

## Kapitel 6

# Analyse verschiedener Mutanten des T4 Lysozym

Durch die Einbettung der Spinsonde in die molekulare Umgebung der Alanin-Helix war eine Charakterisierung der Dynamik der Spinsonde unter Berücksichtigung ihrer Wechselwirkung mit den Atomen des Rückgrats der Helix und des Einflusses von verschiedenen B-Faktoren möglich. Um eine realistische Simulation der Dynamik der Spinsonde in der Proteinumgebung zu ermöglichen, müssen jedoch auch die sterischen und elektrostatischen Wechselwirkungen der Spinsonde mit den verschiedenen benachbarten Aminosäuren des Proteins berücksichtigt werden, die im Falle der Alanin-Helix minimal waren. Zu diesem Zweck wurden die Aminosäuren in der Umgebung der Spinsonde nun zu den Aminosäuren mutiert, welche auch tatsächlich in der Proteinumgebung an den verschiedenen zu untersuchenden Positionen vorliegen. Für die Durchführung von Simulationen der molekularen Dynamik wurden sämtlich Positionen im Protein gewählt, für die die Spinsonde in das Lösungsmittel zeigt und keine Hinweise auf tertiäre Wechselwirkungen gefunden wurden [65], da nur solche Systeme mit der hier verwandten Methodik korrekt simuliert werden können.

Für die Simulationen wurden außerdem Positionen gewählt, deren experimentelle Spektren sehr unterschiedlich sind, so dass die Spinsonde an diesen Positionen also eine sehr unterschiedliche Dynamik aufweist. Anhand dieser Positionen konnte dann der unterschiedliche Einfluß der verschiedenen molekularen Umgebungen auf das ESR-Spektrum der Spinsonde untersucht werden.

Dabei waren verschiedene Fragestellungen von Interesse. Zum einen wurde der Zusammenhang zwischen der Dynamik der Disulfid-Isomere und dem Auftreten von zwei-Komponenten-Spektren untersucht. Hierfür wurde eine der Positionen so gewählt, dass für diese Mutation experimentell ein zwei-Komponenten-Spektrum vorliegt. Mit Hilfe der MD-Simulationen kann dann der Ursprung der zwei Komponenten der Dynamik für dieses System im Gegensatz zu den anderen Positionen der Spinsonde aufgeklärt werden, an denen nur eine Komponente der Dynamik im Spektrum sichtbar ist.

Zum anderen wurde eine gesonderte Untersuchung der verschiedenen elektrostatischen Wechselwirkungen der Spinsonde mit den räumlich benachbarten Aminosäuren und ihr Einfluß auf die Dynamik der Spinsonde anhand dieses Systems durchgeführt. Dazu wurde die Stärke der Partialladungen der Spinsonde variiert und auf diese Weise deren Einfluss auf die elektrostatischen Wechselwirkungen der Spinsonde untersucht. Zusätzlich wurden Simulationen mit verschiedenen Ionenkonzentrationen im Lösungsmittel durchgeführt, um durch die so entstehende Abschirmung der elektrostatischen Wechselwirkungen den Einfluss von geladenen Aminosäuren auf die Dynamik der Spinsonde untersuchen zu können. Für diesen Zweck wurden außerdem Simulationen mit neutralisierten Aminosäuren durchgeführt, so dass die sterischen Wechselwirkungen, nicht aber die elektrostatischen Wechselwirkungen erhalten bleiben. Anhand dieser Simulationen konnte der Einfluß der Elektrostatik auf die Dynamik der Spinsonde untersucht werden.

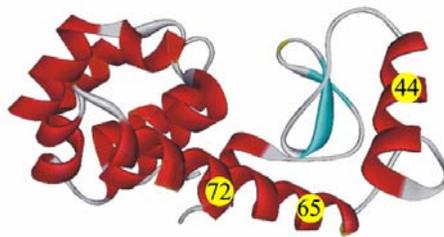


Abbildung 6.1. Die im Folgenden untersuchten Positionen der Spinsonde am T4 Lysozym.

## 6.1 Die Spinsonde an Position 72R1

Für die Spinsonde an Position 72R1 bestehen die räumlich benachbarten Aminosäuren aus Asparagin (i-4) und Glutamin (i-3) auf der einen Seite und Arginin (i+4) sowie Valin (i+3) auf der anderen Seite (Abbildung 6.2). Dabei ist Arginin eine Aminosäure, deren Größe mit der der Spinsonde vergleichbar ist, die anderen Aminosäuren sind deutlich kleiner. Arginin ist außerdem in einer pH-neutralen Umgebung die einzige positiv geladene Aminosäure im System, alle anderen Aminosäuren sind neutral. Anhand dieses Systems lassen sich also die Auswirkungen sterischer Wechselwirkungen sowie einige Aspekte elektrostatischer Wechselwirkungen mit einer geladenen Aminosäure untersuchen. Das experimentelle Spektrum der Spinsonde in dieser Position zeigt eine stark anisotrope Form, die sich theoretisch durch eine Komponente der Dynamik simulieren lässt.

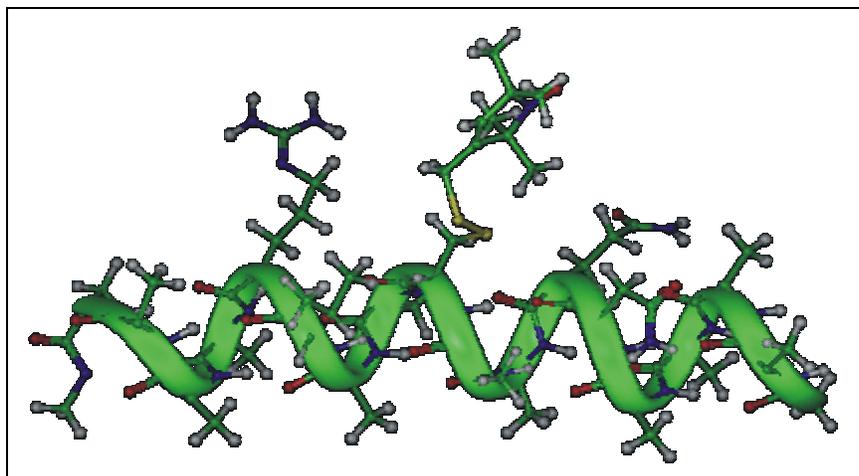


Abbildung 6.2. Das molekulare System der Spinsonde an Position 72R1. Benachbarte Aminosäuren: Arginin, Valin (links); Asparagin, Glutamin (rechts).

### 6.1.1 Die Wahrscheinlichkeitsverteilung der Spinsonde

Zur Untersuchung der Wahrscheinlichkeitsverteilung der Spinsonde wurden auch für dieses System zwei Hochtemperaturrechnungen einer Länge von 500 ns durchgeführt. In Kristallstrukturuntersuchungen liegt der B-Faktor an Position 72 des Proteins in einem Bereich von  $B = 7 - 16 \text{ \AA}^2$  [71,84,91]. Die Simulationen wurden hier zunächst mit einem B-Faktor von  $B = 10 \text{ \AA}^2$  durchgeführt. Die Verteilung des  $N - C_\alpha$  Vektors wurde dann aus diesen Rechnungen extrahiert und in Abbildung 6.3 als Kugeloberflächengraphik dargestellt.

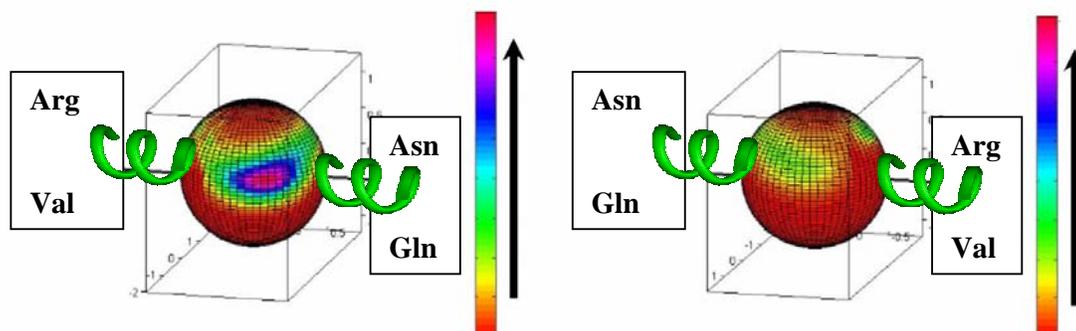
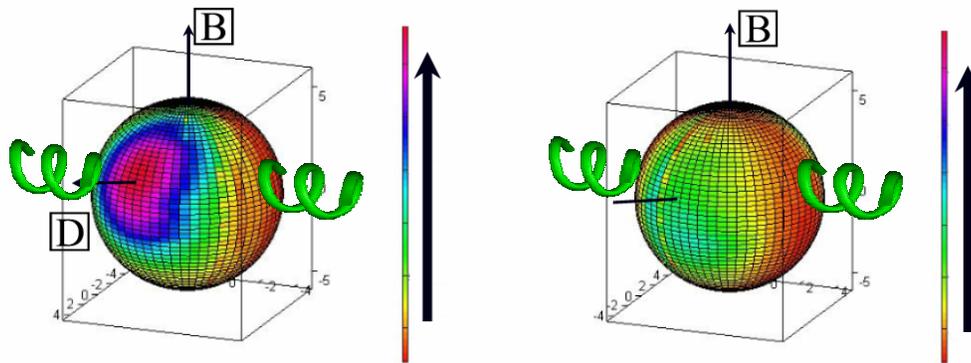


Abbildung 6.3. Wahrscheinlichkeitsverteilung des  $N - C_\alpha$  Vektors der Spinsonde an Position 72R1. Die benachbarten Aminosäuren sind mit den üblichen Abkürzungen bezeichnet. Die Intensität steigt in der angezeigten Richtung. Die Kugel wird von beiden Seiten dargestellt.

Im Vergleich zur  $N - C_\alpha$  Verteilung der Alanin-Helix ergeben sich für dieses System deutliche Unterschiede. Es existiert hier nun noch ein seitlich zur Helix-Achse gelagertes Maximum, die Position der Spinsonde entlang der Helix-Achse ist nun durch die im Vergleich zu Alanin höhere sterische Wechselwirkung mit den benachbarten Aminosäuren Asparagin und Glutamin nicht mehr zugänglich.

Gleichzeitig befindet sich das seitliche Maximum immer noch relativ nahe zur Helix-Achse in der Richtung dieser beiden Aminosäuren, da die sterische Wechselwirkung mit dem sehr großen Asparagin auf der anderen Seite der Spinsonde eine Ausrichtung der Spinsonde senkrecht zur Helix-Achse verhindert. Wie aus einem Vergleich mit dem nächsten betrachteten System hervorgeht, scheint die elektrostatische Wechselwirkung der negativen Partialladungen der Spinsonde mit dem positiv geladenen Arginin keine Auswirkung auf die Verteilung der Spinsonde zu haben. Die Diederwinkel weisen für dieses System die gleichen Korrelationen auf wie für die Alanin-Helix und werden daher hier nicht noch einmal gesondert diskutiert. In Abbildung 6.4 wird die Wahrscheinlichkeitsverteilung der molekularen z-Achse dargestellt.

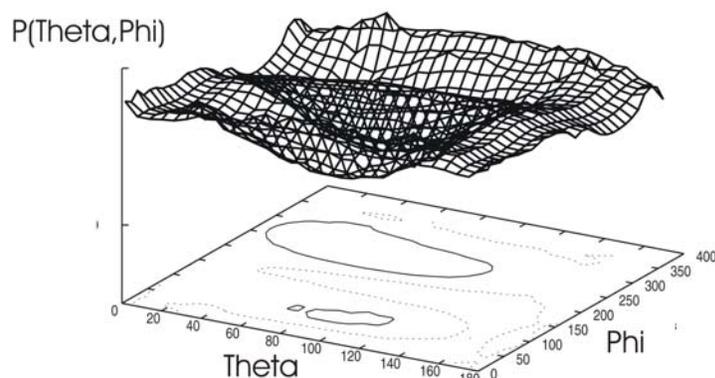


**Abbildung 6.4.** Wahrscheinlichkeitsverteilung der molekularen z-Achse im Laborkoordinatensystem. Zum Übergang in das Proteinkoordinatensystem ist eine Rotation um die Helix-Achse um  $90^\circ$  notwendig. Die Richtung des magnetischen Feldes und die Orientierung der Direktorachse sind durch Pfeile markiert. Die Kugel wird von beiden Seiten dargestellt.

Auch hier existieren die beiden schon von der Alanin-Helix bekannten Maxima in der Verteilung, in ihren Intensitäten zeigen sich jedoch deutliche Unterschiede. Das Maximum der linken Graphik in Abbildung 6.4 ist deutlich stärker ausgeprägt als das Maximum in der rechten Graphik. Beide Maxima der Verteilung liegen hier auf der Kugeloberfläche auch nicht direkt gegenüber, wie es bei der Alanin-Helix der Fall war, sondern sind relativ zur Helix-Achse leicht verkippt. Die Lage der Maxima in der Winkelverteilung von  $\chi_5$  ändert sich jedoch nicht. Die leichte Verkipfung der Ringebene kann auch nicht der Änderung eines einzelnen anderen Diederwinkels zugeordnet werden, sondern entsteht durch eine gleichzeitige Änderung mehrerer Winkel.

Zunächst soll die Orientierung des Direktors auch für dieses System in das Maximum der Wahrscheinlichkeitsverteilung der molekularen z-Achse gelegt werden. Als Winkel zwischen der z-Achse des Diffusionskoordinatensystems und der molekularen z-Achse wird wie im Fall der Alanin-Helix  $\beta_D = 0^\circ$  definiert. Für diesen Fall kann die Potentialfläche der z-Achse des Diffusionskoordinatensystems wie zuvor beschrieben aus der Verteilung der molekularen z-

Achse berechnet werden, da beide Koordinatensysteme identisch sind. Sie ist in Abbildung 6.5 dargestellt.



**Abbildung 6.5. Potentialfläche der Polarwinkel der molekularen z-Achse im Laborkoordinatensystem.**

Die Potentialfläche spiegelt die starke Anisotropie der Wahrscheinlichkeitsverteilung wieder. Die Potentialbarriere zwischen den beiden Minima ist hier mit  $2.2 k_B T$  viel deutlicher ausgeprägt als im Fall der Alanin-Helix, weshalb ein Übergang zwischen den Minima unwahrscheinlicher ist.

