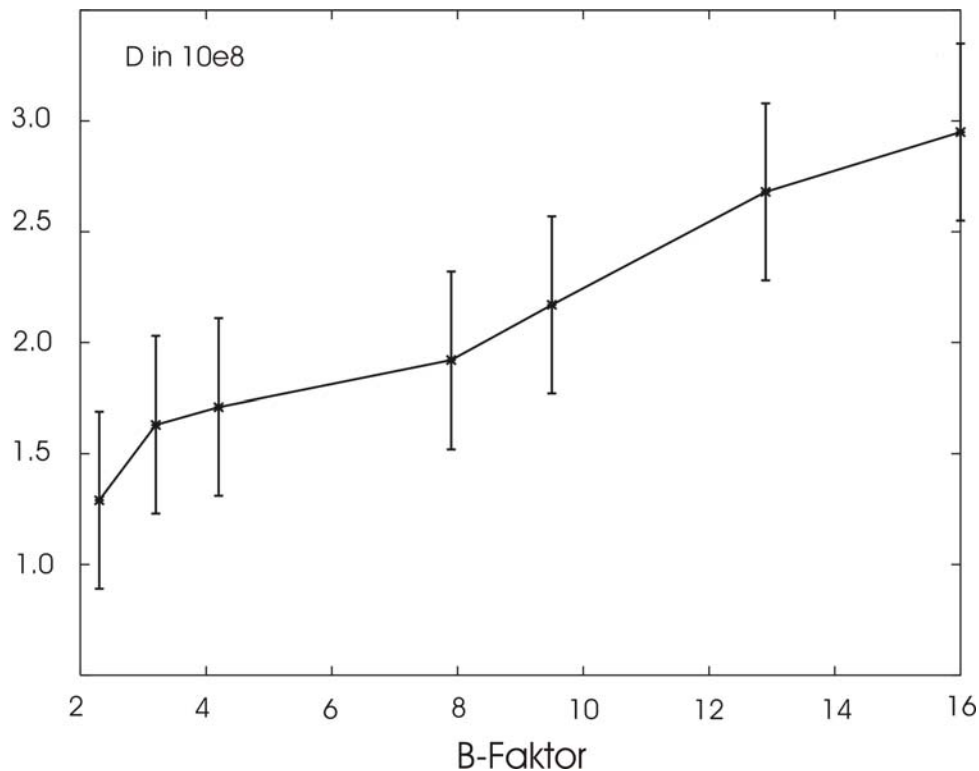


Abbildung 5.13. Abhängigkeit der Diffusionskonstante der Spinsonde vom B-Faktor der Alanin-Helix.

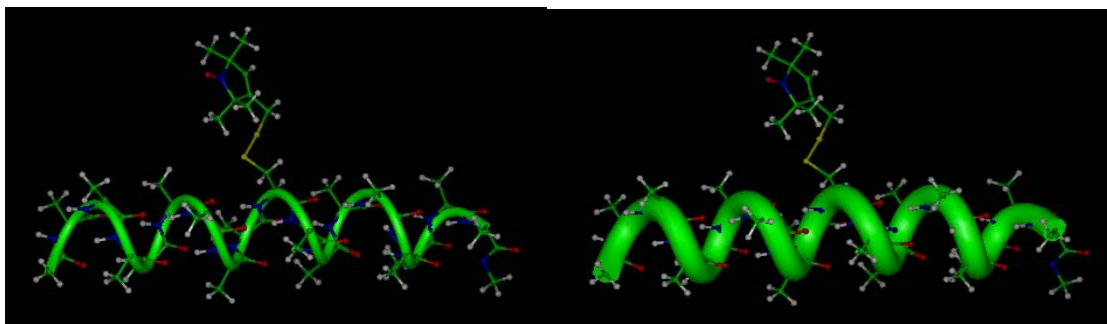


Abbildung 5.14. Bewegungsradius der C_α -Atome der Alanin-Helix für $B=3.2 \text{ \AA}^2$ (links) und $B=12.9 \text{ \AA}^2$ (rechts).

Die ESR-Spektroskopie weist allerdings für die verschiedenen Bereiche der Dynamik eine unterschiedliche Sensitivität bezüglich der Diffusionskonstante auf. Da im Falle der Spinsonde an der Alanin-Helix eine im Vergleich zu anderen Systemen (vergl. Kapitel 6) leichte Anisotropie des Bewegungsradius der molekularen z-Achse vorliegt, sind die Auswirkungen einer Veränderung des B-Faktors in diesem Fall sehr deutlich, da das ESR-

Spektrum aufgrund der breiten Winkelverteilung auf eine Änderung der Diffusionskonstante sehr sensitiv reagiert. Für restriktivere Systeme nimmt der Einfluß des B-Faktors auf das ESR-Spektrum ab, da eine Erhöhung der Dynamik der Spinsonde in diesem Fall wegen der restriktiven Wechselwirkungen mit der Umgebung und der aufgrund der schmalen Winkelverteilung in diesem Bereich kleineren Sensitivität geringer ausfällt (vergl. Kapitel 6). So ergibt sich für die Spinsonde an Position 72 nur eine geringe Änderung in der sehr restriktiven Potentialfläche für eine Erhöhung des B-Faktors von 10 \AA^2 auf 15 \AA^2 , und auch eine Erhöhung der Diffusionskonstante hat in diesem restriktiven System geringere Auswirkungen auf das ESR-Spektrum.

