

Kapitel 7

Adsorption des Proteins auf Oberflächen – winkelabhängige ESR-Spektren

Die Wechselwirkung von Proteinen mit Oberflächen ist in vielen biologischen Fragestellungen von großer Bedeutung [99,100]. Sie spielt eine entscheidende Rolle in grundlegenden Funktionsweisen von Membranen und anderen zellphysiologischen Mechanismen.

Ein wesentlicher Aspekt, der neben der biophysikalischen Bedeutung auch eine große Rolle in technischen Applikationen im Bereich der Biosensorik spielt, ist die strukturelle Antwort von Proteinen bei Adsorption auf Oberflächen. Hierzu gehören Fragen nach strukturellen Veränderungen ebenso wie die Frage nach Konformationen des Adsorptionskomplexes, der Orientierung verschiedener Sekundärstrukturelemente relativ zur Oberfläche und eine Vielzahl anderer Fragestellungen. Site-Directed Spin Labeling stellt für die Analyse dieser Fragestellungen ein geeignetes Werkzeug dar, was sich in der großen Anzahl von Untersuchungen in diesem Bereich widerspiegelt [87,88,96]. Betrachten man anstelle eines isotropen Systems planare Oberflächen, so kann man die tensorielle Natur der Wechselwirkungen des ungepaarten Elektrons dazu nutzen, Orientierungsinformationen durch die Analyse winkelabhängiger Spektren zu gewinnen [19].

Um die Orientierung des Proteins zu bestimmen, müssen die einzelnen Proteinsegmente mit einem Spinmarker versehen werden. Aus der Analyse der Linienform der winkelabhängigen ESR-Spektren lassen sich dann die Orientierungen der einzelnen Segmente relativ zur Oberfläche bestimmen und zur Gesamt-Orientierung des Proteins zusammensetzen.

Die für dieses Verfahren notwendige Form der Linienanalyse der ESR-Spektren wurde mit Hilfe des Freed'schen Algorithmus bereits erfolgreich durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden winkelabhängige ESR-Spektren des auf einer planaren, neutralen Doppellipidschicht adsorbierten T4 Lysozyms mit einer Spinsonde an verschiedenen Positionen simuliert, für die experimentelle Daten bereits vorliegen [19].

Im folgenden soll nun geklärt werden, ob der hier verwandte Ansatz von Steinhoff und Hubbell ebenso erfolgreich für dieses Verfahren eingesetzt werden kann.

Dafür wurden winkelabhängige Spektren des T4 Lysozyms mit einer Spinsonde an Position 72R1 simuliert, für die experimentelle Daten sowie eine Simulation mit dem Freed'schen Programm in der Literatur vorhanden sind [19]. Für die Simulation werden die für diese Position der Spinsonde bereits gewonnenen Daten aus den Simulationen der molekularen Dynamik verwendet. Voraussetzung für die Verwendung dieser Daten in der Simulation ist die Tatsache, dass die Sekundär- und Tertiärstruktur des Proteins nach Adsorption auf der Lipidoberfläche erhalten bleiben, was bereits gezeigt wurde [19].

Da es sich hier nicht mehr um ein ESR-Spektrum des Proteins im Lösungsmittel handelt, ist nur eine eingeschränkte räumliche Mittelung der Orientierung des Proteins notwendig. Aus den experimentellen Daten geht hervor, dass sich das T4 Lysozym in einer Vorzugsorientierung auf der Oberfläche befindet, da die experimentellen Spektren mit dem Winkel zwischen Oberflächennormale und Magnetfeld variieren. Das der Simulation der ESR-Spektren zugrunde liegende Modell ist in Abbildung 7.1 gezeigt. Das Direktorkoordinatensystem im Protein nimmt einen bestimmten Polarwinkel ζ zur Oberflächennormale ein, die Gesamtheit der Proteine auf der Lipidoberfläche ist jedoch bezüglich der Oberflächennormale rotationssymmetrisch angeordnet, die Trajektorien der Magnetisierung müssen also über den Polarwinkel ϕ integriert werden.