### 6.1.2 Die Dynamik der Disulfid-Isomere

Die Dynamik der Spinsonde an Position 72R1 ist wegen sterischer Wechselwirkungen mit den Aminosäuren in der räumlichen Umgebung der Spinsonde sehr restriktiv. Obwohl auch hier wegen der unterschiedlich stark ausgeprägten van der Waals Wechselwirkungen des Disulfids mit den Atomen des Rückgrats energetische Unterschiede für die Position beider Isomere über der Helix auftreten, sind diese im Vergleich zu den auftretenden sterischen Wechselwirkungen mit den benachbarten Aminosäuren gering, wie eine Analyse der energetischen Beiträge zeigt. Daher ist die Position über der Helix für beide Isomere praktisch nicht zugänglich und es treten keine Unterschiede in der Wahrscheinlichkeitsverteilung oder in der Diffusionskonstanten der Isomere auf. Dieses Resultat stimmt mit dem experimentellen Spektrum überein, welches sich mit Hilfe einer Komponente der Dynamik simulieren lässt.

### 6.1.3 Berechnung des ESR-Spektrums

Für die zuvor beschriebenen Voraussetzungen wurde nun ein ESR-Spektrum berechnet. Die Diffusionskonstante für die Simulation des ESR-Spektrums wurde Simulationen mit einem B-Faktor von  $B = 10 \text{ \AA}^2$  entnommen, bei dem auch die Potentialfläche berechnet wurde. Sie ergibt sich zu  $D_g = (1.8 \pm 0.4) 10^8 \text{ s}^{-1}$ . Das so entstehende ESR-Spektrum wird in Abbildung

6.6 im Vergleich zum experimentellen Spektrum der Spinsonde an Position 72R1 dargestellt. Die experimentellen Ergebnisse wurden dabei der Literatur entnommen [65].

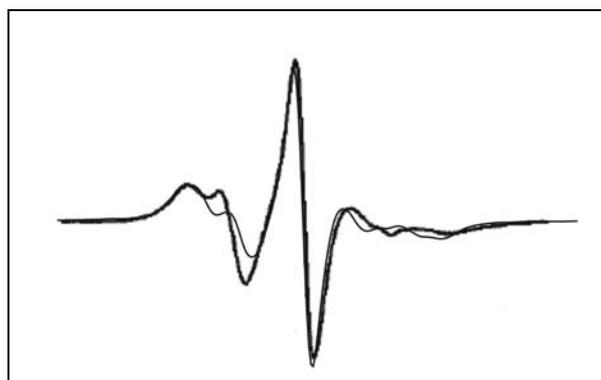


Abbildung 6.6. ESR-Spektren der Spinsonde an Position 72R1 aus experimentellen Ergebnissen (fette Linie) im Vergleich zur Simulation (schmale Linie) für die Definition des Direktors als Maximum der Verteilung mit  $\beta_D = 0^\circ$ . Die Scanbreite der experimentellen Daten beträgt 98G, die Feldmodulationsamplitude 1G. Die angepasste Linienbreite betrug  $T_2^{-1} = 5.5G$ .

Auf diese Weise erhält man ein ESR-Spektren, dessen Übereinstimmung mit dem experimentellen Spektrum relativ schlecht ist, obwohl die Brownschen Trajektorien die Winkelverteilung der MD-Trajektorien korrekt wiedergeben.

Worauf ist diese schlechte Übereinstimmung zwischen Experiment und Theorie zurückzuführen? Ein möglicher Grund für die beobachtete Diskrepanz könnte in der Wahl des Diffusionskoordinatensystems begründet sein, das hier als koinzident mit dem magnetischen Koordinatensystem angenommen wurde. Um die Auswirkungen dieser Annahme zu untersuchen, wurde nun die zweite gebräuchliche Definition des Direktors als Mittelwert der Verteilung geprüft.

#### 6.1.4 Die Orientierung des Direktors

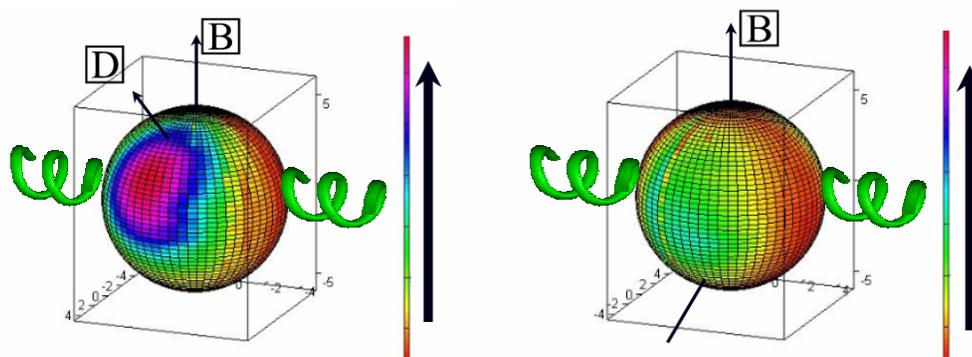


Abbildung 6.7. Wahrscheinlichkeitsverteilung der molekularen z-Achse im Laborkoordinatensystem. Zum Übergang in das Proteinkoordinatensystem ist eine Rotation um die Helix-Achse um  $90^\circ$  notwendig. Die Richtung des magnetischen Feldes und die Orientierung der Direktorachse als Mittelwert der Verteilung sind durch Pfeile markiert. Die Kugel wird von beiden Seiten dargestellt.

Die aus dem Mittelwert der Verteilung entstehende Direktororientierung ist in Abbildung 6.7 eingezeichnet.

$\beta_D$  kann dann näherungsweise als der Winkel zwischen der Direktororientierung und dem Maximum der Wahrscheinlichkeitsverteilung der molekularen z-Achse angenommen werden, was in diesem Fall  $\beta_D = 40^\circ$  ergibt. Die Berechnung eines Potentials kann hier eigentlich nur auf iterativem numerischem Wege erfolgen, da von der Definition der Direktororientierung und  $\beta_D$  auch die Form der Potentialfläche abhängt, da nun die Bewegungsradien der z-Achse des Diffusionskoordinatensystems und der molekularen z-Achse voneinander abweichen.

Für den Fall der Definition des Direktors als Mittelwert der Verteilung wurde die aus den MD-Trajektorien für die molekulare z-Achse berechnete Potentialfläche als erste Näherung betrachtet. Hier soll zunächst das Spektrum untersucht werden, welches aus der Definition des Direktors als Mittelwert der Verteilung mit  $\beta_D = 40^\circ$  und der Potentialfläche aus der Verteilung der molekularen z-Achse entsteht (Abb. 6.8 a).

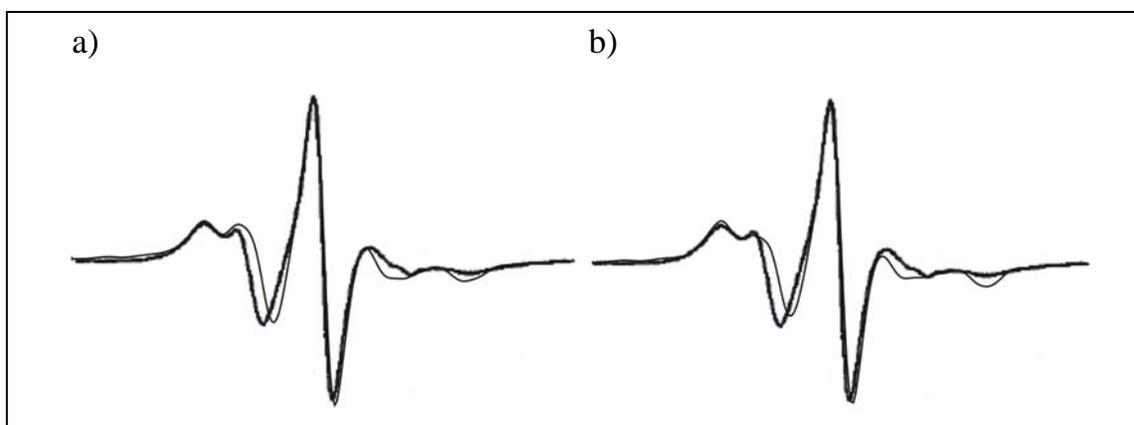


Abbildung 6.8. ESR-Spektren der Spinsonde an Position 72R1 aus experimentellen Ergebnissen (fette Linie) im Vergleich zur Simulation (schmale Linie) für die Definition des Direktors als Mittelwert der Verteilung mit  $\beta_D = 40^\circ$  a) und dem Potential der molekularen z-Achse und b) mit skaliertem Potential (siehe Text).

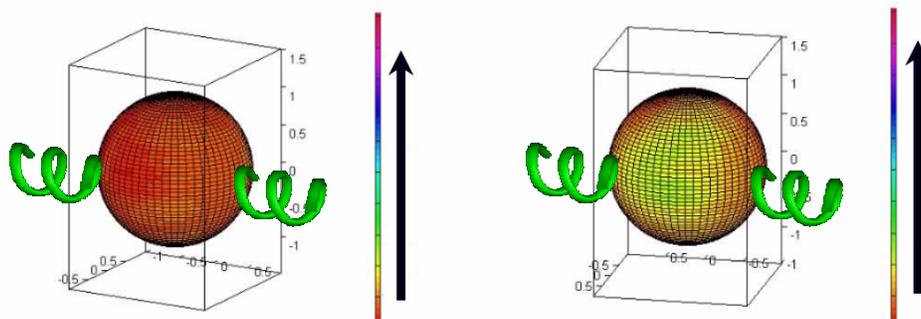
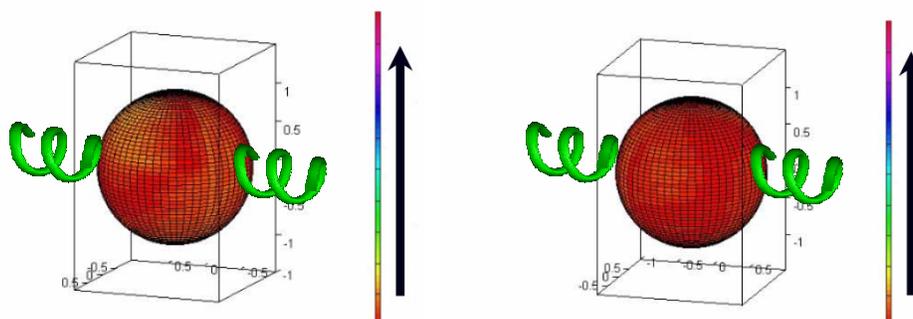


Abbildung 6.9. Differenzen der Wahrscheinlichkeitsverteilung der molekularen z-Achse im Laborkoordinatensystem zwischen der Brownschen Dynamik und der MD-Simulation mit dem Potential aus der Verteilung der molekularen z-Achse. Die Kugel wird von beiden Seiten dargestellt.

Für diese Definition ist die Übereinstimmung mit den experimentellen Daten deutlich besser, allerdings können die Brownschen Trajektorien die erwartete Winkelverteilung der molekularen z-Achse aus den MD-Trajektorien nicht reproduzieren, da das verwandte Potential unter der Annahme von  $\beta_D = 0^\circ$  bestimmt wurde. Differenzen zwischen der erwarteten und mittels Brownscher Dynamik berechneten Aufenthaltswahrscheinlichkeit der molekularen z-Achse sind in Abb. 6.9 dargestellt.

Da die Wahrscheinlichkeitsverteilung nur auf einer Seite zu viel Intensität aufweist, kann diese Abweichung durch die Wahl einer flacheren Potentialfläche für diese Seite ausgeglichen werden. Das Potential aus den MD-Trajektorien lässt sich daher so skalieren, dass man auch unter der Annahme von  $\beta_D = 40^\circ$  die korrekte Winkelverteilung der molekularen z-Achse erhält. Die Differenzen zwischen den beiden Verteilungen sind in Abbildung 6.10 gezeigt und man sieht, dass praktisch keine Abweichungen mehr detektierbar sind.

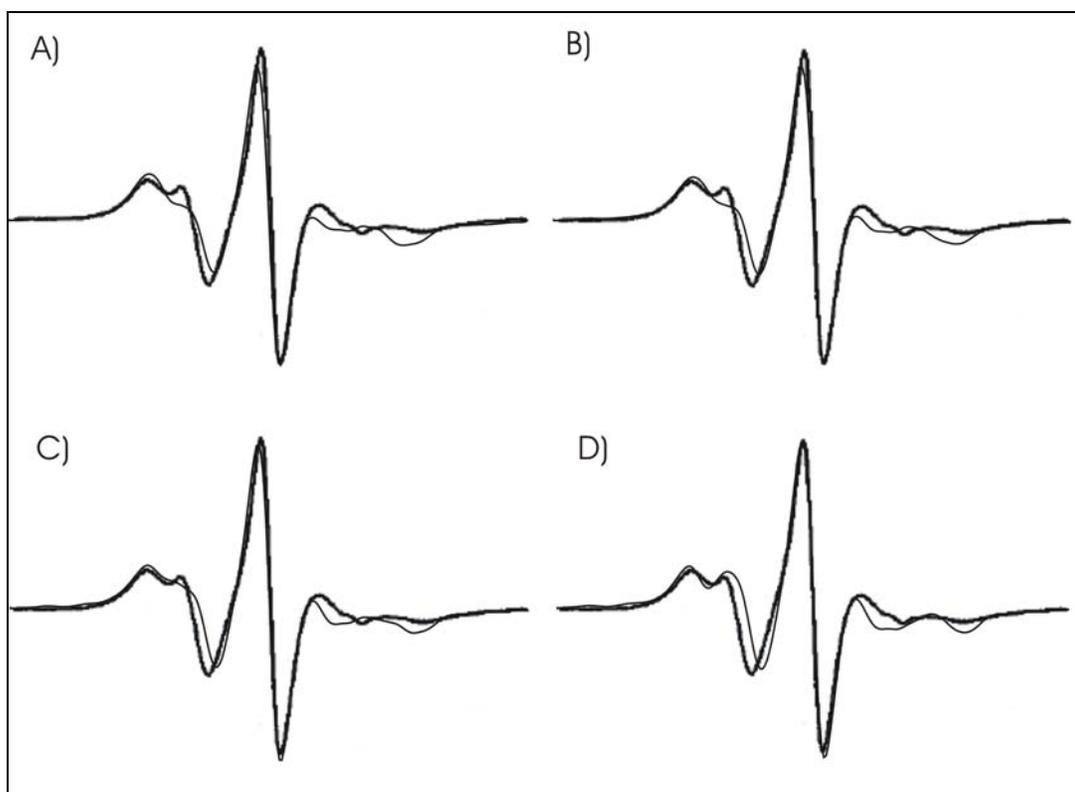


**Abbildung 6.10.** Differenzen der Wahrscheinlichkeitsverteilung der molekularen z-Achse im Laborkoordinatensystem zwischen der Brownschen Dynamik und der MD-Simulation mit dem skalierten Potential. Die Kugel wird von beiden Seiten dargestellt.