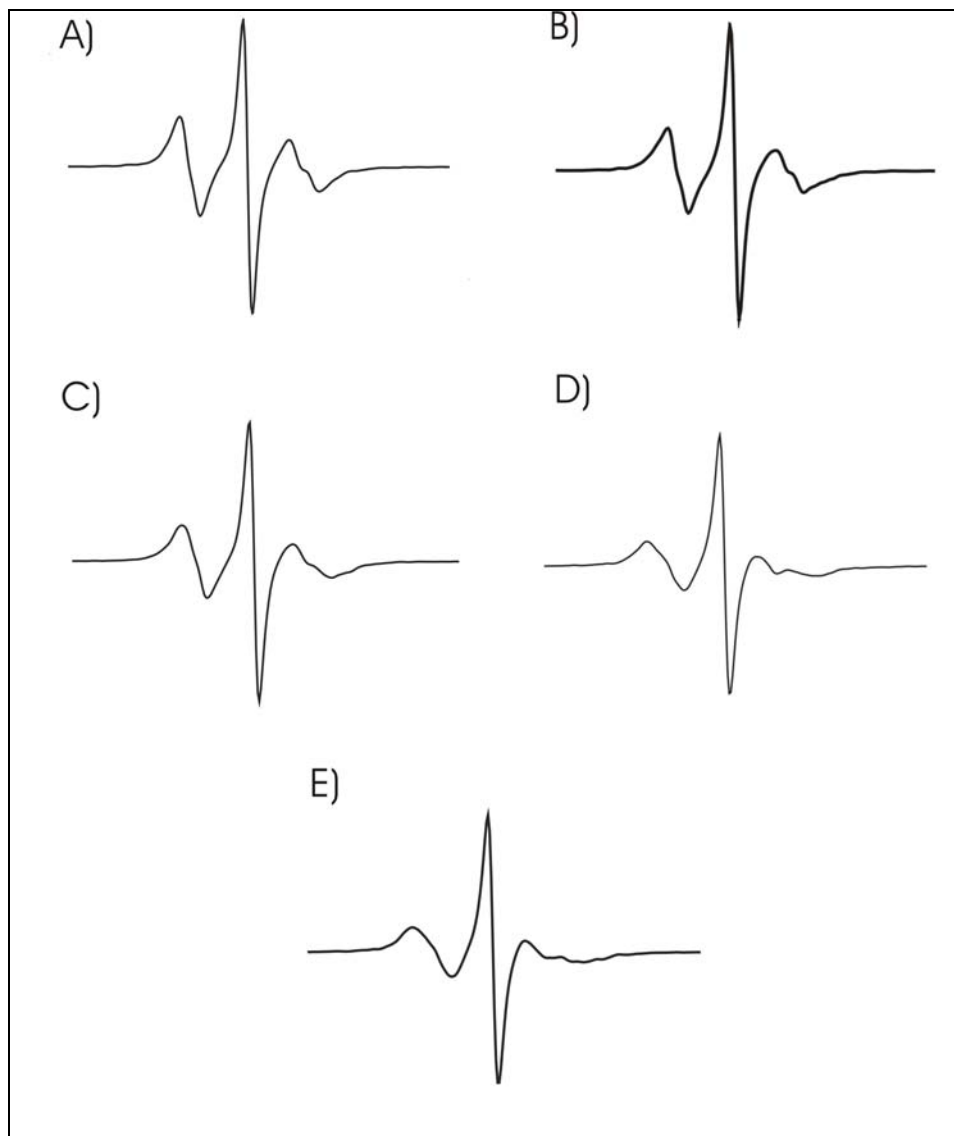


Abbildung 5.15. Verlauf der ESR-Spektren der Spinsonde an der Alanin-Helix mit den verschiedenen B-Faktoren a) $B=12.9 \text{ \AA}^2$; b) $B=9.5 \text{ \AA}^2$; c) $B=7.9 \text{ \AA}^2$; d) $B=3.2 \text{ \AA}^2$, e) $B=2.3 \text{ \AA}^2$.

5.8 Temperaturverlauf der ESR-Spektren

Auch für die Spinsonde in der molekularen Umgebung der Alanin-Helix soll die Veränderung der ESR-Spektren mit der Temperatur des Systems untersucht werden. Dazu werden Simulationen mit einem konstantem B-Faktor von $B=3.2 \text{ \AA}^2$ bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt. Die für die einzelnen Temperaturen berechneten Diffusionskonstanten sind in Tabelle 5.1 gegeben. Mit steigender Temperatur ist auch ein deutlicher Anstieg der Diffusionskonstanten zu verzeichnen. Diese ändern sich im Verlauf von 40°C um eine Größenordnung

Temperatur [K]	Diffusionskonstante
320	$D_g = 5.5 * 10^8 \text{ s}^{-1}$
310	$D_g = 2.0 * 10^8 \text{ s}^{-1}$
300	$D_g = 1.6 * 10^8 \text{ s}^{-1}$
290	$D_g = 1.2 * 10^8 \text{ s}^{-1}$
280	$D_g = 6.4 * 10^7 \text{ s}^{-1}$

Tabelle 5.1. Verlauf der Diffusionskonstanten der Spinsonde in der molekularen Umgebung der Alanin-Helix mit der Temperatur.

