

Kapitel 8

Zusammenfassung

Eine grundlegende Analyse experimenteller ESR-Spektren setzt ein detailliertes Verständnis der molekularen Dynamik von Spinsonden in der Proteinumgebung voraus. In dieser Arbeit wurde der Zusammenhang zwischen dem dynamischen Verhalten einer der am häufigsten zum Einsatz kommenden Spinsonde, MTSSL, und der Wechselwirkung mit der molekularen Umgebung untersucht, um ein besseres Verständnis experimenteller ESR-Spektren zu ermöglichen. Zu diesem Zweck wurde die molekulare Dynamik der Spinsonde in einem dem T4 Lysozym entnommenen Modellsystem mit Hilfe einer Kombination aus MD- und BD-Simulationen analysiert. Das hierfür benötigte Kraftfeld der Spinsonde wurde aus ab initio Rechnungen gewonnen und bietet eine gute Darstellung der internen Dynamik der Spinsonde, da sich die experimentellen ESR-Spektren mit Hilfe der verwandten Parametrisierungen reproduzieren lassen.

Mit Hilfe der Charakterisierung der Wechselwirkung der Spinsonde mit dem Rückgrat einer α -Helix konnte gezeigt werden, dass die sterische Wechselwirkung mit den Atomen des Rückgrats eine deutlich ausgeprägte Anisotropie im Radius der Bewegung der Spinsonde zur Folge hat. Außerdem wurde deutlich, dass die Mobilität der Spinsonde entscheidend von der Dynamik der α -Helix abhängt, an welche die Spinsonde gebunden ist, und der B-Faktor der Helix daher einen grundlegenden Einfluß auf das ESR-Spektrum hat.

Anhand dieses Systems wurden ebenso die unterschiedlichen Wechselwirkungen der beiden Disulfid-Isomere der Spinsonde mit den Atomen des Rückgrats offengelegt, da die unterschiedlichen Konformationen der Isomere zu verschiedenen van der Waals-Wechselwirkungen führen, welche die Wahrscheinlichkeitsverteilungen der Isomere beeinflussen. Den beiden Disulfid-Isomeren konnten dabei eindeutige Kombinationen der Diederwinkel (χ_1, χ_2) zugeordnet werden, die mit bereits bekannten Konformationen aus Kristallstrukturen übereinstimmen.

Die genaue Analyse experimenteller Spektren wurde durch das hier verwandte Modellsystem ermöglicht, das neben den Wechselwirkungen mit den Atomen des Rückgrats einer α -Helix und deren Dynamik auch die Einflüsse der benachbarten Aminosäuren der Spinsonde im

Protein mit einbezieht. Hierfür wurden verschiedene Systeme mit unterschiedlichen sterischen und elektrostatischen Wechselwirkungen der Spinsonde mit den Aminosäuren in ihrer Umgebung betrachtet. Aus der Analyse der Dynamik wurde deutlich, dass sehr große Aminosäuren in der Proteinumgebung (z.B. Arginin) den Bewegungsradius der molekularen z-Achse der Spinsonde stark einschränken, was zu sehr anisotropen ESR-Spektren führt. Ersetzt man Arginin durch eine kleinere Aminosäure, so führt dies zu einem mobileren Verhalten der Spinsonde, welches auch anhand einer geringeren spektralen Breite im ESR-Spektrum sichtbar wird.

Eine Wechselwirkung der Partialladungen der Spinsonde mit einer geladenen Aminosäure in der molekularen Umgebung hatte in den hier durchgeführten Simulationen keinen merklichen Einfluß auf die Mobilität der Spinsonde, da die sterische Repulsion die elektrostatische Anziehung überwog. Waren jedoch zwei geladene Aminosäuren in der Umgebung der Spinsonde vorhanden, so wurde durch die starke elektrostatische Wechselwirkung die Wahrscheinlichkeitsverteilung der Spinsonde erheblich beeinflusst, was in beiden hier untersuchten Systemen zu einer erhöhten Mobilität der Spinsonde und daraus folgend zu einem isotroperen ESR-Spektrum führte. Die elektrostatische Wechselwirkung als Ursache für die Mobilisierung der Spinsonde konnte mit Hilfe von Simulationen mit neutralen Aminosäuren, reduzierten Partialladungen der Spinsonde und der Einführung von Ionen in das Lösungsmittel zur Abschirmung der Elektrostatik bewiesen werden.