Das Spektrum, welches sich aus dieser Skalierung der Potentialfläche und der Direktororientierung als Mittelwert der Verteilung mit  $\beta_D = 40^\circ$  ergibt, ist in Abbildung 6.8 b) dargestellt.

Das auf diese Weise berechnete ESR-Spektrum liefert eine deutlich verbesserte Beschreibung des experimentellen Spektrums und gleichzeitig eine korrekte Wahrscheinlichkeitsverteilung für die erzeugten Trajektorien. Mit Hilfe dieser Methode lassen sich in einem bestimmten Bereich auch für andere Werte von  $\beta_D$  Trajektorien berechnen, die aufgrund einer Anpassung der Skalierung der Potentialfläche die korrekte Winkelverteilung liefern, aufgrund der Winkelverteilung ist also keine eindeutige Zuordnung von  $\beta_D$  möglich. Die aus diesen Werten für  $\beta_D$  und den jeweils skalierten Potentialen berechneten ESR-Spektren werden in Abbildung 6.11 dargestellt. Mit diesem Verfahren ist eine Simulation des ESR-Spektrums bis zu einem Winkel von  $\beta_D = 50^\circ$  möglich. Für höhere Winkel werden die Abweichungen zwischen den Wahrscheinlichkeitsverteilungen der molekularen z-Achse so groß, dass sich nicht durch eine einfache Skalierung des Potentials beheben werden können. Die

Abweichungen zwischen den simulierten Spektren und den experimentellen Daten nimmt bis zu Winkeln zwischen  $\beta_D = 30^\circ - 40^\circ$  ab, für das Spektrum mit  $\beta_D = 50^\circ$  werden die Abweichungen wieder größer. Eine Simulation des experimentellen Spektrums mit dem Freedschen Programm hat einen optimalen Wert von  $\beta_D = 36^\circ$  zur Folge, was sehr dicht am hier erhaltenen Wert für die Verkippung von Molekül- und Diffusionskoordinatensystem liegt.



**Abbildung 6.11.** ESR-Spektren für auf die Originalverteilung skalierte Potentialflächen mit Winkeln zwischen Diffusionskoordinatensystem und Molekülkoordinatensystem von a)  $\beta_D = 10^\circ$ , b)  $\beta_D = 20^\circ$ , c)  $\beta_D = 30^\circ$  und d)  $\beta_D = 50^\circ$ . Die Scanbreite der experimentellen Daten beträgt 98G, die Feldmodulationsamplitude 1G. Die angepasste Linienbreite betrug  $T_2^{-1} = 5.5G$ .

Die Übereinstimmung mit den experimentellen Daten ist also für die Definition von  $\beta_D$  als Winkel zwischen der Direktororientierung und dem Maximum der Verteilung am besten, weshalb diese Definition für alle hier betrachteten Systeme verwendet wird, bei denen eine Definition der Direktororientierung als Mittelwert der Verteilung gewählt wird. Wie die im folgenden betrachteten Systeme zeigen, ergibt sich eine bessere Übereinstimmung mit den experimentellen Daten für eine Wahl des Direktors als Mittelwert der Verteilung dann, wenn beide Maxima der Verteilung der molekularen z-Achse auf der Kugeloberfläche nicht direkt gegenüberliegen, wie es auch bei der Spinsonde an Position 72R1 der Fall war. Für den Fall,

dass beide Maxima gegenüberliegen, liefert die Wahl des Direktors in Richtung des Maximums der Verteilung die bessere Übereinstimmung mit den experimentellen Daten.

Anhand der Spinsonde an Position 72R1 im Vergleich zu dem System der Alanin-Helix wird deutlich, dass die Restriktionen der Mobilität der Spinsonde durch sterische Wechselwirkung mit benachbarten Aminosäuren einen erheblichen Einfluss auf die Form des ESR-Spektrums haben.

Verwendet man anstelle des B-Faktors von  $B = 10 \text{ \AA}^2$  einen B-Faktor am oberen Ende des Bereiches aus den experimentellen Daten von  $B = 15 \text{ \AA}^2$ , so ergibt sich nur ein sehr geringer Unterschied für den Bewegungsradius der Spinsonde, da dieser maßgeblich durch die sterischen Wechselwirkungen mit der molekularen Umgebung bestimmt wird. Eine Erhöhung der Diffusionskonstante, die aus der linearen Interpolation der vorhandenen Daten gewonnen wird, resultiert aufgrund der stark anisotropen Verteilung nur in einer geringen Änderung der spektralen Form.

### 6.1.5 Mutation der Aminosäuren in der molekularen Umgebung

Um den Einfluss der sterischen und elektrostatischen Wechselwirkung der Spinsonde mit dem relativ großen Arginin in der Umgebung zu testen, wurden für die nun folgende Simulation Arginin (i+4) sowie Valin (i+3) zu Alanin mutiert, so dass sich nur auf einer Seite der Spinsonde von Alanin verschiedene Aminosäuren befinden. Das simulierte System ist in Abbildung 6.12 dargestellt.

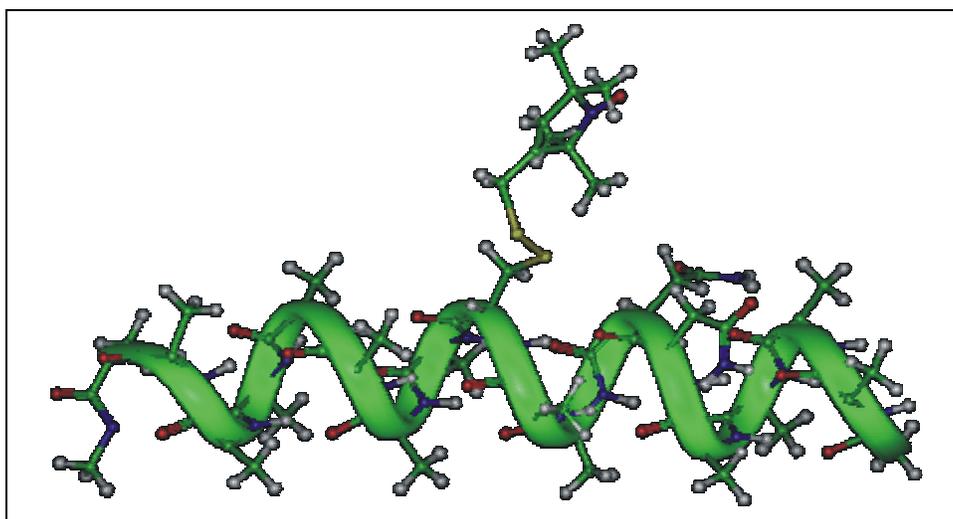
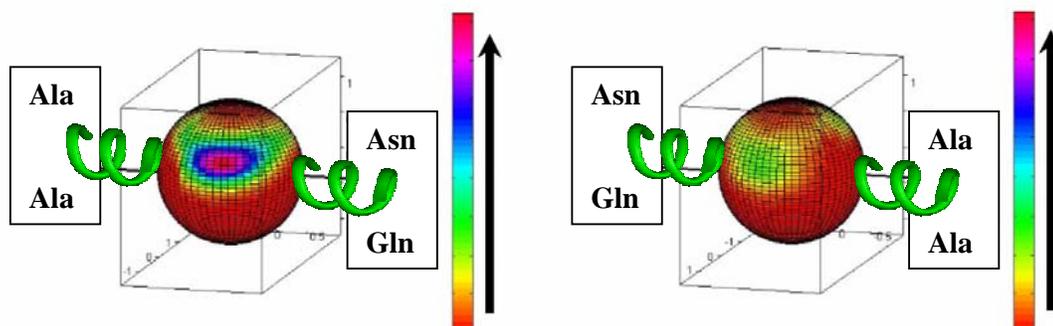


Abbildung 6.12. Das molekulare System der Spinsonde an Position 72R1 mit Mutation von Arginin und Valin zu Alanin (links) sowie Asparagin und Glutamin (rechts).

Das experimentelle Spektrum der Spinsonde in dieser Position mit der beschriebenen Mutation zeigt eine genauso anisotrope Form wie in der ursprünglichen Konformation, aber

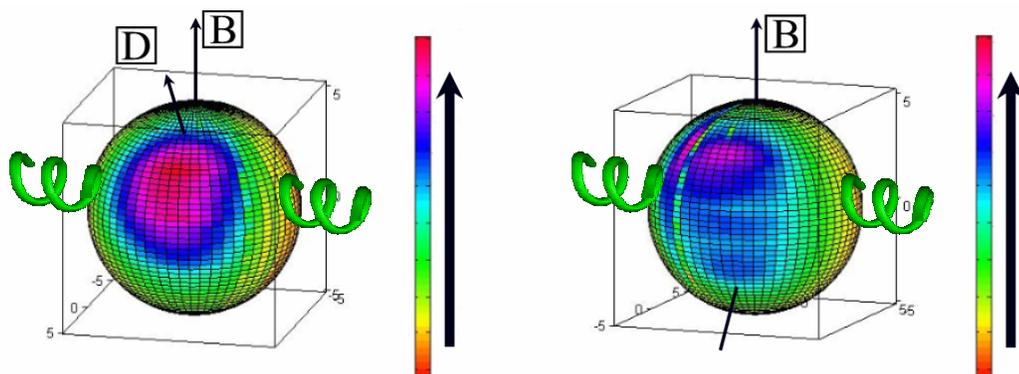
eine geringere spektrale Breite, das Spektrum weist ebenfalls die Form eines ein-Komponenten-Spektrums auf [65].

Für diese Variante wurden ebenfalls zwei Hochtemperaturrechnungen mit dem gleichen B-Faktor wie bei der ursprünglichen Variante 72R1 durchgeführt, aus denen dann die Wahrscheinlichkeitsverteilung des  $N-C_\alpha$  Vektors extrahiert wird. Die zugehörige Kugeloberflächengraphik ist in Abbildung 6.13 dargestellt.



**Abbildung 6.13.** Wahrscheinlichkeitsverteilung des  $N-C_\alpha$  Vektors der Spinsonde an Position 72R1 mit Mutationen von Arginin und Valin zu Alanin. Die benachbarten Aminosäuren sind mit den üblichen Abkürzungen bezeichnet. Die Intensität steigt in der angezeigten Richtung. Die Kugel wird von beiden Seiten dargestellt.

Im Vergleich zur ursprünglichen Variante 72R1 findet eine leichte Verschiebung der Wahrscheinlichkeitsverteilung in die Position senkrecht zur Helix-Achse statt, da in diesem Fall die starke sterische Wechselwirkung mit Arginin wegfällt und durch eine sehr viel kleinere Wechselwirkung mit Alanin ersetzt wird. Im Vergleich zur Alanin-Helix findet auch für das mutierte System aufgrund der sterischen Wechselwirkungen mit Asparagin und Glutamin keine Population der Position über der Helix-Achse statt.

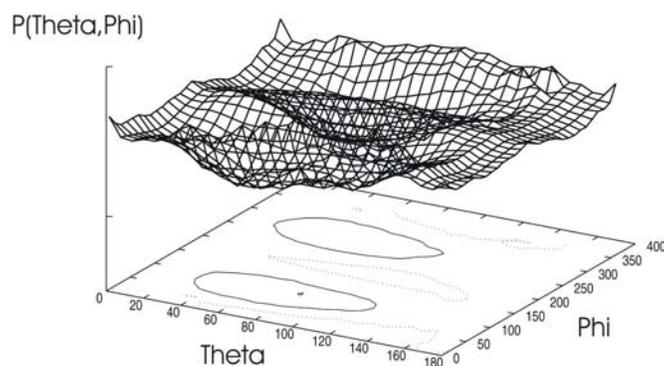


**Abbildung 6.14.** Wahrscheinlichkeitsverteilung der molekularen z-Achse im Laborkoordinatensystem. Zum Übergang in das Proteinkoordinatensystem ist eine Rotation um die Helix-Achse um  $90^\circ$  notwendig. Die Richtung des magnetischen Feldes und die Orientierung der Direktorachse sind durch Pfeile markiert. Die Kugel wird von beiden Seiten dargestellt.

Die Wahrscheinlichkeitsverteilung zeigt einen vergleichbaren Grad von Anisotropie wie die ursprüngliche Variante 72R1.

Auch hier treten die gleichen Korrelationen zwischen den Diederwinkeln auf wie im Fall der Alanin-Helix. Die Wahrscheinlichkeitsverteilung der molekularen z-Achse wird ebenfalls aus den Hochtemperaturtrajektorien extrahiert und in Abbildung 6.14 dargestellt.

Im Vergleich zur ursprünglichen Variante 72R1 treten hier deutliche Unterschiede in der Wahrscheinlichkeitsverteilung der molekularen z-Achse auf. Das Maximum auf der Vorderseite der Kugeloberfläche ist von seiner Form her ähnlich, jedoch etwas breiter angelegt. Das Maximum auf der Rückseite der Kugeloberfläche hat jedoch eine deutlich höhere Intensität und einen höher liegenden Schwerpunkt im Vergleich zu 72R1 ohne Mutation. Dies wird auch hier nicht durch eine Änderung der Lage der Maxima in der Verteilung von  $\chi_5$  verursacht, sondern durch eine kooperative Änderung mehrerer Winkel. Allgemein erhält man hier eine breitere Wahrscheinlichkeitsverteilung, die den größeren Radius der Bewegung der molekularen z-Achse in Abwesenheit der starken sterischen Wechselwirkung mit Arginin zum Ausdruck bringt.



