

Friedrich-Schiller-Universität Jena
Physikalisch-Astronomische Fakultät
Studiengang Physik

**Charakterisierung der Dynamik eines Proteins und einer viralen RNA
mittels NMR-Spektroskopie und Molekulardynamik-Simulation**

Diplomarbeit

vorgelegt von Aliaksandr Marchanka
Jena, den 13. Dezember 2005

**Angefertigt unter der Anleitung von Dr. O. Ohlenschläger
in der Arbeitsgruppe Molekulare Biophysik/NMR-Spektroskopie
am Fritz-Lipmann-Institut e.V. Jena**

Gutachter: Dr. O. Ohlenschläger
Prof. Dr. E. Förster

Danksagung

Diese Diplomarbeit wurde in der Arbeitsgruppe Molekulare Biophysik/NMR-Spektroskopie des Fritz-Lipmann-Instituts e.V. (vormals Institut für Molekulare Biotechnologie Jena e.V.) durchgeführt. Hiermit möchte ich mich ganz herzlich bei den Personen bedanken, die zur Entstehung dieser Arbeit wesentlich beigetragen haben:

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Oliver Ohlenschläger, meinen Hauptgutachter und Betreuer, der an mich dieses sehr interessante Thema vergeben hatte und mich während meiner Diplomarbeit in allen Fragen betreut hat. Ich bedanke mich ganz herzlich für seine riesige Unterstützung.

Bei Prof. Dr. Eckhart Förster und Priv.-Doz. Dr. Jürgen R. Reichenbach möchte ich mich für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Dr. Matthias Görlach danke ich für seine wertvollen Ideen und Anregungen rund um meine Diplomarbeit und perfekte Organisation unseres „Laborlebens“.

Für seine große Unterstützung, insbesondere bei der Aufnahme und Auswertung von NMR-Spektren und seine Hilfe in rund um NMR-Fragen möchte ich Dr. Ramadurai Ramachandran ganz herzlich danken.

Für die Herstellung der E7-Proben bedanke ich mich ganz herzlich bei Thomas Seiboth.

Yvonne Ihle möchte ich für die Überlassung der 18mer RNA-Proben danken sowie für ihre Unterstützung bei der Auswertung der NMR-Spektren.

Prof. Dr. David Fushman möchte ich für wertvolle Information rund um NMR-Relaxation und für seine Programme zur Relaxationsanalyse bedanken.

Für ihre Hilfe in Computerfragen bedanke ich mich bei Georg Peiter und Friedrich Haubensak.

Allen Mitarbeitern der NMR-Spektroskopie sei noch einmal für ihre kontinuierliche Unterstützung und für das freundliche Arbeitsklima gedankt.

Für das gewissenhafte Korrekturlesen dieser Arbeit bedanke ich mich ganz herzlich bei Dr. Oliver Ohlenschläger und Dr. Matthias Görlach.

Mein ganz besonders herzlicher Dank gilt meinen Eltern, die mich während meines Studiums immer unterstützt haben.

Inhalt

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Onkoprotein E7	3
1.2 18mer RNA (BEVSLD)	6
2. Grundlagen	8
2.1 NMR-Spektroskopie	8
2.1.1 Kerne im Magnetfeld	8
2.1.2 Grundlagen der NMR-Spektroskopie	9
2.1.3 Grundlagen der Fourier-Transformations-Spektroskopie	11
2.1.4 Mehrdimensionale NMR-Spektroskopie	12
2.1.5 Der NOE-Effekt	16
2.1.6 Biomoleküldynamik und ihre Untersuchung mittels NMR	17
2.1.7 Zusammenhang zwischen Relaxationsdaten und mikrodynamischen Parametern	20
2.1.8 Dynamikanalyse	22
2.1.9 Quantenmechanische Beschreibung	23
2.2 Simulation der Molekulardynamik	25
2.2.1 Struktur von Kraftfeldern	25
2.2.2 Algorithmen von Energieminimierung und Äquilibration	26
2.2.3 Informationen aus der MD-Simulation	28
3. Experimenteller Teil	32
3.1 NMR-Messungen	32
3.1.1 Probenvorbereitung	32
3.1.2 NMR-Spektroskopie/Relaxationsmessungen	32
3.1.3 Datenanalyse	34
3.2 MD-Simulation	35
3.2.1 Onkoprotein E7	35
3.2.2 BEVSLD	36
4. Ergebnisse	38
4.1 NMR-Spektroskopie	38
4.1.1 Onkoprotein E7	38
4.1.2 BEVSLD	46
4.2 MD-Simulation	54

4.2.1 Onkoprotein E7	54
4.2.2 BEVSLD	65
5. Diskussion	73
5.1 Onkoprotein E7	73
5.2 BEVSLD	76
5.3 Onkoprotein E7 vs. BEVSLD	79
6. Zusammenfassung	81
Literaturverzeichnis	83