Ein wichtiges Problem in der Simulation experimenteller Spektren ist die richtige Wahl der Direktororientierung. Anhand der hier durchgeführten Simulationen war es möglich, aus den Wahrscheinlichkeitsverteilungen der molekularen z-Achse eine Strategie zur Wahl des Direktorkoordinatensystems aufzuzeigen, die zu einer zufriedenstellenden Simulation der experimentellen Daten führte. So wurde die Direktororientierung als Maximum der Verteilung gewählt, wenn in diesem Fall beide Maxima der Wahrscheinlichkeitsverteilung gut von der Direktorachse erfasst wurden. Das Diffusionskoordinatensystem wurde hier mit dem Molekülkoordinatensystem gleichgesetzt. Wurden beide Maxima mit dieser Definition der Direktorachse nicht gut beschrieben, wurde die Direktorachse als Mittelwert der Verteilung definiert. Der Winkel zwischen dem Diffusionskoordinatensystem und dem Molekülkoordinatensystem wurde in diesem Fall als Winkel zwischen der Direktororientierung und dem Maximum der Verteilung definiert. Mit Hilfe dieser Strategie ließen sich alle experimentellen ESR-Spektren der hier betrachteten Systeme zufriedenstellend simulieren.

Die untersuchten Positionen der Spinsonde im Protein gestatteten außerdem eine Untersuchung des Auftretens von zwei Komponenten der Dynamik in experimentellen ESR-Spektren. Die Vermutung, dass diese Komponenten aus einer unterschiedlichen Dynamik der beiden Disulfid-Isomere der Spinsonde resultieren, konnte anhand der betrachteten Systeme

untermauert werden. Darüber hinaus konnte die Tatsache erklärt werden, dass das Auftreten von zwei-Komponenten-Spektren nur an gewissen Positionen der Spinsonde im Protein stattfindet. Für das Auftreten solcher Spektren ist eine unterschiedliche Dynamik der Disulfid-Isomere notwendig, die in Systemen, in denen die Dynamik der Spinsonde sehr stark von den restriktiven Einflüssen der Umgebung bestimmt wird, nicht auftritt. Nur in molekularen Systemen mit geringen Restriktionen oder einer Mobilisierung der Spinsonde durch elektrostatische Wechselwirkungen oder eine erhöhte Dynamik der Helix ist eine unterschiedliche Dynamik für beide Isomere möglich. Dabei liegt das Maximum der Wahrscheinlichkeitsverteilung für das dynamischere Isomer entlang der Helix-Achse. Durch die Wechselwirkung mit den Atomen des Rückgrats befindet in dieser Position ein flacheres Minimum in der Potentialfläche der Bewegung der Spinsonde, was sich in einer erhöhten Dynamik der Spinsonde äußert. Das andere Isomer hält sich im Gegensatz hierzu bevorzugt seitlich zur Helix auf. In dieser Position ist die Wechselwirkung mit der Helix gering, das Isomer weist eine deutlich langsamere Dynamik auf. Die Dynamik des Rückgrats der Helix darf allerdings auch nicht zu hoch sein, da ansonsten beide Isomere bereits so mobil sind, dass ihre Dynamik im ESR-Spektrum nicht mehr unterschieden werden kann.

Auch die Analyse von winkelabhängigen ESR-Spektren war mit Hilfe der hier verwendeten Methoden möglich. Die Änderung der ESR-Spektren mit der Orientierung relativ zur äußeren Magnetfeld kommt dabei durch die Anisotropie der Bewegung der Spinsonde zustande und konnte mit den zuvor durchgeführten Simulationen charakterisiert werden. Die hier verwandte Methode kann also ebenso wie das Freed'sche Programm durch Simulation experimenteller Spektren zur Bestimmung der Orientierung von Proteinsegmenten auf Oberflächen genutzt werden, macht jedoch gleichzeitig eine explizite Charakterisierung der molekularen Dynamik der Spinsonde in der Proteinumgebung möglich. Dieses Verfahren gestattet eine Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Oberflächen, die in der medizinischen Erforschung mancher Krankheiten (z. B. Alzheimer) von großer Bedeutung ist.

Zukünftige Untersuchungen könnten eine bessere Charakterisierung der Direktorproblematik umfassen, für die in der vorliegenden Arbeit zwar ein „Kochrezept“ angegeben werden konnte, jedoch eine zufriedenstellende Lösung aufgrund der Betrachtung von nur einigen Mutanten nicht möglich war. Hierzu könnte die Berechnung von Potentialflächen der z-Achse des Diffusionskoordinatensystems für verschiedene Werte von β_D auf numerischem Wege erfolgen, bis die beste Übereinstimmung für die Bewegung der molekularen z-Achse mit der Potentialfläche aus den MD-Trajektorien vorliegt. Da allerdings hierfür bisher aufgrund eines unterbestimmten Systems keine eindeutige Zuordnung von β_D möglich ist, könnten für eine exaktere Beschreibung der molekularen Dynamik zusätzlich Potentialflächen für die

molekularen x- und y-Achsen eingeführt werden, welche weitere Informationen für die Anpassung der Fitparameter liefern würden.