**Abbildung 6.15. Potentialfläche der Polarwinkel der molekularen z-Achse im Laborkoordinatensystem.**

Auch hier liegen sich die beiden Maxima der Verteilung nicht gegenüber, weshalb die Orientierung des Direktors wieder als Mittelwert der Verteilung definiert wird. Sie wird ebenfalls näherungsweise aus dem Mittelwert der Verteilung der molekularen z-Achse bestimmt und ist in Abbildung 6.10 dargestellt. Als Winkel zwischen dem Direktor und dem höchsten Maximum der Verteilung ergibt sich in diesem Fall  $\beta_D = 35^\circ$ . Die Potentialfläche, die sich aus der Wahrscheinlichkeitsverteilung der molekularen z-Achse ergibt, wird auch hier als erste Näherung betrachtet. Sie ist in Abbildung 6.15 gegeben. Die Potentialfläche spiegelt die breitere Wahrscheinlichkeitsverteilung der molekularen z-Achse im Vergleich zu 72R1 ohne Mutation durch breitere Minima wieder. Die Höhe der Barriere zwischen beiden Minima liegt bei  $2.0 k_B T$  und ist damit etwas kleiner als bei 72R1 ohne Mutation.

### 6.1.6 Die Dynamik der Disulfid-Isomere für 72R1 mit Mutation

Auch für diese Variante ergeben sich keine Unterschiede in den Wahrscheinlichkeitsverteilungen oder Diffusionskonstanten der Disulfid-Isomere der Spinsonde. Dies liegt darin begründet, dass man auch für die Variante von 72R1 mit einer Mutation der Aminosäuren in der molekularen Umgebung der Spinsonde nur ein wesentliches Maximum in der Verteilung des  $N-C_\alpha$  Vektors erhält, welches von beiden Isomeren populiert wird. Trotz der unterschiedlichen Konformationen der Isomere ist deren Dynamik aber von ihrer Position relativ zur Helix-Achse abhängig, wie ein Vergleich mit den folgenden untersuchten Systemen zeigt, und weist daher hier keine Unterschiede auf.

Die Position über der Helix ist auch für diese Variante nicht zugänglich, da auf der bei der Alanin-Helix zugänglichen Seite der Helix-Achse keine Mutation der Aminosäuren stattfand. Die energetischen Unterschiede der Isomere über der Helix spielen also in diesem System keine Rolle. Dieses Ergebnis passt zum experimentellen Spektrum, welches ein ein-Komponenten-Spektrum ist.

### 6.1.7 Berechnung von ESR-Spektren für 72R1 mit Mutation

Für die zuvor beschriebenen Voraussetzungen wurde nun ein ESR-Spektrum berechnet. Die Diffusionskonstante für die Simulation des ESR-Spektrums wurde Simulationen mit einem B-Faktor von  $B = 10 \text{ \AA}^2$  entnommen, bei dem auch die Potentialfläche berechnet wurde. Sie ergibt sich zu  $D_g = (2.0 \pm 0.4) 10^8 \text{ s}^{-1}$ . Zum Vergleich der Diffusionskonstanten der beiden Disulfid-Isomere wurden Rechnungen für niedrige B-Faktoren von  $B = 3.2 \text{ \AA}^2$  durchgeführt (siehe Abschnitt 6.1.7)

Das so entstehenden ESR-Spektrum wird in Abbildung 6.16 im Vergleich zu experimentellen Spektren der Spinsonde an Position 72R1 mit Mutation dargestellt. Die experimentellen Ergebnisse wurden dabei auch für das mutierte System der Literatur entnommen [65].



Abbildung 6.16. ESR-Spektrum der Spinsonde an Position 72R1 aus experimentellen Ergebnissen (fette Linie) im Vergleich zur Simulation (schmale Linie) für den Direktor als Mittelwert der Verteilung mit

$\beta_D = 35^\circ$ . Die Scanbreite der experimentellen Daten beträgt 98G, die Feldmodulationsamplitude 1G. Die angepasste Linienbreite betrug  $T_2^{-1} = 5G$ .

Das auf diese Weise simulierte ESR-Spektrum passt gut zu den experimentellen Daten. Die Verringerung der spektralen Breite im Vergleich zu 72R1 ohne Mutation, welche aus einer Verbreiterung in der Wahrscheinlichkeitsverteilung der molekularen z-Achse resultiert, kann mit Hilfe der Simulation gut dargestellt werden.

Die Wahrscheinlichkeitsverteilung der molekularen z-Achse wird allerdings auch in diesem Fall durch die Näherungslösung für die Potentialfläche nicht exakt beschrieben, so dass ebenfalls eine Skalierung des Potentials notwendig ist, um die aus den MD-Trajektorien extrahierte Wahrscheinlichkeitsverteilung korrekt wiederzugeben. Die Differenzen zwischen den Wahrscheinlichkeitsverteilungen der molekularen z-Achse aus den Brownschen Trajektorien und den MD-Trajektorien für das skalierte Potential sind in Abbildung 6.17 dargestellt.

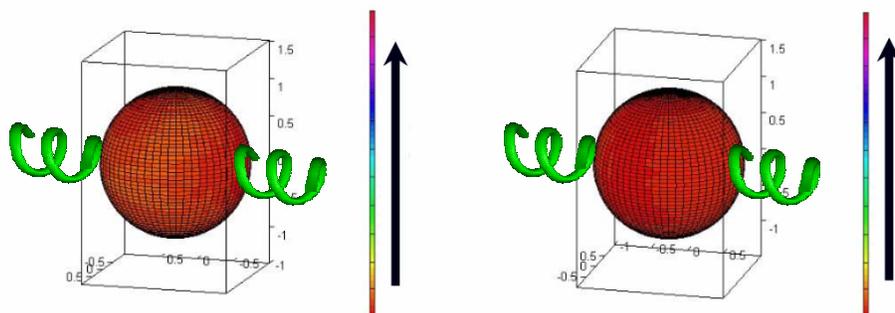


Abbildung 6.17. Differenzen der Wahrscheinlichkeitsverteilung der molekularen z-Achse im Laborkoordinatensystem zwischen der Brownschen Dynamik und der MD-Simulation mit dem skalierten Potential für das mutierte System. Die Kugel wird von beiden Seiten dargestellt.

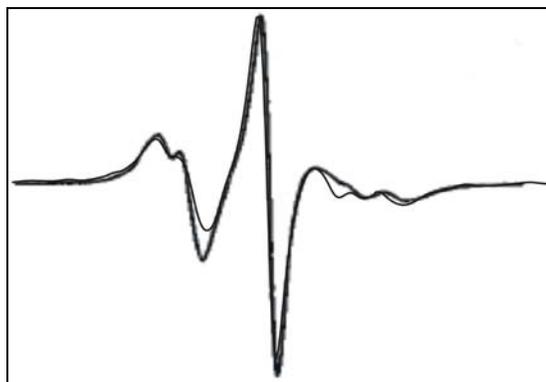


Abbildung 6.18. ESR-Spektrum der Spinsonde an Position 72R1 aus experimentellen Ergebnissen (fette Linie) im Vergleich zur Simulation (schmale Linie) für den Direktor als Mittelwert der Verteilung mit  $\beta_D = 35^\circ$  und skaliertem Potential. Die Scanbreite der experimentellen Daten beträgt 98G, die Feldmodulationsamplitude 1G. Die angepasste Linienbreite betrug  $T_2^{-1} = 5G$ .

Das auf diese Weise berechnete ESR-Spektrum ist in Abbildung 6.18 gezeigt. Es bietet eine gute Beschreibung des experimentellen Spektrums und eine korrekte Darstellung der Wahrscheinlichkeitsverteilung.

Obwohl die sterischen Wechselwirkungen für das mutierte System im Vergleich zum ursprünglichen System deutlich geringer werden, was zu einer Verringerung der spektralen Breite führt, sind sie immer noch stark genug, um die Linienform des Spektrums im Vergleich zur Alanin-Helix entscheidend zu ändern. Dies ist vor allem dadurch zu erklären, dass die Aminosäuren auf der Seite der Helix, auf der sich die Spinsonde im Fall der Alanin-Helix über der Helix aufhält, durch die Mutation des Systems nicht verändert wurden, und so der Zugang der Spinsonde zu der Position über der Helix immer noch blockiert ist. Die elektrostatische Wechselwirkung mit einer geladenen Aminosäure scheint keinen Einfluß auf die Mobilität der Spinsonde zu haben. Der Abstand zwischen der geladenen Aminosäure und dem Sauerstoffatom der Spinsonde, welches die größte negative Partialladung trägt, wird trotz der attraktiven Wechselwirkung bei Mutation der Aminosäure zu Alanin geringer, was den großen Einfluß der sterischen Komponenten belegt.

## 6.2 Die Spinsonde an Position 65R1

Für die Spinsonde an Position 65R1 bestehen die räumlich benachbarten Aminosäuren aus Asparagin (i+3) und Glutamin (i+4) auf der einen Seite und Asparaginsäure (i-4) sowie Glutaminsäure (i-3) auf der anderen Seite (Abbildung 6.19). Sowohl Asparaginsäure als auch Glutaminsäure enthalten in pH-neutraler Umgebung eine negative Ladung.

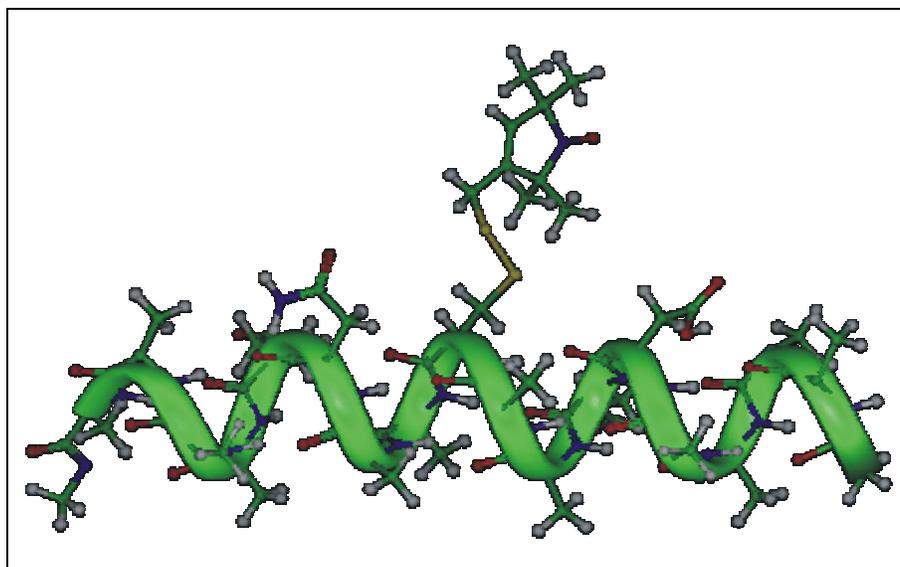


Abbildung 6.19. Das molekulare System der Spinsonde an Position 65R1. Benachbarte Aminosäuren: Asparagin, Glutamin (links); Asparaginsäure, Glutaminsäure (rechts).

Asparagin und Glutamin befinden sich nun im Vergleich zu 72R1 auf der anderen Seite der Spinsonde, da es sich hier um die übernächste Windung der Helix handelt. Die Größe aller Aminosäuren im Vergleich zur Größe der Spinsonde ist relativ gering, aber ausreichend, um die Aufenthaltswahrscheinlichkeit der Spinsonde zu beeinflussen, wie die Untersuchung der Spinsonde an 72R1 gezeigt hat.

Das experimentelle Spektrum der Spinsonde in dieser Position reflektiert eine im Vergleich zu den vorhergehenden Varianten isotropere Verteilung der molekularen z-Achse. Dieses System eignet sich gut zur Untersuchung der elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Spinsonde und geladenen Aminosäuren, da in diesem System zwei geladene Aminosäuren vorhanden sind. Wenn diese also eine wesentliche Auswirkung auf die Wahrscheinlichkeitsverteilung der Spinsonde haben sollten, kann sie anhand dieses zweifach geladenen Systems beobachtet werden.

### 6.2.1 Die Wahrscheinlichkeitsverteilung der Spinsonde

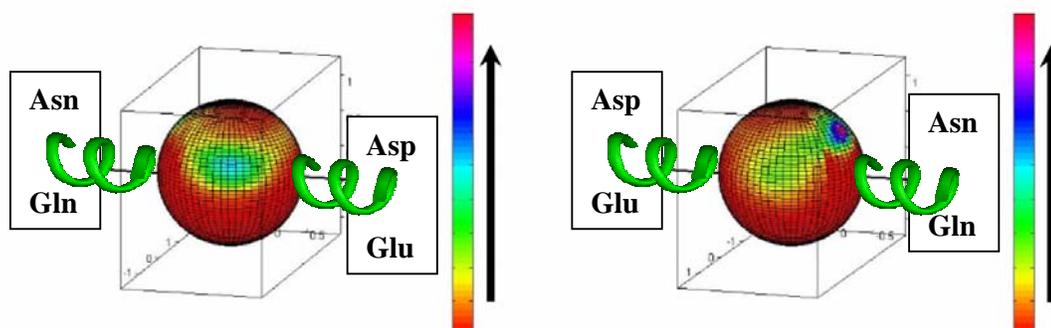


Abbildung 6.20. Wahrscheinlichkeitsverteilung des  $N - C_{\alpha}$  Vektors der Spinsonde an Position 65R1. Die benachbarten Aminosäuren sind mit den üblichen Abkürzungen bezeichnet. Die Intensität steigt in der angezeigten Richtung. Die Kugel wird von beiden Seiten dargestellt.

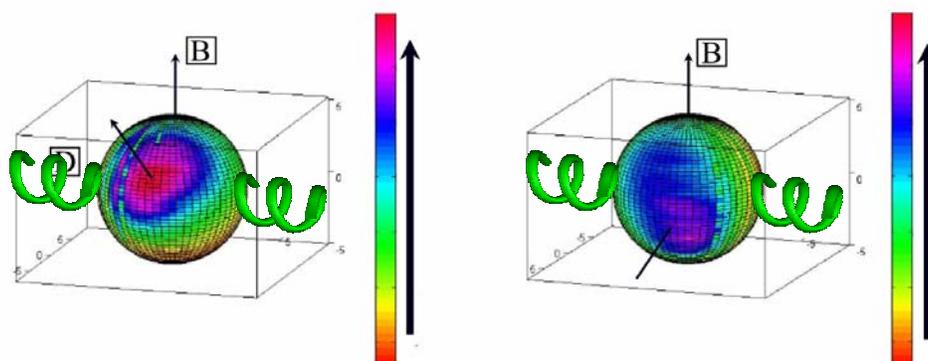


Abbildung 6.21. Wahrscheinlichkeitsverteilung der molekularen z-Achse für 65R1 im Laborkoordinatensystem. Zum Übergang in das Proteinkoordinatensystem ist eine Rotation um die Helix-Achse um  $90^{\circ}$  notwendig. Die Richtung des magnetischen Feldes und die Orientierung der Direktorachse sind durch Pfeile markiert. Die Kugel wird von beiden Seiten dargestellt.