Auch hier werden die zugehörigen ESR-Spektren mit Hilfe von jeweils 200 Trajektorien der Brownschen Dynamik berechnet. Das Ergebnis ist in Abbildung 5.16 dargestellt.

Die Spektren variieren dabei erheblich. Während man für 320 K bereits ein Spektrum mit nahezu isotropen Linienpositionen erhält, steigt die Anisotropie bzw. die spektrale Breite mit sinkender Temperatur deutlich an. Bei einer Temperatur von 280 K ist das ESR-Spektrum der Spinsonde bereits sehr immobil. Vergleicht man den Temperaturverlauf der Spektren mit denen der Spinsonde ohne die molekulare Umgebung der Alanin-Helix, so fällt die Änderung der Spektren im Falle der Alanin-Helix wegen der Restriktionen der Mobilität der Spinsonde durch die Helix geringer aus. Ein Vergleich mit experimentellen Daten der Änderung von ESR-Spektren der Spinsonde an Position 72R1 im T4 Lysozym im einem Temperaturbereich von 36°C [66] ergibt eine ähnliche spektrale Veränderung. Auch die Größenordnung der Änderung der Diffusionskonstanten, die für einen Fit an die experimentellen Daten mit Hilfe des Freedschen Programms ermittelt wurden, stimmt mit den hier gezeigten Daten überein.

Daraus lässt sich schließen, dass das hier verwandte Modellsystem eine realistische Darstellung der Temperaturabhängigkeit der ESR-Spektren ermöglicht.

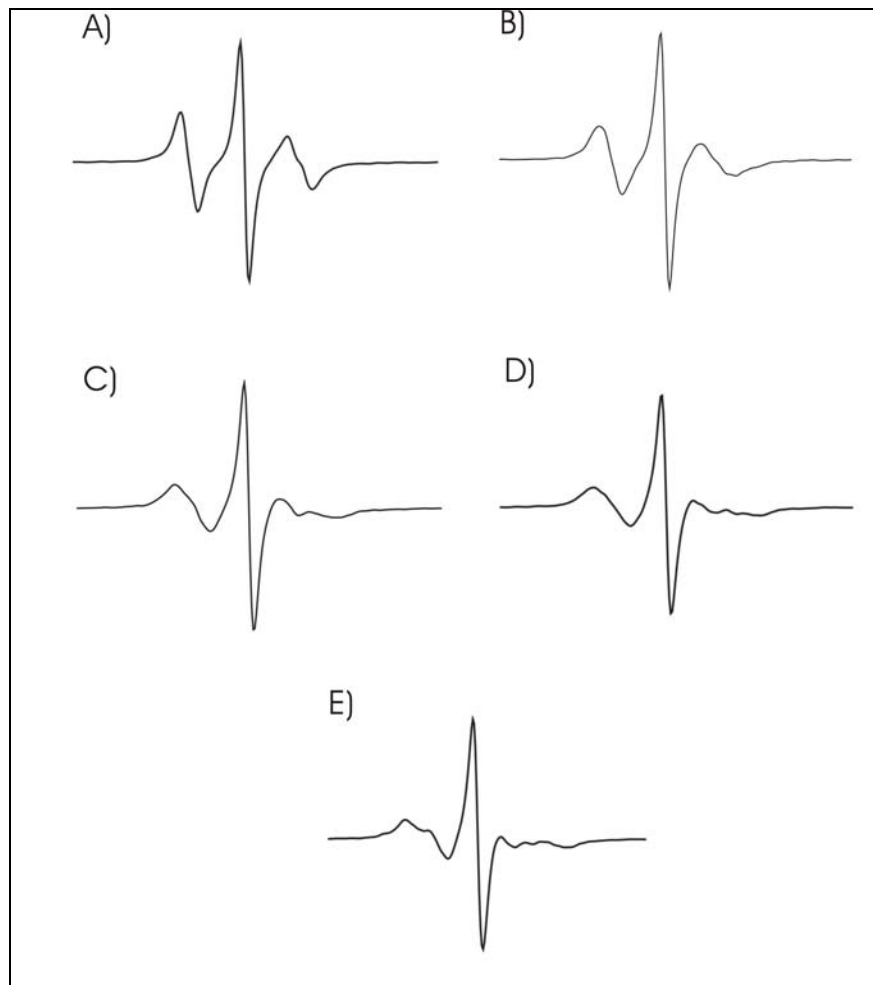


Abbildung 5.16. Temperaturverlauf der Spektren der Spinsonde in der molekularen Umgebung der Alanin-Helix für a) 320°C; b) 310°C; c) 300°C; d) 290°C und e) 280°C.