Abkürzungsverzeichnis

2D, 3D, 4D	2, 3, 4-Dimensional (NMR-Spektroskopie, Raum)
Abb.	Abbildung
Acq	„acquisition“
ADC	Analog-Digital-Wandler
AS	Aminosäure
BEV	„Bovine Enterovirus“
BEVSLD	„StemLoop D of Bovine Enterovirus“
B_0	äußeres Magnetfeld
B_1	RF-Feld, Magnetfeld in der x,y-Ebene
B_{eff}	am Kernort wirksames Magnetfeld
bzw.	beziehungsweise
CL	Kleeblatt („cloverleaf“)
COSY	Korrelationsspektroskopie („correlated spectroscopy“)
CSA	Anisotropie der chemischen Verschiebung („chemical shift anisotropy“)
$C(t)$	Autokorrelationsfunktion
CR	konservierter Bereich („conserved region“)
CW	kontinuierliche Einstrahlung einer Radiowelle („continuous wave“)
D	Deuterium, ^2H
D_{xx}, D_{yy}, D_{zz}	Eigenwerte des Rotationsdiffusionstensors
Da	Dalton (Einheit des Molekulargewichtes)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
e	Elementarladung ($1.60219 \cdot 10^{-19}$ Coulomb)
evtl.	eventuell
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FID	freier Induktionszerfall („free induction decay“)
FT	Fourier-Transformation
HetNOE	„heteronuclear NOE“
HMQC	Heteronukleare Multiquantenkorrelation („heteronuclear multiple quantum correlation“)
HPV	Humaner Papillomavirus („human papilloma virus“)
HSQC	Heteronukleare Einquantenkorrelation („heteronuclear single quantum correlation“)
J	Spektrale Dichte („spectral density“)
k	Boltzmann-Konstante
K	Temperatur in Kelvin
M	Magnetisierung
m_l	Magnetquantenzahl
M_x, M_y	transversale Magnetisierung
M_z	Magnetisierung in Richtung der z-Achse
M_0	Gleichgewichtsmagnetisierung

MD	Molekulardynamik („molecular dynamics“)
MHz	Megahertz
NMR	kernmagnetische Resonanz (“nuclear magnetic resonance”)
NOE	Kern-Overhauser-Effekt (“nuclear Overhauser enhancement effect”)
ORF	Offenes Leseraster („open reading frame“)
ppm	“parts per million”
R_1	longitudinale, Spin-Gitter-Relaxationsgeschwindigkeit
R_2	transversale, Spin-Spin-Relaxationsgeschwindigkeit
RF	Radiofrequenz
RMSD	“root mean square deviation”
RNA	Ribonukleinsäure
s.	siehe
s.g.	sogenannt
SL	Spinlock
T_1	longitudinale, Spin-Gitter-Relaxationszeit
T_2	transversale, Spin-Spin-Relaxationszeit
τ_{trans}	Korrelationszeit der Translationsbewegungen
τ_{loc}	Korrelationszeit der lokalen Bewegungen
τ_{rot}, τ_c	globale Rotationskorrelationszeit
t	Zeit
TPPI	„time proportional phase incrementation”
tr	Spur (“trace”)
u.a.	und andere, unter anderem
v.a.	vor allem
vgl.	vergleiche
WW	Wechselwirkung
z.B.	zum Beispiel
z.Z.	zur Zeit
α	1.Eulerwinkel
β	2.Eulerwinkel
γ	gyromagnetische Konstante, 3.Eulerwinkel
δ	chemische Verschiebung
σ	Abschirmungskonstante, CSA-Tensor
h, \hbar	Planck’sche Konstante
μ	magnetische Permeabilität
φ	Peptid-Diederwinkel der Hauptkette in Proteinen, 1. Kugelkoordinate
ψ	Peptid-Diederwinkel der Hauptkette in Proteinen, 2. Kugelkoordinate
ω	Peptid-Diederwinkel der Hauptkette in Proteinen, Frequenz
ν	Frequenz
χ	Diederwinkel der Seitenkette, Magnetisierfähigkeit
π	180°-Impuls

1. EINLEITUNG

Eine der fundamentalen Fragestellungen zum Verständnis des Lebens ist der Nachweis der Verbindung zwischen der Struktur, der Dynamik und den Funktionen in komplizierten Molekülsystemen wie Proteinen oder Nukleinsäuren. Diese Biomoleküle stellen molekulare Maschinen dar, die eine Fülle von spezifischen Funktionen erfüllen und alle Schlüsselprozesse in einer lebenden Zelle überwachen. Proteine verfügen über eine geordnete Tertiärstruktur, die dennoch eine große Menge von Bewegungen erlaubt, wie z.B. schnelle Atomschwingungen, Seitenketten-Rotationen, die Bewegung von einzelnen Segmenten und Domänen, Molekülrotationen. Obwohl die statische Tertiärstruktur auch selbst sehr wertvolle Information über die Organisation und die Wechselwirkung der Biomoleküle beinhaltet, sind Bewegungsvorgänge meistens ein notwendiger Funktionsfaktor. Die Dynamik ist lebenswichtig für solche Proteinfunktionen, die von der Tertiärstrukturänderung als Ergebnis spezifischer molekularer Wechselwirkungen abhängen. Die Orientierung und die Bewegung von Domänen in verschiedenen Proteinen ist z.B. Schlüssel von Regulationsprozessen. Um zu verstehen, wie verschiedene Biomoleküle funktionieren, muss man wissen, welche Bewegungen im zu untersuchenden Objekt ablaufen und wie diese mit biologischen Funktionen korrelieren. Das ausführliche Wissen über die Biomoleküldynamik ist also der Schlüssel für das Verständnis der Funktionsmechanismen, einschließlich solcher Ereignisse wie die Annahme biologisch aktiver Konformationen, Ligandenerkennung, Allosterie und Katalyse. Die Dynamik komplexer Biomoleküle ist nicht nur wegen des Vorhandenseins von mehreren Bewegungsarten für die Analyse schwierig, sondern auch wegen des gleichzeitigen Auftretens dieser Bewegungen und des Ablaufens der Prozesse auf unterschiedlichen Zeitskalen. Um die Biomoleküldynamik erfolgreich untersuchen zu können, muss man verschiedene Bewegungsbeiträge separieren und dabei auf Daten aus NMR-Spektren und MD-Rechnungen zurückgreifen.