Die Wahrscheinlichkeitsverteilung des  $N-C_\alpha$  Vektors wurde aus den Hochtemperaturtrajektorien extrahiert und in Abbildung 6.20 dargestellt.

Im Gegensatz zu den vorher untersuchten Systemen erhält man hier eine Wahrscheinlichkeitsverteilung des  $N-C_\alpha$  Vektors, die hauptsächlich in Richtung der Helix-Achse entgegengesetzt zu den beiden geladenen Aminosäuren orientiert ist.

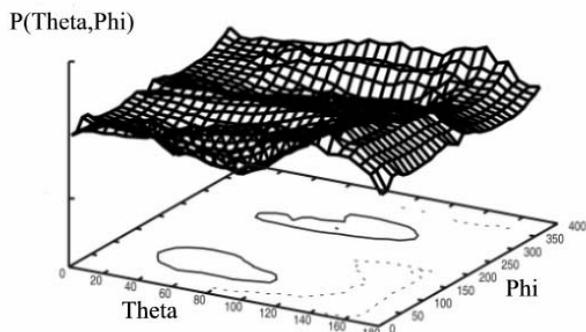
Diese Verteilung kommt durch die starke elektrostatische Repulsion zwischen den negativ geladenen Aminosäuren und den negativen Partialladungen der Spinsonde an den Stickstoff- und Sauerstoffatomen zustande.

Diese repulsive Wechselwirkung ist stark genug, um für eine Überwindung der sterischen Barriere der ungeladenen Aminosäuren auf der anderen Helix-Seite durch die Spinsonde zu sorgen. Abbildung 6.21 zeigt die Wahrscheinlichkeitsverteilung der molekularen z-Achse. Da sich die Spinsonde fast ausschließlich in der Position über der Helix aufhält, existiert für diese Variante aufgrund des geringeren Abstandes eine im Vergleich zu Position 72R1 stärkere Wechselwirkung mit den Atomen des Rückgrats und den ungeladenen Aminosäuren. Diese Wechselwirkung führt zu einem flacheren Minimum in der Potentialfläche der Bewegung der Spinsonde, wodurch eine relativ breite Verteilung der molekularen z-Achse entsteht. Die stärkere Rotation der Ringebeine im Vergleich zur Alanin-Helix ist aufgrund eines relativ großen Abstandes zwischen Ringebeine und Rückgrat der Helix möglich, weshalb die sterischen Wechselwirkungen geringer sind. Die breitere Verteilung ist möglich, obwohl die Ausrichtung des  $N-C_\alpha$  Vektors der Spinsonde sich nur wenig ändert, da für die gleiche Ausrichtung des  $N-C_\alpha$  Vektors verschiedene Orientierungen der molekularen z-Achse möglich sind, die einer Rotation der Spinsonde um die  $N-C_\alpha$  Achse entsprechen, beide Vektoren haben also keine feste Relation zueinander. Eine Korrelation zwischen den Maxima der Verteilung der molekularen z-Achse und der  $N-C_\alpha$  Verteilung existiert auch für dieses System nicht.

Die Verteilung der molekularen z-Achse enthält auch hier die zwei typischen Maxima. Hauptsächliche Änderungen im Vergleich zu den anderen Systemen entstehen durch eine leichte Verschiebung des Maximums auf der Rückseite der Kugeloberfläche, die einem anderen Neigungswinkel der Ringebeine entspricht. Diese Verkippung im Vergleich zu den anderen Systemen entsteht auch in diesem Fall nicht durch eine Verschiebung der Maxima von  $\chi_5$ , sondern durch eine Änderung mehrerer Winkel, die nicht eindeutig zugeordnet werden kann.

Da die Maxima für Variante 65R1, wie auch schon bei der Alanin-Helix, direkt gegenüber liegen, wird hier wieder die Definition des Direktors als Maximum der Verteilung verwendet, wodurch ein Winkel zwischen Diffusionskoordinatensystem und Molekülkoordinatensystem von  $\beta_D = 0^\circ$  gewählt werden kann. Die Orientierung des Direktors ist in Abbildung 6.21

dargestellt. Die zugehörige Potentialfläche, die aus der Verteilung der molekularen z-Achse berechnet werden kann, ist in Abbildung 6.22 gezeigt.



**Abbildung 6.22. Potentialfläche der Polarwinkel der molekularen z-Achse für Variante 65R1.**

Auch die Potentialfläche spiegelt die relative Mobilität der Spinsonde im Vergleich zu den anderen Varianten wieder. Beide Minima sind relativ flach und weisen eine deutlich weniger hohe Barriere von  $1.2 k_B T$  auf.

### 6.2.2 Die Dynamik der Disulfid-Isomere an Position 65R1

Es ergeben sich für dieses System weder in der Wahrscheinlichkeitsverteilung noch in den Diffusionskonstanten Unterschiede für die beiden Isomere. Die Verteilung des  $N - C_\alpha$  Vektors für die Spinsonde an Position 65R1 ist sehr restriktiv, es existiert nur ein ausgeprägtes Maximum in der Wahrscheinlichkeitsverteilung für die Position der Spinsonde über der Helix-Achse. Die energetischen Unterschiede der Isomere in dieser Position aufgrund verschiedener van der Waals Wechselwirkungen mit den Atomen des Rückgrats, die schon aus der Analyse der Alanin-Helix bekannt sind, sind klein im Vergleich zu den starken elektrostatischen Wechselwirkungen der Spinsonde mit den geladenen Aminosäuren in der molekularen Umgebung. Aufgrund dieser starken Wechselwirkungen ist die für die Spinsonde entfernteste Position zu den geladenen Aminosäuren für beide Isomere am günstigsten. Das  $N - C_\alpha$  Maximum über der Helix wird daher von beiden Isomeren populierte, weshalb die Isomere keine Differenzen in ihrer Rotationsdynamik aufweisen. Dies stimmt mit den experimentellen Daten überein, da sich das ESR-Spektrum mit einer Komponente der Dynamik simulieren lässt.

### 6.2.3 Berechnung des ESR-Spektrums für Variante 65R1

Der B-Faktor für diese Position der Spinsonde, den man aus Kristallstrukturdaten erhält, beschreibt einen Bereich von  $B = 8 - 16 \text{ \AA}^2$  [71,84,91], ist also mit dem B-Faktor an Position

72 vergleichbar. Zur Simulation eines Spektrums wurden auch hier Simulationen mit einem B-Faktor von  $B = 10 \text{ \AA}^2$  durchgeführt, bei dem auch die Potentialfläche berechnet wurde. Aus ihnen ergibt sich eine Diffusionskonstante von  $D = (2.0 \pm 0.4)10^8 \text{ s}^{-1}$ . Das ESR-Spektrum der Spinsonde an Position 65R1 im Vergleich zu experimentellen Daten, die auch in diesem Fall [65] entnommen wurden, ist in Abbildung 6.23 dargestellt. Es passt gut zu den experimentellen Daten und spiegelt durch die größere Isotropie eine breitere Verteilung der molekularen z-Achse wieder.



**Abbildung 6.23.** ESR-Spektrum der Spinsonde an Position 65R1 aus experimentellen Ergebnissen (fette Linie) im Vergleich zur Simulation (schmale Linie) für den Direktor als Mittelwert der Verteilung mit  $\beta_D = 0^\circ$  und  $D = 1.7 * 10^8 \text{ s}^{-1}$  (schwarz) bzw.  $D = 2.0 * 10^8 \text{ s}^{-1}$  (rot). Die Scanbreite der experimentellen Daten beträgt 98G, die Feldmodulationsamplitude 1G. Die angepasste Linienbreite betrug  $T_2^{-1} = 4.5G$ .

Für die beste Übereinstimmung mit den experimentellen Daten wurde eine Diffusionskonstante von  $D = 1.7 * 10^8 \text{ s}^{-1}$  verwendet, die im Fehlerbereich der simulierten Daten liegt. Für den mittleren Wert von  $D = 2.0 * 10^8 \text{ s}^{-1}$  ist das Spektrum bereits etwas zu mobil, was der hohen Sensitivität in diesem Bereich der Dynamik Ausdruck verleiht.

Anhand dieses Modellsystems wird deutlich, dass elektrostatische Wechselwirkungen zwischen der Spinsonde und benachbarten Aminosäuren ebenso wie sterische Wechselwirkungen einen erheblichen Einfluss auf die Form des ESR-Spektrums haben können. Allerdings wird aus einem Vergleich mit dem System der Spinsonde an Position 72R1 deutlich, dass für einen Einfluß der elektrostatischen Wechselwirkungen auf das ESR-Spektrum offensichtlich zwei geladene Aminosäuren in der molekularen Umgebung der Spinsonde vorhanden sein müssen, da die Wechselwirkung ansonsten zu gering ist, um die Mobilität der Spinsonde entscheidend zu beeinflussen. Es entstand zwar auch mit einer geladenen Aminosäure eine Änderung im ESR-Spektrum (72R1), diese war jedoch auf die starken sterischen Wechselwirkungen des großen Arginins zurückgeführt worden, welche die elektrostatischen Wechselwirkungen überwog.

## 6.3 Die Spinsonde an Position 44R1

Für die Spinsonde an Position 44R1 bestehen die räumlich benachbarten Aminosäuren aus Lysin (i+4) und Asparaginsäure (i+3) auf der einen Seite sowie Asparagin (i-4) und Alanin (i-3) auf der anderen Seite (Abbildung 6.19). Sowohl Asparaginsäure als auch Lysin sind in pH-neutraler Umgebung geladene Aminosäuren, Lysin enthält eine positive Ladung, Asparaginsäure ist negativ geladen.

Die Länge von Lysin ist mit der Länge der Spinsonde vergleichbar, Lysin verfügt aber über eine hohe konformelle Flexibilität, was die sterischen Wechselwirkungen verringert. Die Größe aller anderen Aminosäuren ist klein im Vergleich zur Größe der Spinsonde.

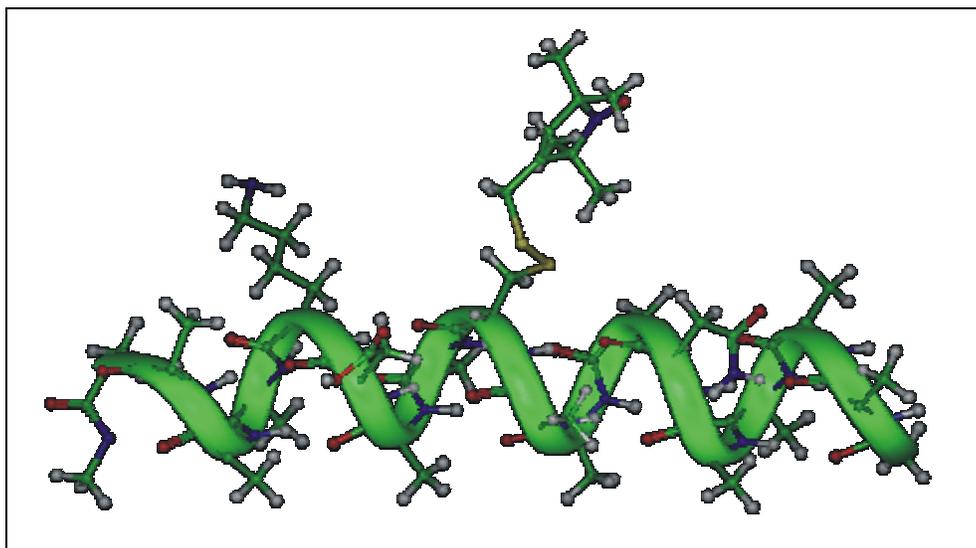


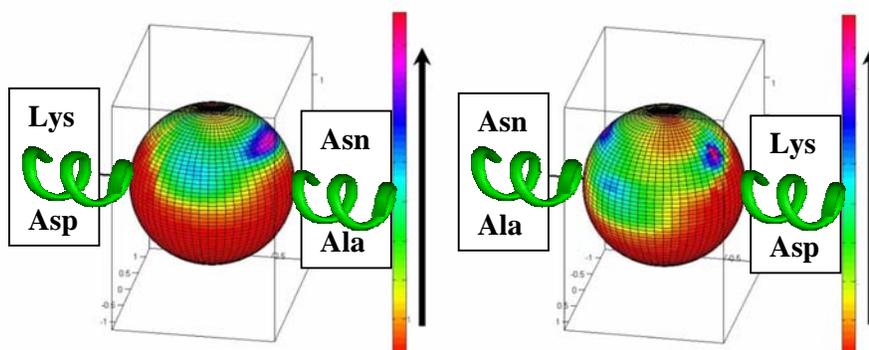
Abbildung 6.19. Die molekulare Umgebung der Spinsonde an Position 44R1. Benachbarte Aminosäuren sind Lysin, Asparaginsäure (links) sowie Asparagin und Alanin (rechts).

Das experimentelle Spektrum der Spinsonde an 44R1 zeigt eine isotrope Linienform, die sich nur mit Hilfe von zwei Komponenten der Dynamik simulieren lässt.

### 6.3.1 Die Wahrscheinlichkeitsverteilung der Spinsonde für $B=10 \text{ \AA}^2$

Da sich die Position 44 im Protein nicht an der Verbindungshelix zwischen den beiden Domänen sondern an einer sehr viel kürzeren Helix befindet, existieren für diese Position höhere B-Faktoren als für die bisher betrachteten Systeme [84]. Dennoch soll die Wahrscheinlichkeitsverteilung hier zunächst für den bisher verwandten B-Faktor von  $B = 10 \text{ \AA}^2$  berechnet werden, um einen Vergleich der Verteilung mit denen der anderen Systeme möglich zu machen. Dieses Vorgehen ist zulässig, da die prinzipielle Orientierung der Maxima der Wahrscheinlichkeitsverteilung unabhängig vom B-Faktor ist und sich mit einem höheren B-Faktor lediglich verbreitert. Zur Berechnung eines Spektrums, das mit den experimentellen Daten verglichen werden kann, wird später ein höherer B-Faktor verwendet.

Die Wahrscheinlichkeitsverteilung des  $N-C_\alpha$  Vektors aus Hochtemperaturtrajektorien mit einem B-Faktor von  $B = 10 \text{ \AA}^2$  ist in Abbildung 6.20 gegeben.