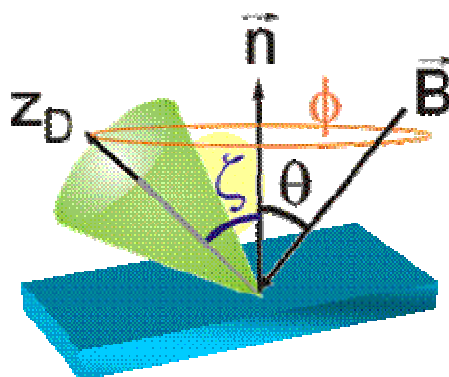


Abbildung 7.1. Orientierung des Direktorkoordinatensystems relativ zur Oberflächennormale mit den Polarwinkeln ζ und φ . θ beschreibt den Winkel zwischen der Oberflächennormale und dem äußeren Magnetfeld. Adaptiert aus [19].

Eine Abweichung von der exakten Orientierung für ζ wird in Form einer Gaußfunktion um ζ mit einer Standardabweichung σ berücksichtigt. Der Winkel zwischen der Oberflächennormale und dem Magnetfeld ist mit θ bezeichnet und ist für den Satz vorhandener Spektren durch die experimentellen Bedingungen festgelegt.

Der Polarwinkel ζ für die Orientierung des Proteins auf der Oberfläche wird den experimentellen Daten bzw. deren Linienformanalyse entnommen und beträgt für die Spinsonde an Position 72R1 des T4 Lysozyms auf einer planaren Doppellipidschicht $(50 \pm 5)^\circ$ mit einer Standardabweichung der Gaußfunktion von 15° [19].

Die ESR-Spektren wurden entsprechend den experimentellen Daten für Winkel zwischen der Oberflächennormale und der Orientierung des Magnetfeldes von 0° , 15° , 45° , 60° und 90° berechnet und mit den experimentellen Spektren sowie der Simulation mit Hilfe des Freed'schen Programms verglichen. Sie sind in Abbildung 7.2 dargestellt.