Im experimentellen Bereich erlaubt heteronukleare NMR-Spektroskopie zusammen mit ^{15}N - und ^{13}C -Isotopenmarkierung einen Zugriff auf Information ausgehend von jedem Atom im Molekül zu bekommen und ermöglicht, die Dynamik im Zeitfenster von Pikosekunden bis zu Sekunden zu untersuchen; im theoretischen Bereich und mit modernen Hochleistungsrechnern ist es möglich, Molekulardynamik-Simulationen im Zeitfenster bis zu Hunderten von Nanosekunden durchzuführen. Somit überschneiden sich die Zeitfenster beider Techniken und erlauben, die Verbindung zwischen der theoretischen Voraussage und den experimentellen Beobachtungen aufzuzeigen. Als Untersuchungsobjekte der Diplomarbeit dienen zwei in der AG Molekulare Biophysik/NMR-Spektroskopie des Fritz-Lipmann-Instituts Jena (vormals IMB Jena) bearbeitete Biomoleküle: Das Onkoprotein E7 aus dem humanen Papillomavirus (HPV) mit einer Sequenz von

56 Aminosäuren und eine 18mer-Ribonukleinsäure (RNA) mit einem cGUUAg-Tetraloop aus der 5'-nichttranslatierten Region der genomischen RNA des bovinen Enterovirus (BEVSLD). Die Untersuchung der Dynamik beider Moleküle wurde mittels Methoden der NMR-Spektroskopie und Molekulardynamik-Simulation durchgeführt. Das Ziel dieser Arbeit war das Erhalten der mikrodynamischen Parameter der Biomoleküle mittels zwei verschiedener Methoden und deren weitergehende Analyse. Eine weitere Aufgabe war, Ähnlichkeiten und Unterschiede im dynamischen Verhalten von Proteinen und Nukleinsäuren aufzudecken und spezifische funktionelle Charakteristika dieser Biomoleküle zu erklären.

1.1 Onkoprotein E7

Das Onkoprotein E7 wurde 1986 als erstes Onkogen der Hochrisikogruppe von humanen Papillomaviren (HPV) entdeckt [1]. Die Virusfamilie der Papillomaviridae wächst ständig und infiziert viele Säuger-, Vogel- und Amphibienspezies. Z.Z. besteht sie aus ca. 200 verschiedenen human-infizierenden Typen. HPV befallen teilungsfähige Basalzellen der Haut und Schleimhaut, sind damit strikt epitheliotrop und werden in die Subklassen „mukosale“ und „kutane“ Viren unterteilt. In jeder dieser Klassen können Viren einer „high-risk“ und einer „low-risk“-Gruppe zugeordnet werden. Diese Einteilung hängt von den durch die Viren ausgelösten Krankheitsbildern ab [2]. Mit dem Auftreten von Krebs (Zervixkarzinom) sind humane Papillomaviren der „high-risk“-Gruppe verknüpft, unter ihnen HPV16, HPV18, HPV31 und HPV45 [3].

Das virale Genom von HPV, umschlossen von einem ikosaedrischen Capsid aus den Strukturproteinen L1 und L2, enthält eine ca. 6800-8000 Basenpaare große doppelsträngige DNA mit ORF auf einem der Stränge, die eine Reihe von Proteinen kodieren. Die HPV-Proteine werden je nach Zeitpunkt ihrer Expression während des Vermehrungszyklus in infizierten Zellen als „early“ (E) oder „late“ (L) klassifiziert. Innerhalb der „early“- und „late“-Klasse werden die Proteine nach sinkender Größe nummeriert. E7 ist somit das Kleinste in der Gruppe der im frühen Stadium exprimierten HPV-Proteine.

Die E7-Proteine der unterschiedlichen HPV-Typen bestehen einheitlich aus ca. 100 Aminosäuren. Die Primärstruktur wird in Analogie zum E1A-Protein aus Adenoviren in drei konservierte Bereiche (CR1-CR3) unterteilt. In CR2 (Reste 22-44) gibt es ein LxCxE-Motiv, das die Bindung an die „B-Box“ des Tumorsuppressor Rb vermittelt [4]. In CR3 (Reste 58-101) sind zwei CxxC-Motive lokalisiert. Es wurde festgestellt, dass die aus ca. 100 Aminosäuren ($M_w \sim 10$ kDa) bestehenden E7-Proteine Homodimere ausbilden [3].

Das Onkoprotein E7 kann zusammen mit E6 primäre humane Keratinozyten effizient immortalisieren [3]. Die Induktion der zellulären und/oder viralen DNA-Synthese in differenzierten Keratinozyten, z.B. ausgelöst durch E7, führt zur Aktivierung sich widersprechender Wege innerhalb des Signalnetzwerkes der Epithelzellen. Diese werden innerhalb des Gewebes in ihrer Aktivität gehemmt oder aus dem Gewebe eliminiert. Die immortalisierten Keratinozyten sind jedoch ohne weitere genetische Einflüsse nicht tumorigen, was nahe legt, dass die viralen Onkogene E6 und E7 am Anfang einer noch genauer zu identifizierenden Reaktionskette stehen, die zuletzt in der Tumorbildung kulminiert [3].

Die zwei CxxC-Motive in CR3 sind durch 29 ASn getrennt und stellen eine Zinkbindungsstelle dar [5]. Mit der Aufklärung der Dimerstruktur in der AG Molekulare Biophysik/NMR-Spektroskopie konnte gezeigt werden, dass die bisherige Annahme, dass

Wechselwirkungen dieser Zinkfinger-Region für die beobachtete Zn-abhängige Dimerisierung von E7 verantwortlich sein könnten [5], nicht zutreffen [6].