**Abbildung 6.20.** Wahrscheinlichkeitsverteilung des  $N-C_\alpha$  Vektors der Spinsonde an Position 44R1. Die benachbarten Aminosäuren sind mit den üblichen Abkürzungen bezeichnet. Die Intensität steigt in der angezeigten Richtung. Die Kugel wird von beiden Seiten dargestellt.

Vergleicht man die Wahrscheinlichkeitsverteilung mit denen der anderen untersuchten Systeme, so ergibt sich hier eine sehr breite Verteilung mit mehreren Maxima entlang und senkrecht zur Helix-Achse, die auf eine relativ hohe Mobilität der Spinsonde hinweist. Dies ist eigentlich erstaunlich, da man in diesem System aufgrund des großen Lysins starke sterische Wechselwirkungen vermuten würde. Allerdings verfügt Lysin über eine hohe konformelle Flexibilität, wodurch seine Behinderung der Dynamik der Spinsonde geringer ist, als die Größe vermuten lässt. Es liegt dennoch die Vermutung nahe, dass die erhöhte Mobilität durch die elektrostatischen Wechselwirkungen der Spinsonde zustande kommt, da sich der B-Faktor der Helix von den anderen Systemen nicht unterscheidet. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurden verschiedene Rechnungen mit unterschiedlichen elektrostatischen Wechselwirkungen der Spinsonde durchgeführt.

## 6.3.2 Die Verteilung in Abhängigkeit der Elektrostatik

### 6.3.2.1 Neutrale Aminosäuren

Zunächst wurde die Ladung jeweils einer geladenen Aminosäure entfernt. Abbildung 6.21 zeigt die Wahrscheinlichkeitsverteilung des  $N-C_\alpha$  Vektors der Spinsonde für ein Simulationssystem mit neutralem Lysin und geladener Asparaginsäure. Die Spinsonde zeigt hier eine sehr immobile, schmale Verteilung mit einem einzigen Maximum, welches wegen der sterischen Wechselwirkung mit Lysin und der elektrostatischen Repulsion der Asparaginsäure von deren Seite abgewandt ist. Im Gegensatz zum doppelt geladenen System liegt das Hauptmaximum hier seitlich zur Helix und nicht entlang der Helix-Achse.

Abbildung 6.22 zeigt die Wahrscheinlichkeitsverteilung des  $N-C_\alpha$  Vektors für ein Simulationssystem mit neutraler Asparaginsäure und geladenem Lysin. Auch hier unterscheidet sich die Verteilung in signifikanter Weise von der des zweifach geladenen Systems. Der Unterschied in der Breite der Verteilung zum unmodifizierten System ist zwar hier wesentlich geringer als für das neutrale Lysin, die Maxima der Verteilung liegen hier jedoch hauptsächlich senkrecht zur Helix-Achse.

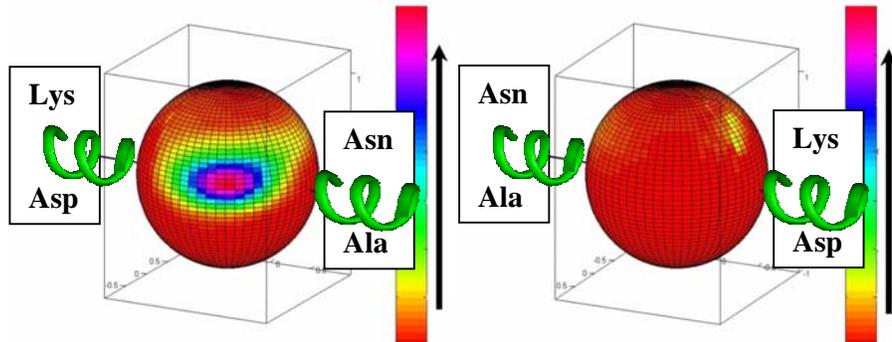


Abbildung 6.21. Wahrscheinlichkeitsverteilung des  $N-C_\alpha$  Vektors der Spinsonde an Position 44R1 für neutrales Lysin. Die benachbarten Aminosäuren sind mit den üblichen Abkürzungen bezeichnet. Die Intensität steigt in der angezeigten Richtung. Die Kugel wird von beiden Seiten dargestellt.

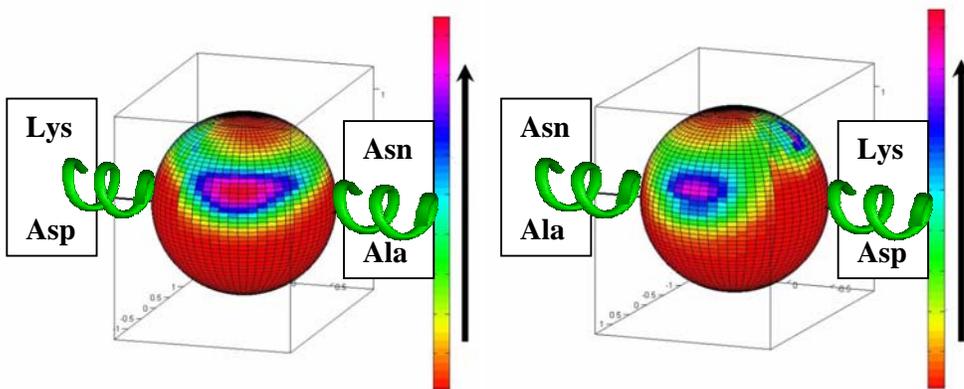


Abbildung 6.22. Wahrscheinlichkeitsverteilung des  $N-C_\alpha$  Vektors der Spinsonde an Position 44R1 für die neutrale Asparaginsäure. Die benachbarten Aminosäuren sind mit den üblichen Abkürzungen bezeichnet. Die Intensität steigt in der angezeigten Richtung. Die Kugel wird von beiden Seiten dargestellt.

Ein kleineres Maximum liegt über der Helix in Richtung des Lysins. Dieses kommt durch die elektrostatische Anziehung zwischen dem positiv geladenen Lysin und den negativen Partiaalladungen der Spinsonde zustande.

Auch, wenn sich die Spinsonde in den Maxima senkrecht zur Helix aufhält, kann wegen der Länge des Lysins ein kurzer Abstand zwischen der Ladung des Lysins und den Partiaalladungen der Spinsonde bestehen, der diese Positionen für die Spinsonde günstig

macht. Diese Positionen mit geringem Abstand sind hier für beide Positionen senkrecht zur Helix-Achse möglich, da sich auch das Lysin auf beiden Seiten der Helix aufhält. Das Maximum auf der Rückseite der Kugeloberfläche wird durch die attraktive Wechselwirkung stabilisiert und tritt mit einer höheren Wahrscheinlichkeit auf als zuvor beobachtet. Auf der dem Lysin abgewandten Richtung entlang der Helix-Achse existiert kein Maximum.

Vergleicht man die Verteilung mit der Spinsonde an 72R1, wo das ebenfalls positiv geladene Arginin vorhanden ist, so tritt an 72R1 nur ein Maximum auf der dem Arginin abgewandten Seite auf. Dies liegt daran, dass die sterische Repulsion des großen Arginin deutlich höher ist als im Fall von Lysin, welches über eine hohe konformelle Flexibilität verfügt, weshalb die Repulsion bei Arginin gegenüber der elektrostatischen Anziehung überwiegt.

### 6.3.2.2 Vergleich der Potentialflächen und ESR-Spektren

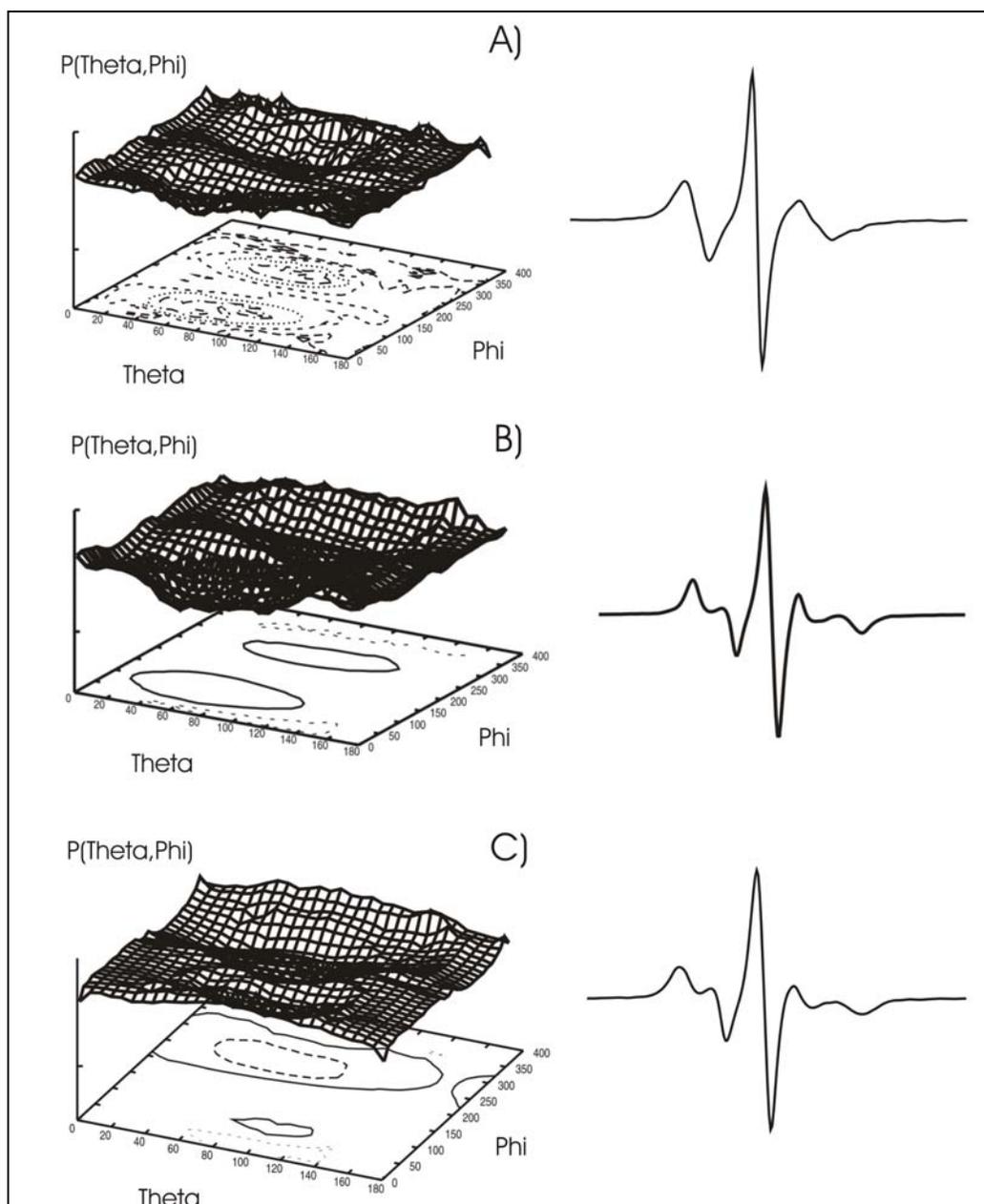
Um nun die Systeme anhand ihrer ESR-Spektren vergleichen zu können, wurden Potentialflächen aus der Wahrscheinlichkeitsverteilung der molekularen z-Achse für alle Systeme berechnet, die dann zur Simulation der Spektren verwendet wurden. Dabei wurde der Direktor jeweils ins Maximum der Verteilung gelegt, da die Minima der Potentialflächen auf der Kugeloberfläche gegenüberliegen. Durch die so mögliche Wahl von  $\beta_D = 0^\circ$  ist das Molekülkoordinatensystem mit dem Diffusionskoordinatensystem identisch und liefert daher direkt die Potentialfläche aus der Verteilung der molekularen z-Achse. Alle Spektren wurden für eine isotrope Diffusionskonstante berechnet, damit der Radius der Bewegung für die verschiedenen Systeme verglichen werden kann.

Die verschiedenen Potentialflächen und die zugehörigen ESR-Spektren sind in Abbildung 6.23 zu sehen.

Passend zu der breiten Verteilung des  $N-C_\alpha$  Vektors ergibt sich für Variante 44R1 mit beiden geladenen Aminosäuren auch eine sehr flache Potentialfläche der molekularen z-Achse und dementsprechend ein nur leicht anisotropes ESR-Spektrum (Abb. 6.23 A). Das System mit dem geladenen Lysin und der neutralen Asparaginsäure verfügt ebenfalls über eine relativ breite  $N-C_\alpha$  Verteilung, allerdings liegen die Hauptmaxima der Verteilung hier senkrecht zur Helix-Achse, weshalb sich in diesem System eine deutlich anisotropere Potentialfläche für die molekulare z-Achse ergibt, da sich die Spinsonde hier in einem tieferen Minimum der Potentialfläche ihrer Bewegung befindet. Das hat auch ein sehr anisotropes ESR-Spektrum zur Folge (Abb. 6.23 B). Für das System mit dem ungeladenen Lysin und der geladenen Asparaginsäure ergibt sich die größte Anisotropie in der  $N-C_\alpha$  Verteilung und in der Potentialfläche der molekularen z-Achse. Im zugehörigen ESR-Spektrum wird dies durch eine etwas größere spektrale Breite deutlich.

Abschließend lässt sich sagen, dass durch die elektrostatische Wechselwirkung der Partiaalladungen der Spinsonde mit zwei entgegengesetzt geladenen Aminosäuren auf der

gleichen Seite der Spinsonde eine Erhöhung der Dynamik der Spinsonde eintritt. Ist nur eine geladene Aminosäure vorhanden, so zeigt die Spinsonde ein sehr immobiles Verhalten, da hier die sterischen Restriktionen durch die benachbarten Aminosäuren gegenüber der elektrostatischen Wechselwirkung überwiegen. Wie Abbildung 6.23 zeigt, hat dies einen sehr deutlichen Einfluss auf die Form der ESR-Spektren, die von einem leicht anisotropen Spektrum in eine starke Anisotropie übergehen.



**Abbildung 6.23.** Potentialflächen der molekularen z-Achse und ESR-Spektren für folgende Systeme: A) Spinsonde an Position 44R1 mit geladenem Lysin und geladener Asparaginsäure; b) 44R1 mit geladenem Lysin und neutraler Asparaginsäure; C) 44R1 mit neutralem Lysin und geladener Asparaginsäure.