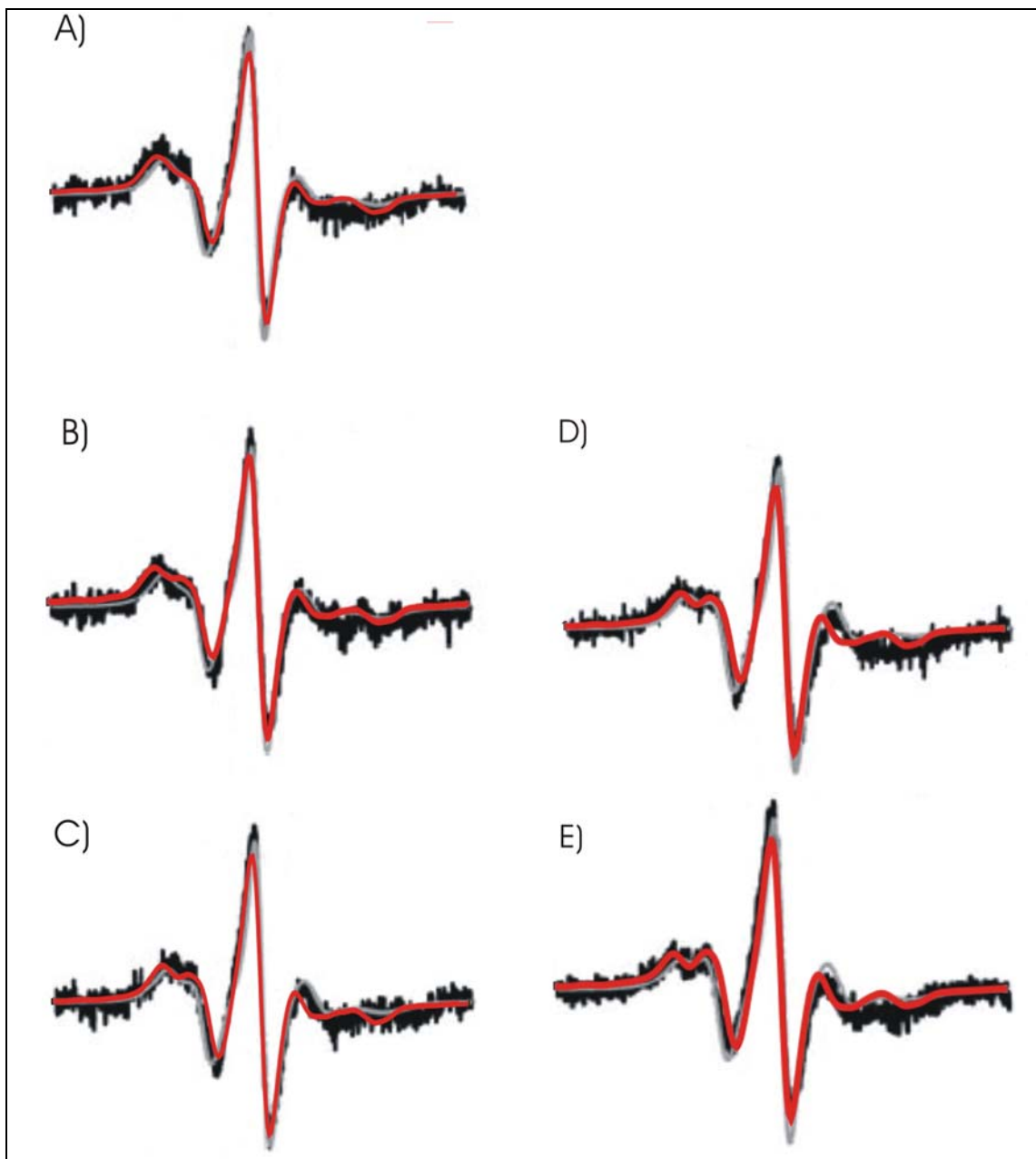


Abbildung 7.2. Winkelabhängige ESR-Spektren (schwarz – experimentelle Daten [19]; grau – Simulation mit dem Freed'schen Programm [19]; rot – Simulation mit dem hier verwendeten Ansatz) für Winkel zwischen der Oberflächennormale und dem Magnetfeld von a) 0° , b) 15° , c) 45° , d) 60° und e) 90° .

Aufgrund der Anisotropie der Wahrscheinlichkeitsverteilung der molekularen z-Achse für die Spinsonde an Position 72R1 ändert sich das ESR-Spektrum in Abhängigkeit des Winkel zwischen Oberflächennormale und Magnetfeld. Da die Verteilung der Direktororientierung

auf der Oberfläche jedoch in diesem Fall relativ breit ist, fällt diese Änderung des Spektrums verhältnismäßig gering aus.

Aus dem Vergleich der verschiedenen Spektren wird deutlich, dass die Qualität der Simulation mit Hilfe des Freed'schen Programms sowie des hier verwendeten Ansatzes nach Steinhoff und Hubbell im Vergleich zu den experimentellen Daten vergleichbar ist. Die relativen Intensitäten werden mit dem hier verwandten Ansatz sogar teilweise besser dargestellt. An dieser Stelle muß allerdings darauf hingewiesen werden, dass sich das Lösungsmittelspektrum mit dem Freed'schen Programm für diese Position besser darstellen lässt. Daher muss man in diesem Fall von gewissen Kompensationseffekten ausgehen. Dennoch zeigt diese Betrachtung, dass sich der Ansatz von Steinhoff und Hubbell ebenso wie das Freed'sche Programm gut zur Simulation winkelabhängiger ESR-Spektren von Proteinen auf Oberflächen eignet. Allerdings hat man mit diesem Ansatz zusätzlich die Möglichkeit, Einblicke in die molekulare Dynamik der Spinsonde zu erhalten.