In der Literatur wurde auch gezeigt [4], dass der N-Terminus von E7 (1 – 5) als sehr bewegliches und strukturloses Element auftritt, weshalb in unserem Labor die Struktur und Dynamik eines N-terminal „verkürzten“ Moleküls aus 56 ASn untersucht wurde. Das Onkoprotein

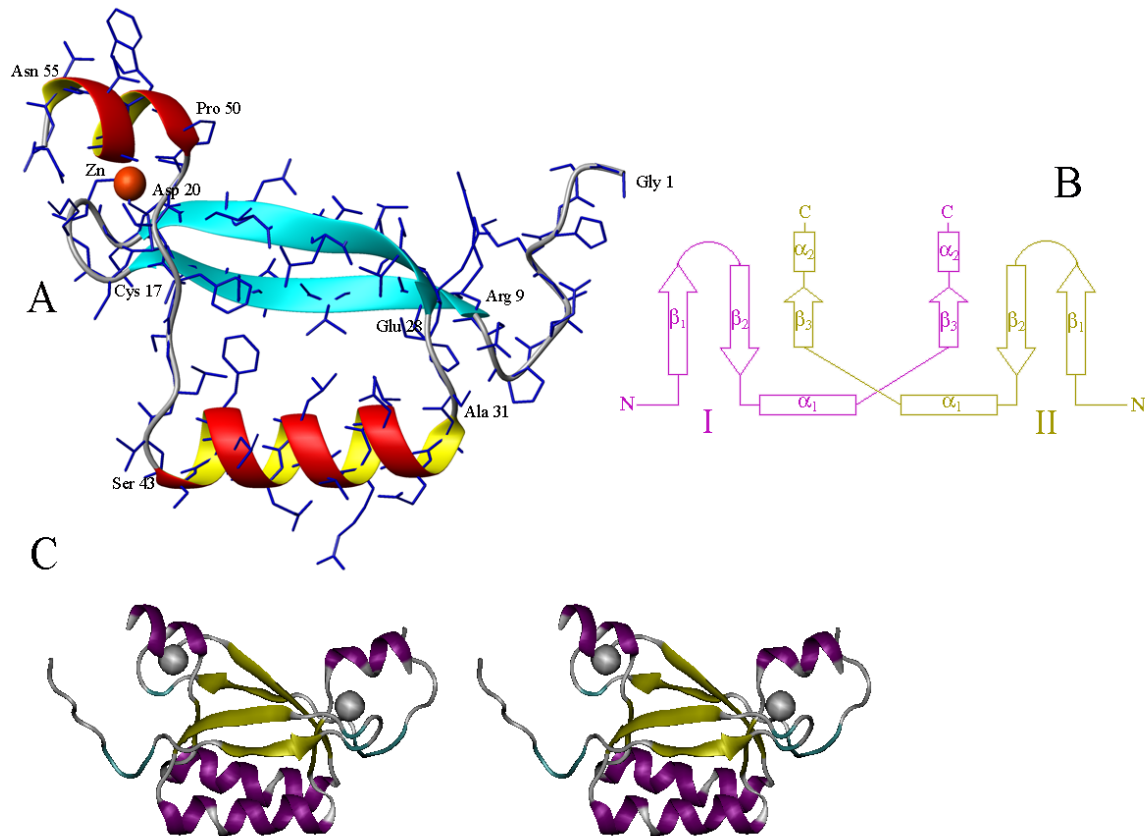


Abb. 1.1. Das Onkoprotein E7¹ [6].

A: Detaillierte Struktur eines Monomers (rotgelb=α-Helix; cyan=β-Faltblatt); die Darstellung zeigt zur besseren Übersichtlichkeit nur die Schweratome; Start- und Endreste der Sekundärstrukturelemente sowie Termini sind nummeriert;

B: Schema von Sekundärstrukturelementen im Dimer (mit I und II sind Monomere gekennzeichnet);

C: Stereobild des Dimers.

E7 hat folgende Aminosäuresequenz: Gly¹-Ser-His-Met-Ala⁵-Glu-Pro-Gln-Arg-His¹⁰-Lys-Ile-Leu-Cys-Val¹⁵-Cys-Cys-Lys-Cys-Asp²⁰-Gly-Arg-Ile-Glu-Leu²⁵-Thr-Val-Glu-Ser-Ser³⁰-Ala-Glu-Asp-Leu-Arg³⁵-Thr-Leu-Gln-Gln-Leu⁴⁰-Phe-Leu-Ser-Thr-Leu⁴⁵-Ser-Phe-Val-Cys-Pro⁵⁰-Trp-Cys-Ala-Thr-Asn-Gln⁵⁶ (Abb. 1.1). Wie es schon oben erwähnt wurde, beinhaltet das Onkoprotein ein Zinkatom, das kovalent mit den Aminosäuren Cys16, Cys19, Cys49 und Cys52 verbunden ist. Jedes

¹ Die Abbildungen 1.1.und 1.2 wurden mit dem Programm MolMol [7] hergestellt.

Monomer besteht aus folgenden Sekundärstrukturelementen: $\beta_1\beta_2\alpha_1(\beta_3)\alpha_2$ (s. Abb. 1.1.B), wobei α_1 die „große“ Helix, α_2 die „kleine“ Helix darstellt und β_3 das nur im Dimer existierende β -Faltblatt.

Da in einem Proteinmolekül verschiedene Bewegungsvorgänge vorkommen können (vermutlich starke lokale Bewegungen in den N- und C-Termini, hohe Rigidität in der Kernregion), ist es interessant, die dynamischen Charakteristika des Onkoproteins E7 zu untersuchen und deren Beitrag zu einer Dimerbildung aufzudecken.