### 6.3.2.3 Der Einfluß von Ionen im Lösungsmittel

Um die elektrostatischen Wechselwirkungen als Ursache für eine Mobilisierung der Spinsonde zu untermauern, wurden nun Simulationen mit Ionen im Lösungsmittel durchgeführt, die eine abschirmende Wirkung auf elektrostatische Wechselwirkungen haben. Zu diesem Zweck wurden  $Na^+$  und  $Cl^-$ -Ionen in einer Konzentration von 225 mMol/l in das Lösungsmittel eingeführt. Die Wahrscheinlichkeitsverteilung des  $N-C_\alpha$  Vektors aus Hochtemperaturtrajektorien ist in Abbildung 6.24 dargestellt.

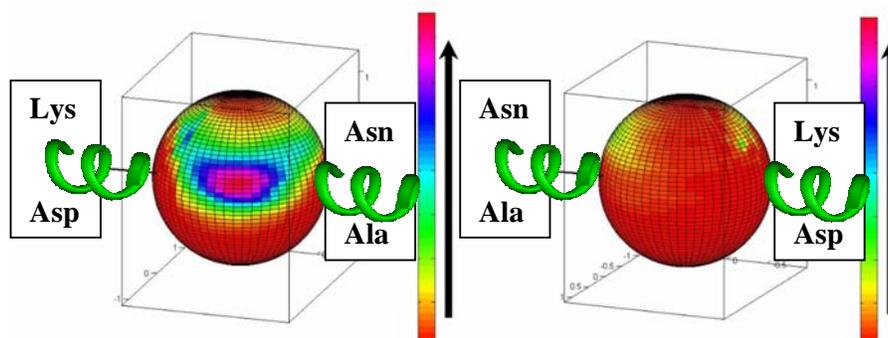


Abbildung 6.24. Wahrscheinlichkeitsverteilung des  $N-C_\alpha$  Vektors der Spinsonde an Position 44R1 für eine Ionenkonzentration von 225 mMol/l NaCl. Die benachbarten Aminosäuren sind mit den üblichen Abkürzungen bezeichnet. Die Intensität steigt in der angezeigten Richtung. Die Kugel wird von beiden Seiten dargestellt.

Die Spinsonde zeigt hier durch die Abschirmung der elektrostatischen Wechselwirkungen wieder ein sehr immobiles Verhalten. Die Potentialfläche der molekularen z-Achse und das zugehörige ESR-Spektrum werden in Abbildung 6.25 dargestellt. Beide sind unter den gleichen Voraussetzungen berechnet wie die Spektren im letzten Abschnitt.

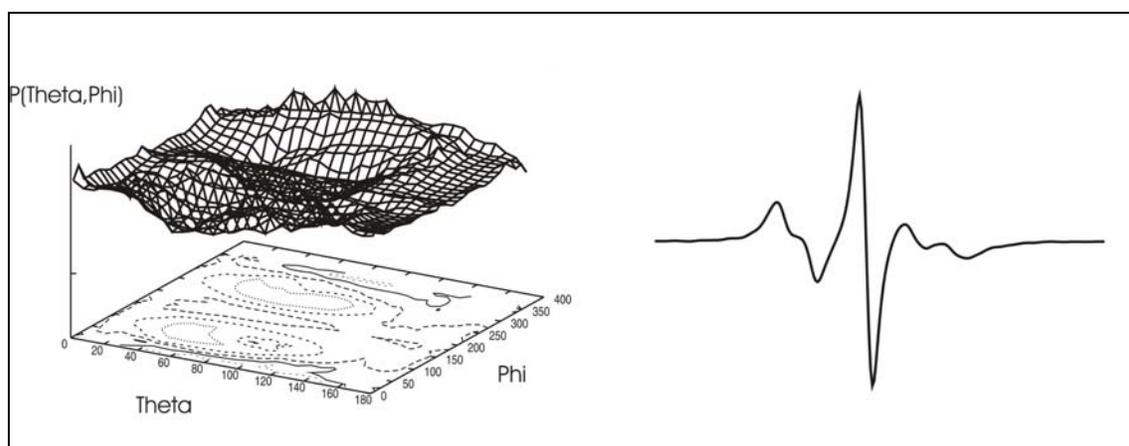


Abbildung 6.25. Potentialfläche der molekularen z-Achse und ESR-Spektrum für eine Ionenkonzentration im Lösungsmittel von 225 mMol/l NaCl.

Auch die Potentialfläche und das ESR-Spektrum der Spinsonde zeigen eine deutlich höhere Anisotropie als das System ohne Ionen im Lösungsmittel. Dies bestärkt die Vermutung, dass

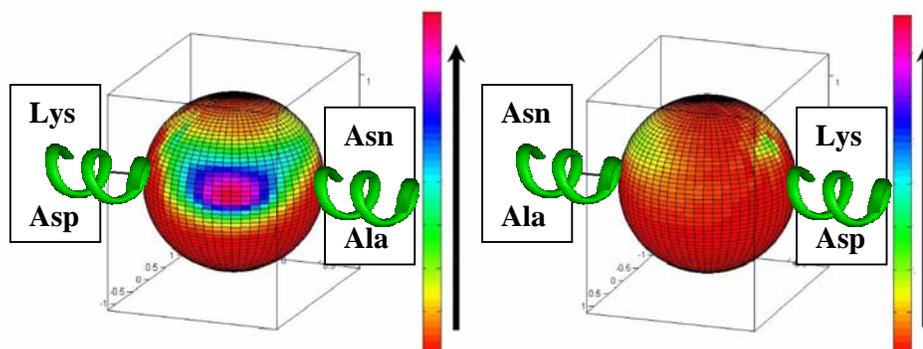
elektrostatische Wechselwirkungen mit den beiden geladenen Aminosäuren für eine Erhöhung der Mobilität verantwortlich sind.

### 6.3.2.4 Der Einfluss der Partiaalladungen der Spinsonde

Geht man davon aus, dass die Mobilisierung der Spinsonde durch elektrostatische Wechselwirkungen erfolgt, so muss auch die Größe der Partiaalladungen der Spinsonde einen Einfluß auf die Wahrscheinlichkeitsverteilung haben. Da die Partiaalladungen theoretisch nicht genau bestimmt werden können, soll diese Abhängigkeit hier überprüft werden. Dazu wurde eine Simulation durchgeführt, bei der die Partiaalladungen der Spinsonde halbiert wurden. Die Wahrscheinlichkeitsverteilung des  $N-C_\alpha$  Vektors aus Hochtemperaturtrajektorien ist in Abbildung 6.26 dargestellt.

Auch für diese Verringerung der elektrostatischen Wechselwirkungen ergibt sich ein sehr immobiles Verhalten der Spinsonde, es existiert nur ein einziges Maximum senkrecht zur Helix-Achse. Die Dynamik der Spinsonde wird hier wieder in erster Linie durch die starken sterischen Wechselwirkungen bestimmt. Die Potentialfläche der molekularen z-Achse und das zugehörige ESR-Spektrum sind in Abbildung 6.27 gegeben. Beide spiegeln die restriktive Dynamik der Spinsonde durch einen relativ hohen Grad von Anisotropie.

Anhand dieser Untersuchungen ist es anzunehmen, dass elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den Partiaalladungen der Spinsonde und geladenen Aminosäuren die Dynamik der Spinsonde und damit auch ihr ESR-Spektrum entscheidend beeinflussen können.



**Abbildung 6.26.** Wahrscheinlichkeitsverteilung des  $N-C_\alpha$  Vektors der Spinsonde an Position 44R1 für halbierte Partiaalladungen der Spinsonde. Die benachbarten Aminosäuren sind mit den üblichen Abkürzungen bezeichnet. Die Intensität steigt in der angezeigten Richtung. Die Kugel wird von beiden Seiten dargestellt.

Durch die Wechselwirkung der Spinsonde mit zwei entgegengesetzt geladenen Aminosäuren auf der gleichen Seite der Spinsonde tritt hier eine deutliche Mobilisierung auf, die die Anisotropie des ESR-Spektrums entscheidend verringert.

Da der Radius der Bewegung der Spinsonde durch die elektrostatische Wechselwirkung mit Lysin vergrößert wird, ist es von Interesse, die Abhängigkeit dieser Mobilisierung von der

Länge der geladenen Aminosäure zu untersuchen, da das positiv geladene Lysin aufgrund seiner im Vergleich zur Asparaginsäure größeren Länge scheinbar einen höheren Anteil an der Mobilisierung hat. Hierzu wurde eine Simulation durchgeführt, bei der die Länge von Lysin um die Hälfte verringert wurde. Auch in diesem Fall wurde die Dynamik der Spinsonde restriktiver. Die Reichweite der Aminosäure ist für diesen Effekt also ebenfalls von Bedeutung, da auf diese Weise günstige Positionen der Spinsonde mit geringem Abstand zu Lysin in einem großen Radius der Bewegung auftreten können, die ohne diese attraktive Wechselwirkung energetisch ungünstig für die Spinsonde wären. Hierdurch wird der Bewegungsradius der Spinsonde vergrößert. Eine Immobilisierung der Spinsonde durch die attraktive Wechselwirkung mit Lysin wird durch die Repulsion der negativ geladenen Asparaginsäure verhindert, die auf diese Weise ebenfalls zu einer hohen Dynamik der Spinsonde beiträgt. Zur korrekten Simulation der Dynamik der Spinsonde ist die richtige Wahl der Partialladungen von entscheidender Bedeutung, da eine Verringerung der Partialladungen ebenfalls zu einem immobilen Verhalten der Spinsonde führt. Da bei den beiden hier vorliegenden Datensätzen für die Partialladungen bereits die Variante mit den geringeren Ladungen gewählt wurde, kann davon ausgegangen werden, dass die Partialladungen in einem realistischen Rahmen liegen.

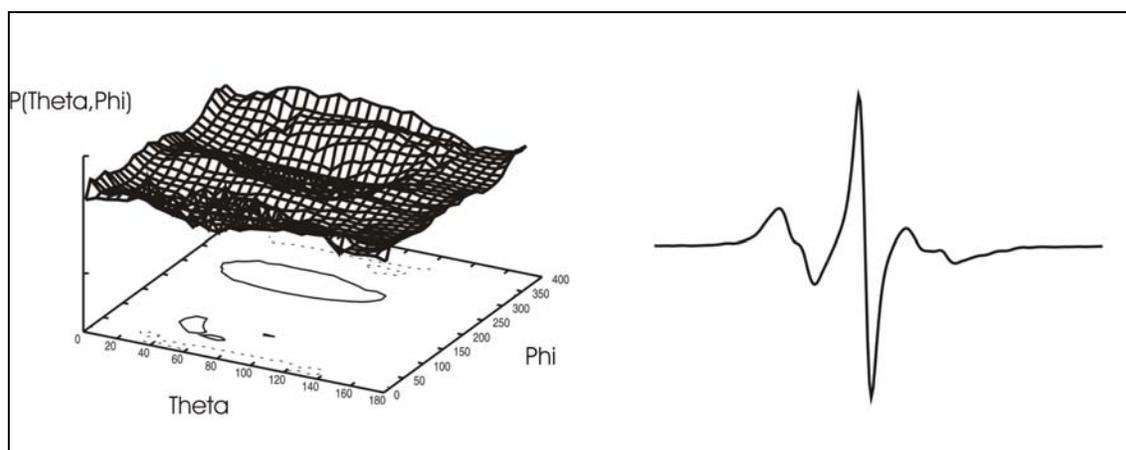
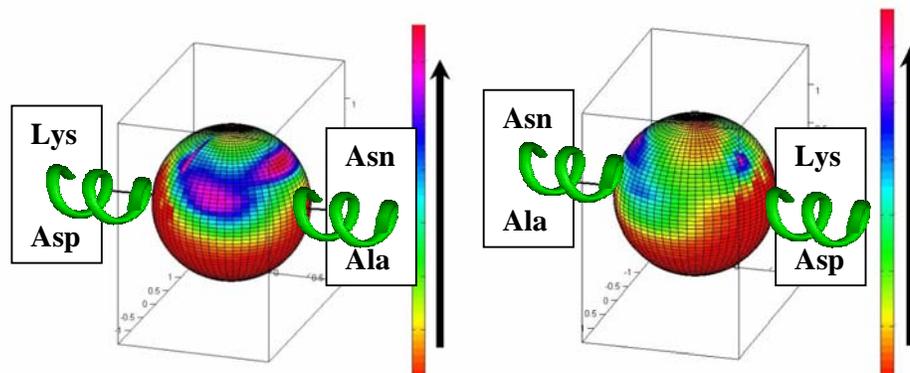


Abbildung 6.27. Potentialfläche der molekularen z-Achse und ESR-Spektrum der Spinsonde mit halbierten Partialladungen.

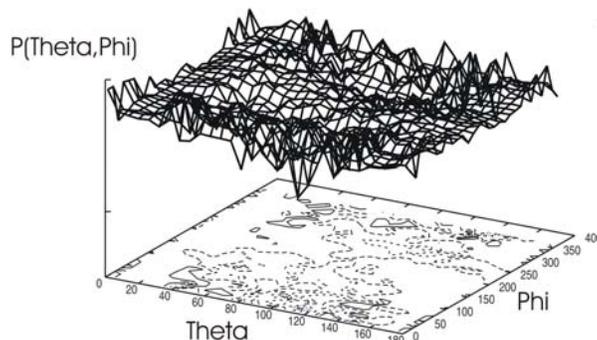
### 6.3.3 Die Wahrscheinlichkeitsverteilung der Spinsonde für $B=15 \text{ \AA}^2$

Der B-Faktor an Position 44R1 ist aufgrund einer deutlich kürzeren Helix größer als an den bisher untersuchten Positionen. Sein genauer Wert ist jedoch schwer abzuschätzen, da sich in den experimentellen Kristallstrukturdaten große Unterschiede ergeben. So variieren die B-Faktoren für diese Position in einem Bereich von  $B = 12 - 39 \text{ \AA}^2$  [71,84,91]

Für die Simulation eines ESR-Spektrum, welches die experimentellen Daten gut beschreibt, wurde die Wahrscheinlichkeitsverteilung der Spinsonde an Position 44R1 mit einem B-Faktor von  $B = 15 \text{ \AA}^2$  berechnet. Sie ist in Abbildung 6.28 gegeben.



**Abbildung 6.28.** Wahrscheinlichkeitsverteilung des  $N - C_{\alpha}$  Vektors der Spinsonde an Position 44R1 für  $B=15 \text{ \AA}^2$ . Die benachbarten Aminosäuren sind mit den üblichen Abkürzungen bezeichnet. Die Intensität steigt in der angezeigten Richtung. Die Kugel wird von beiden Seiten dargestellt.



**Abbildung 6.29.** Potentialfläche der molekularen z-Achse im Laborkoordinatensystem für die Spinsonde an Position 44R1 mit  $B=15 \text{ \AA}^2$ .

Durch die Erhöhung des B-Faktors tritt im Vergleich zu der Simulation mit  $B = 10 \text{ \AA}^2$  noch einmal eine deutliche Verbreiterung in der Verteilung auf. Diese führt zu einer annähernd isotropen Verteilung der molekularen z-Achse, wie aus der zugehörigen Potentialfläche in Abbildung 6.29 deutlich wird. Im Gegensatz zur Spinsonde an Position 72R1 ist der Radius der Bewegung an Position 44 bereits relativ groß, weshalb eine Erhöhung der B-Faktoren aufgrund der in diesem Bereich hohen Sensitivität einen erkennbaren Einfluß im ESR-Spektrum hat. Dabei trägt in erster Linie die vergrößerte Amplitude der Bewegung zur Änderung im ESR-Spektrum bei.

An Position 72 ist die Bewegung der Spinsonde im Gegensatz dazu aufgrund der starken sterischen Wechselwirkungen sehr eingeschränkt, daher verursacht eine entsprechende



600 K auf der Zeitskala der ESR-Spektroskopie unmöglich sind. Die Verteilungen für die beiden Isomere sind in den Abbildungen 6.30 und 6.31 dargestellt.

Zwischen den Wahrscheinlichkeitsverteilungen beider Isomere bestehen signifikante Unterschiede. Das Isomer mit  $\chi_3 = -90^\circ$  hat ein Maximum entlang der Helix-Achse und ein breiteres Maximum seitlich zur Helix. Für das Isomer mit  $\chi_3 = +90^\circ$  existiert nur ein Maximum senkrecht zur Helix-Achse.

Um die Dynamik der Isomere besser einordnen zu können, ist ein Vergleich mit der Wahrscheinlichkeitsverteilung für die Alanin-Helix sinnvoll, wo beide Isomere Zugang zu der Position über der Helix hatten. Die Wahrscheinlichkeit des Isomers mit  $\chi_3 = -90^\circ$  war in dieser Position wegen der höheren attraktiven van der Waals Wechselwirkung mit den Atomen des Rückgrats jedoch ausgeprägter. Im Fall der Alanin-Helix bestand wegen der geringen Größe des Alanins nur eine geringe sterische Wechselwirkung in der Position der Spinsonde entlang der Helix-Achse, weshalb diese Position für beide Isomere zugänglich war. Für die Spinsonde an Position 44R1 ist die sterische Wechselwirkung größer, da hier neben Alanin auch das etwas größere Asparagin vorhanden ist. Diese Erhöhung der sterischen Wechselwirkung ist ausreichend, um diese Population für das Isomer mit  $\chi_3 = +90^\circ$  zu unterdrücken, da in diesem Fall aufgrund des größeren Abstandes zum Rückgrat nur geringe attraktive van der Waals Wechselwirkungen mit den Atomen des Rückgrats auftreten. Dies führt zu einer Verteilung des Isomers, deren Wahrscheinlichkeit fast vollständig senkrecht zur Helix-Achse liegt. Im Fall des Isomers mit  $\chi_3 = -90^\circ$ , für das die attraktiven Wechselwirkungen mit den Atomen des Rückgrats deutlich höher sind, ist die Erhöhung der sterischen Wechselwirkung im Vergleich zur Alanin-Helix nicht groß genug, um den Zugang des Isomers zu der Position entlang der Helix-Achse zu verhindern. Dieses Isomer hat daher ein Maximum entlang der Helix-Achse, da diese Position energetisch immer noch günstig ist.

### 6.3.5 Berechnung des ESR-Spektrums für die Spinsonde an 44R1

Die Diffusionskonstanten beider Isomere wurden aus MD-Trajektorien einer Temperatur von 300K berechnet, bei der ein Übergang zwischen den Isomeren statistisch gesehen auf der Zeitskala der ESR-Spektroskopie sehr unwahrscheinlich ist. In der Tat fand auch in keiner dieser Trajektorien ein solcher Übergang statt, weshalb es möglich ist, die Diffusionskonstanten der Isomere separat zu untersuchen und zur Berechnung von separaten ESR-Spektren für beide Isomere zu verwenden, die dann später zu einem Gesamtspektrum addiert werden können, da experimentell in Lösungsmittelspektren stets beide Isomere vorliegen.

	B=2.3 Å <sup>2</sup>	B=20 Å <sup>2</sup>
$\chi_3 = -90^\circ$	$1.4 * 10^8 s^{-1}$	$3.3 * 10^8 s^{-1}$
$\chi_3 = +90^\circ$	$5.4 * 10^7 s^{-1}$	$1.0 * 10^8 s^{-1}$

**Tabelle 6.1. Diffusionskonstanten der beiden Isomere für niedrige und hohe B-Faktoren.**

Tabelle 6.1 zeigt die Diffusionskonstante für beide Isomere jeweils für niedrige und hohe B-Faktoren.

Für beide B-Faktoren sind die Diffusionskonstanten des Isomers mit  $\chi_3 = -90^\circ$  wesentlich höher. Dies kommt daher, dass sich dieses Isomer in der Position entlang der Helix-Achse aufhält und sich daher wegen der hier höheren Wechselwirkung mit den Atomen des Rückgrats in einem flacheren Minimum der Potentialfläche seiner Bewegung befindet, was sich in einer höheren Diffusionskonstante äußert. Für das Isomer mit  $\chi_3 = +90^\circ$ , welches sich fast ausschließlich senkrecht zur Helix-Achse aufhält, ist die Wechselwirkung mit der Helix deutlich geringer und damit das Minimum tiefer, was zu einer niedrigeren Diffusionskonstante führt. Im Vergleich zur Alanin-Helix für einen B-Faktor von  $B=2.3 \text{ \AA}^2$  ist die Diffusionskonstante des schnelleren Isomers mit der Diffusionskonstante beider Isomere an der Alanin-Helix im Rahmen des Fehlerbereiches identisch. Das Isomer mit  $\chi_3 = +90^\circ$  hat an Position 44 aufgrund seiner Ausrichtung senkrecht zur Helix-Achse eine deutlich niedrigere Diffusionskonstante als im Fall der Alanin-Helix.

Die ESR-Spektren für beide Isomere wurden mit Hilfe einer Diffusionskonstante für einen B-Faktor von  $B = 15 \text{ \AA}^2$  berechnet, welche aus den zuvor gezeigten Daten durch lineare Interpolation gewonnen wurde, da auch die Potentialfläche für diesen B-Faktor berechnet wurde. Dieser B-Faktor wurde verwendet, da er die beste Übereinstimmung des ESR-Spektrums mit den experimentellen Daten liefert. Vergleicht man außerdem die Bereiche, in denen die experimentellen Werte der B-Faktoren liegen, mit den anderen Mutanten, so beträgt die Differenz zwischen den unteren Grenzen zu den anderen Mutanten gerade  $\Delta B = 5 \text{ \AA}^2$ , was auch der hier gewählten Differenz der B-Faktoren entspricht.

Beide Spektren wurden dann im Verhältnis 1:1 addiert, da die Wahrscheinlichkeit des Auftretens beider Isomere in den Hochtemperaturrechnungen identisch war. Das so entstehende ESR-Spektrum aus beiden Komponenten der Dynamik ist in Abbildung 6.32 gegeben.

Beide Komponenten der Dynamik sind im ESR-Spektrum deutlich zu erkennen und liefern eine gute Darstellung der experimentellen Daten. Die Abweichungen in der Intensität, die auch in diesem Spektrum auftreten, liegen im Rahmen dessen, was man aufgrund der verwandten Näherungslösungen erwarten kann. Die Form des Spektrums reflektiert die isotrope Winkelverteilung der molekularen z-Achse für diese Position der Spinsonde im Modellsystem.

Die zuvor gezeigten Spektren der Spinsonde an verschiedenen Positionen im Protein machen deutlich, dass die zwei Komponenten der Bewegung, die in manchen ESR-Spektren auftreten, durch eine unterschiedliche Dynamik der beiden Disulfid-Isomere entstehen. Diese unterschiedliche Dynamik wurde hier in Form der Population von verschiedenen Maxima in der Wahrscheinlichkeitsverteilung des  $N - C_\alpha$  Vektors beobachtet. Wie sich auch schon in den zuvor betrachteten Systemen abgezeichnet hat, weist die Spinsonde in der Position über der Helix eine größere Dynamik auf als senkrecht zur Helix-Achse.

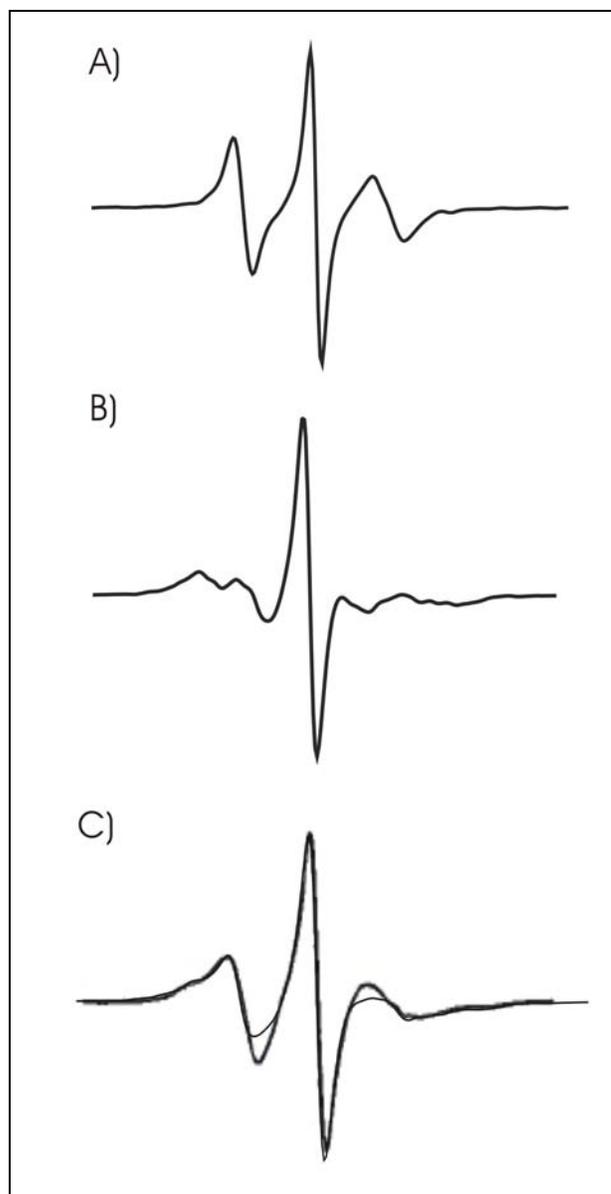


Abbildung 6.32. a) ESR-Spektrum des Isomers mit  $\chi_3 = -90^\circ$ ; b) ESR-Spektrum des Isomers mit  $\chi_3 = +90^\circ$ ; c) Summe der ESR-Spektren der beiden Disulfid-Isomere für die Spinsonde an Position 44R1. Die Scanbreite der experimentellen Daten beträgt 98G, die Feldmodulationsamplitude 1G. Die angepasste Linienbreite betrug  $T_2^{-1} = 5G$ .

Nehmen also beide Disulfid-Isomere verschiedene Positionen ein, so kann der Unterschied in der Rotationsdynamik der Isomere im ESR-Spektrum beobachtet werden.

Das Auftreten dieser unterschiedlichen Dynamik ist dabei von den sterischen und elektrostatischen Wechselwirkungen der Spinsonde mit den benachbarten Aminosäuren sowie der Dynamik der Helix abhängig. Als Bedingung für zwei Komponenten der Dynamik ist zuerst eine relativ hohe Mobilität der Spinsonde zu nennen, d.h. der Radius der Bewegung darf nicht durch starke sterische oder elektrostatische Wechselwirkungen mit den benachbarten Aminosäuren so eingeschränkt sein, dass trotz verschiedener Wechselwirkung der Isomere mit den Atomen des Rückgrats kein unterschiedliches Verhalten für beide Isomere möglich ist, wie es in den Varianten 72R1 und 65R1 der Fall war.

Die den Radius der Bewegung der Spinsonde einschränkenden Wechselwirkungen müssen also gering sein, oder die Spinsonde muss durch einen relativ hohen B-Faktor und/oder elektrostatische Wechselwirkungen mit geladenen Aminosäuren mobilisiert werden, wie in Variante 44R1. Die Dynamik bzw. der B-Faktor der Helix darf aber auch nicht zu hoch sein, da ansonsten beide Disulfid-Isomere bereits so mobil sind, dass ihre Unterschiede in der Dynamik im ESR-Spektrum nicht mehr wahrgenommen werden können. Dies ist z.B. für Variante 44R1 mit einem B-Faktor von  $B = 20 \text{ \AA}^2$  der Fall, hier sind die Spektren beide Isomere bereits so ähnlich, dass beide Komponenten im ESR-Spektrum nicht unterschieden werden können.

Außerdem muß die Position entlang der Helix-Achse für eines der Isomere zugänglich sein, die sterischen Wechselwirkungen mit den benachbarten Aminosäuren müssen also auf dieser Seite relativ gering sein.

Das Auftreten von zwei-Komponenten-Spektren ist demnach nur dann zu erwarten, wenn die beiden Disulfid-Isomere unterschiedliche Orientierungen relativ zur Helix einnehmen. Die hier vorgestellten Untersuchungen zeigen, dass dies nur unter ganz bestimmten Voraussetzungen erfüllt werden kann, bei denen die repulsiven bzw. attraktiven Wechselwirkungen mit umliegenden Aminosäuren die unterschiedliche Stabilität der verschiedenen Disulfidkonformationen gerade soweit stören, dass ein Disulfidkonformer die Position über der Helix-Achse nicht mehr populieren kann. Da dies eine empfindliche Balance darstellt, die nur in einem engen Bereich des Parameterraums erfüllt zu sein scheint, zeigt die Mehrzahl der experimentellen Spektren keinen Hinweis auf zwei Komponenten der Dynamik.