1.2 18mer RNA (BEVSLD)

Die in dieser Arbeit untersuchte 18mer RNA kommt aus der 5'-nichttranslatierten Region der genomischen RNA des bovinen Enterovirus. Der bovine Enterovirus gehört zur Picornaviren-Familie und ist endemisch für einige Rindertypen und ihre Umgebung [8]. Picornaviren sind Agenzien, die eine Menge von Krankheiten erregen, u.a. auch neurologische Krankheiten und Myokarditis. Die 5'-nichttranslatierte Region beinhaltet spezifische Signalsequenzen, die für das Translationsinitiiieren und die Replikation verantwortlich sind. Im Gegenteil zu vielen anderen Picornaviren hat die genomische RNA des bovinen Enterovirus zwei Kleeblätter („cloverleaf“, CL) in Tandem. Während das erste Kleeblatt einen cGUUAg-Tetraloop enthält, an die Virus-kodierte Proteinase 3C^{pro} bindet, erhöht das zweite Kleeblatt die translationale Aktivität der Bindungsstelle der Ribosome, trägt einen Pentanukleotid-(cGCUUAg)-D-Loop aber bindet nicht an die Proteinase [9]. Vor kurzem wurde in unserem Labor die NMR-Struktur in Lösung dieser RNA ermittelt [10], die den Stemloop-D von „cloverleaf“ 1 des bovinen Enterovirus 1 darstellt. Die RNA-Sequenz dieser neuen Tetraloop-Struktur war:



Neben einer kanonischen A-Form-Helix für den Stem aus den Nukleotiden G1-U6 und A13-C18 weist das Rückgrat des Tetraloop eine solche Konformation auf, die den cUNCGg-Konformationen

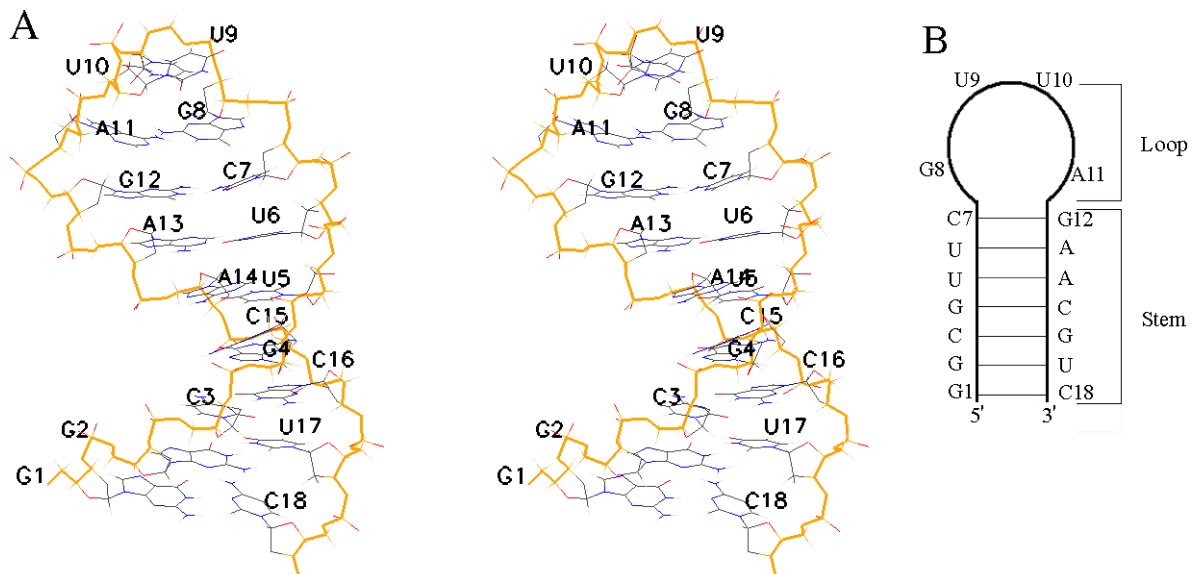


Abb. 1.2. BEVSLD [10].

A: Detaillierte Struktur des BEVSLD, Stereobild; der Rückgratverlauf der Nukleotidkette ist hervorgehoben; die Nukleotide sind nummeriert;

B: Struktur schematisch, Loop und Stem sowie Basenpaarungen sind gekennzeichnet.

der yYNMGg -Familie ähnlich ist. Der apikale cGUUAg D-Loop stellt eine gut definierte Tetraloop-Struktur dar, die sich zwischen dem kanonischen, aber etwas geknickten Basenpaar C7:G12 erstreckt. Drei der Loop-Basen nehmen an Stapel („stacking“)-Wechselwirkungen teil. G8 und A11 werden in einer ungewöhnlich verschobenen Konformation gefunden, die (anscheinend) die Bildung von direkten Wasserstoffbrücken zwischen ihren Basenatomen nicht zulässt.

Diese Konformation ist anders als in UNCG- und GNRA-Tetraloops [11], in denen der erste und vierte Loop-Rest über Wasserstoffbrückenbindungen gepaart wird. Jedoch wies die berechnete Struktur eine Wasserstoffbrückenbindung der Aminogruppe von G8 und des Ribose O4-Sauerstoffs von U10 auf. Ebenso sind Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem 2'OH von U10 und dem nicht verbrückten Sauerstoff von A11 sowie am 2'OH von A11 und dem nicht verbrückten Sauerstoff von G12 konsistent mit der berechneten Struktur. G8 hat eine A-Form-Konformation, die einen Glykosidwinkel in *anti*-Konformation und einen C3'-*endo* Zuckerpucker einschließt und ähnlich zum ersten Rest in den zwei oben erwähnten Tetraloop-Gruppen ist. Die berechnete Struktur zeigt jedoch einen ungewöhnlichen χ -Winkel im *syn*-Bereich für den vierten Loop-Rest, A11. Ein *syn*G in dieser Position ist für den UNCG-Tetraloop typisch, während der vierte Loop-Rest von GNRA-Tetraloops eine *anti*-Konformation annimmt. Im cGUAAg-Tetraloop [12], der sich vom BEV D-Loop nur durch einen Rest unterscheidet und einen hohen RMSD von 1.66 Å aufweist, findet man dagegen eine Umkehr der Rückgratsrichtung zwischen dem ersten und dem zweiten Loop-Rest, wodurch sich ein weiteres „stacking“ von Basen der Loop-Reste 2-4 ergibt. So verursacht ein Unterschied von nur einem Nukleotid (GUUA→GUAA) eine Transformation zwischen zwei verschiedenen Tetraloop-Strukturen. Aufgrund der Unterschiede zu den bisher bekannten Tetraloop-Strukturen und des offenbar stabilen Pseudo-Basenpaares [10], wurde beschlossen, zusätzlich die dynamischen Charakteristika dieses D-Loops zu untersuchen.

2. GRUNDLAGEN

2.1. NMR-Spektroskopie

2.1.1. Kerne im Magnetfeld

Atomkerne besitzen eine Substruktur, die näherungsweise als eine Ansammlung von Nukleonen dargestellt werden kann. Diese besitzen Eigendrehimpulse, die sich zum Gesamtdrehimpuls des Kernes aufaddieren. Der Kern-Drehimpuls ist eine gequantelte Größe, so kann der Kern in einem Magnetfeld nur ganz bestimmte Orientierungen einnehmen. Diese Orientierungen werden durch die Magnetquantenzahl m_I charakterisiert und ein Kern mit der Drehimpulsquantenzahl I kann $2I+1$ Orientierungen einnehmen [13]. Die wichtigsten Kerne in der organischen und biomolekularen Chemie sind die Spin- $1/2$ Isotope (^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F , ^{31}P), die aber mit verschiedener Häufigkeit in der Natur vorkommen. Diese Kerne können zwei Zustände im Magnetfeld einnehmen, die als $-1/2$ (α)-Zustand und $+1/2$ (β)-Zustand bezeichnet werden. Die Energie eines Spins im statischen äußeren Magnetfeld B_0 ist dann:

$$E = m_z \gamma \hbar B_0 / 2\pi, \quad (1)$$

(γ = gyromagnetische Konstante, h = Planck'sche Konstante), dann entspricht die Energiedifferenz für zwei mögliche Orientierungen des Spins der sogenannten Larmorfrequenz:

$$\omega_0 = \gamma B_0, \quad (2)$$

die von der gyromagnetischen Konstante der Kerne abhängt. Die Haupteigenschaften der wichtigen Kernsorten sind in der Tabelle 1 [14,15] aufgeführt.

Tabelle 1: Eigenschaften der wichtigsten Kerne in der Biochemie.

Kern	Spin	Gyromagnetische Konstante [$10^8 \text{ T}^{-1} \text{ s}^{-1}$]	Resonanzfrequenz bei 14.092 T [MHz]	Nat. Häufigkeit, %	Mittlere Entfernung, r zwischen ^1H und Heteroatom) [\AA]
^1H	1/2	2,6751987	600.0	99.98	
^2H	1	0.4106593	92.1	0.02	
^{12}C	0			98.89	1.08
^{13}C	1/2	0.6728220	150.9	1.11	1.09
^{14}N	1	0.1933763	43.3	99.63	1.02
^{15}N	1/2	-0.271260	60.8	0.37	1.02
^{19}F	1/2	2.518127	564.5	100.00	
^{31}P	1/2	1.08393	242.9	100.00	

Wie viel Energie absorbiert werden kann, und somit die Stärke des detektierbaren Signals, ist vom Populationsdichteunterschied zwischen den Niveaus α und β abhängig. Unterschiedliche Besetzung

führt zu einer Gesamtmagnetisierung, die nach Anregung durch ein äußeres Wechselfeld beobachtet werden kann [13].

2.1.2 Grundlagen der NMR-Spektroskopie

Die ersten NMR-Spektrometer waren die CW-Spektrometer („continuous wave“). Sie funktionierten wie übliche IR- oder UV-Spektrometer, wobei der beobachtende spektrale Bereich einfach durch Änderung der B_0 -Feldstärke „durchlaufen“ wurde. Für einen Durchgang des Spektrums wurde sehr lange Zeit benötigt, wodurch mit solchen Methoden in vernünftiger Zeit nur sehr konzentrierte Proben gemessen werden konnten.

Die heute üblichen NMR-Spektrometer sind FT-Impulsgeräte, die mit Feldstärken bis zu 21.2 T (entspricht 900 MHz der Resonanzfrequenz der Protonen) arbeiten [13,15]. Alle modernen NMR-Spektrometer besitzen supraleitende Magnete. Im Gegensatz zu den CW-Spektrometern wird hier die Feldstärke B_0 konstant gehalten und mit Hilfe eines kurzen RF-Impulses werden alle Kerne angeregt, die im Bereich der Sendefrequenz liegen. Obwohl monochromatische Strahlung verwendet wird, werden Kerne (entsprechend der Heisenberg'schen Unschärferelation) in einem großen Frequenzbereich angeregt. Durch Auswahl von RF-Impulsen mit entsprechender Energie kann man eine solche Änderung der Populationsdichte erreichen, dass der Magnetisierungsvektor parallel zur Querachse (x - oder y -Magnetisierung) oder antiparallel zur Magnetfeldachse (z -Magnetisierung) liegen wird. Man spricht dann entsprechend von 90° - ($\pi/2$) oder 180° (π)-Impulsen. Allgemein kann man also durch Auswahl der Energie und der Impulsdauer den Magnetisierungsvektor willkürlich ausrichten.

Wenn unter Wirkung des RF-Impulses die Magnetisierung von der z -Achse (d.h. von der Gleichgewichtslage) abgelenkt wird, so wird nach der Abschaltung des RF-Impulses die Magnetisierung um die Richtung des Feldes B_0 präzedieren, da die Magnetisierung transversale Komponenten bekommt. Mit der Probe in der Empfängerspule erzeugt das wechselnde Magnetfeld eine kleine Induktionsspannung, die mittels entsprechender Methoden registriert werden kann. Die Signalamplitude ist der Resonanzfrequenz ω und der Magnetisierung M_0 proportional; der mit $\sin(\omega t)$ modulierte Strom kann gemessen werden und wird freier Induktionszerfall genannt („Free Induction Decay“, FID) [15-17].

Während der Präzession nimmt die Länge des Magnetisierungsvektors in der transversalen Richtung ständig ab (d.h. der FID wird kleiner). Das Abklingen des Signals reflektiert die Relaxation der Magnetisierung, hierbei unterscheidet man generell zwischen:

Spin-Spin-Relaxation (transversale Relaxation)

$$\frac{dM_{x,y}}{dt} = -\frac{M_{x,y}}{T_2} \quad (3) \text{ und}$$

Spin-Gitter-Relaxation (longitudinale Relaxation)

$$\frac{dM_z}{dt} = -\frac{M_z - M_0}{T_1} \quad (4).$$

Die transversale Relaxation führt zum Verschwinden der transversalen Magnetisierung und dabei zum Abklingen des FID, die longitudinale Relaxation bringt das System in ihren Ausgangszustand (Boltzmann'sches Gleichgewicht) zurück. Die Spin-Gitter-Relaxationskonstante T_1 ist mit Energie und T_2 ist mit einer Entropiezunahme verbunden. Für alle Moleküle gilt

$$T_1 \leq T_2 \quad (5),$$

für kleine Moleküle gilt die Gleichung $T_1 = T_2$.

Die Resonanzbedingung, die in der Gleichung (2) formuliert wurde, ist streng gesagt, nur für Idealgaskerne anzuwenden. In Realsituationen befinden sich Atomkerne in Verbindungen und sind mit einer Elektronenhülle umgeben. Atomkerne werden durch diese Hülle vom Außenfeld B_0 abgeschirmt, so dass auf die Atomkerne nicht das B_0 -Feld einwirkt, sondern ein effektives Feld B_{eff} für das die Resonanzgleichung anders formuliert werden muss:

$$\omega = \gamma B_0 (1 - \sigma) \quad (6),$$

(σ = Abschirmungskonstante).

Da die abschirmende Wirkung der Elektronenhülle, und damit die jeweilige Resonanzfrequenz-Verschiebung von der chemischen Umgebung, in der sich der betrachtete atomare Kern befindet, abhängt, wird diese Resonanzbedingungsänderung als „chemische Verschiebung“ bezeichnet. Die Größe der chemischen Verschiebung δ wird bezüglich der Linienlage, die einer Bezugssubstanz S entspricht, in „parts per million“ (ppm) gemessen [15,16]. Die dimensionslose Konstante δ ist die Differenz der Abschirmungskonstanten σ für den jeweiligen Kerntyp in der untersuchten Substanz und Bezugssubstanz oder die relative Differenz der entsprechenden Resonanzfrequenzen ω im äußeren Magnetfeld B_0 :

$$\delta = \frac{(\omega - \omega_0)}{\omega_0} \cdot 10^6 \quad (7),$$

wobei ω und ω_0 die entsprechenden Resonanzfrequenzen der untersuchten Substanz und der Bezugssubstanz sind.

Der positive Wert δ bedeutet, dass die Resonanzlinie der Kerne des gegebenen Elementes in der untersuchten Substanz in das Gebiet der niedrigeren Frequenzen im Vergleich zur Resonanzfrequenz verschoben ist, auf der die Linie der Bezugssubstanz beobachtet wird.

Die chemischen Verschiebungen für die Wasserstoff-Kerne, die nur von einem Elektron abgeschirmt sind, sind ziemlich klein (ca. -1 bis 10 ppm). Für die Kerne C und N

kann die Verschiebung Hunderte von ppm betragen. Die chemische Verschiebung ist wichtigster Parameter der Feinstrukturspektroskopie: diese Methode erlaubt, die NMR-Signale der Kerne oder der Kerngruppen eines Elementes zu beobachten, aber in verschiedener chemischer Umgebung, so dass man aus der Größe der chemischen Verschiebung Information über die chemische Umgebung des jeweiligen Kernes bekommen kann [15].

2.1.3 Grundlagen der Fourier-Transformation-Spektroskopie

Ein in der Spule detektiertes Signal wird mit dem Einstrahlsignal gemischt und dann als reines Audiosignal zum Analog-Digital-Wandler (ADC) geführt. Der ADC hat zwei wichtige Charakteristika [13,17]:

A. Dynamischer Bereich: Der Bereich der die gleichzeitig aufnehmbaren schwächsten und stärksten Signale bestimmt. Er hängt von der Zahl der Bits ab, die der ADC für die Digitalisierung des Signals verwendet.

B. Auflösung: hängt von der Anzahl der registrierten Punkte des FID ab und ist von der spektralen Breite des Signals unabhängig [13].

Mittels „zerofilling“ kann man die Punktedichte erhöhen, dabei wird die Linienform besser beschrieben. Üblich ist „zerofilling“ der 2. oder 4. Ordnung (d.h. die tatsächliche Zahl der Punkte nimmt um Faktor zwei oder vier zu).

Das so modifizierte Signal wird einer Fourier-Transformation unterzogen, wodurch der Übergang von der Zeitdimension in die Frequenzdimension erreicht wird:

$$F(\omega) = \int_{-\infty}^{+\infty} f(t) \cdot e^{i\omega t} dt, \text{ wobei } e^{i\omega t} = \cos(\omega t) + i \sin(\omega t) \quad (8),$$

(ω = Frequenzvariable, t = Zeit).

Die Darstellung der Messdaten in der Frequenzdimension bezeichnet man als Spektrum. Die Form des Spektrums ist von der Gestalt des FID abhängig. So führt eine ideale Exponentialfunktion zu einer Lorentzfunktion der Signale im Spektrum. Man kann die Spektren durch entsprechendes Behandeln des FID mit geeigneten Funktionen verändern, d.h. entweder die Auflösung oder das Signal-Rausch-Verhältnis verbessern. Mittels einer Exponentialfunktion kann die Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses erreicht werden und eine Lorentz-zu-Gauss-Transformation führt zur Verbesserung der Auflösung. Eine letzte Operation in der Spektrumvorbehandlung ist die Phasenkorrektur. Im Idealfall zeigt der Realteil des Spektrums rein absorptives Signal, der Imaginärteil ein dispersives Signal. Aus technischen Gründen werden nach der Fourier-Transformation meist keine absorptiven Signale erhalten. So entstehen Phasenfehler der 0. Ordnung (nicht von der

Frequenz abhängig) und der 1. Ordnung (Frequenz-abhängig), weshalb Phasenkorrekturen notwendig werden [13,16].

2.1.4 Mehrdimensionale NMR-Spektroskopie

Die Entwicklung der mehrdimensionalen NMR-Spektroskopie hat neue Möglichkeiten für vielfältige biologische Anwendungen von NMR eröffnet. Es wurden zahlreiche Methoden für mehrdimensionale NMR-Spektren entwickelt [16]. Mehrdimensionale NMR-Spektroskopie verfügt über zahlreiche Vorteile im Vergleich zu eindimensionalen NMR-Methoden: (1) Information kann als die Funktion von zwei (oder mehreren) Variablen dargestellt werden, wodurch verbesserte Auflösung für komplizierte Spektren erreichbar ist und sich durch mehrdimensionale Experimente sichere Korrelation der Signale ergibt. (2) Gleichzeitig mit Trennung von mehreren Variablen kann man entsprechende physikalische Wechselwirkungen wählen, was diese Trennung noch verbessern kann. (3) In der mehrdimensionalen NMR-Spektroskopie kann man relativ einfach Mehrfachquantenübergänge beobachten, die in der ersten Annäherung durch Auswahlregeln nach Spinquantenzahl verboten sind [15].

Im Prinzip stellt jede Experimentserie in der neben der Detektionszeit t_2 auch die Evolutionsperiode t_1 variiert wird, ein zweidimensionales NMR-Experiment dar [15]. 2D-Spektroskopie soll aber folgende Bedingung erfüllen: Die zweite Variable muss obligatorisch mit den spezifischen Eigenschaften des zu untersuchten Spinsystems verbunden werden. Durch Einführung von anderen Zeitvariablen ist es im Prinzip möglich, den Übergang zu NMR-Spektren sehr hoher Dimensionen zu realisieren. Jedoch bedingt die Beschränkung des Experimentes auf eine vernünftige Zeitdauer, die in der Praxis realisierbar ist, dass die Variablenanzahl nicht unbegrenzt erhöht werden kann, so dass die gegenwärtige maximale Variablenanzahl bei vier bis fünf liegt (5D-NMR) [16].

In mehrdimensionaler NMR-Spektroskopie wird ausschließlich die Fourier-Spektroskopie-Methode verwendet. Ein klassisches 2D-NMR-Experiment enthält in der Zeitdimension schematisch folgende 4 Abschnitte: Die Präparationszeit, die Evolutionsperiode, die Mischungsperiode und die Detektionsperiode. Die Evolutionszeit besteht in der Regel aus einem 90° -Impuls, der die transversale Magnetisierung bildet. Während der Evolutionsperiode mit Dauer t_1 ändern sich die transversalen Komponenten der Magnetisierung. Dann folgt die Mischungsperiode, die in einigen Experimenten fehlen kann. Die Komponenten der transversalen Magnetisierung sind untereinander mittels vielfältiger Wechselwirkungen (dipolare Wechselwirkung, Spin-Spin-Wechselwirkung, quadrupolare Wechselwirkung u.a.) verbunden. In der Detektionsphase werden die Signale

wie auch im eindimensionalen Fall, in regelmäßigen Zeitabständen Δt_2 registriert, dann werden sie der Digitalisierung unterzogen und akkumuliert. Die Periodendauer t_1 wächst von Experiment zu Experiment ständig um die Größe Δt_1 , wobei die Intervalldauer t_1 ebenso, wie auch die Intervalldauer t_2 mittels Nyquist-Theorem bestimmt wird. Das jedem Wert t_1 entsprechendes Spektrum wird einzeln akkumuliert und abgespeichert. Auf solche Weise wird eine zweidimensionale Matrix aufgebaut, in der jedem Paar der Werte (t_1, t_2) das Signal mit der Amplitude $S(t_1, t_2)$ entspricht. Zweidimensionale Fourier-Transformation wandelt das Zeitsignal $S(t_1, t_2)$ in das Frequenzsignal $S(\omega_1, \omega_2)$. Diese Fourier-Transformation kann man auf folgende Weise darstellen:

$$S(\omega_1, \omega_2) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} S(t_1, t_2) e^{-i\omega_1 t_1} e^{-i\omega_2 t_2} dt_2 dt_1 \quad (9).$$

Diese Gleichung stellt die nächsten Operationen dar: Zuerst werden alle FID-Signale nach der Variablen t_2 transformiert. Die dabei entstehende Daten-Matrix enthält in den Zeilen (Achse ω_2) NMR-Spektren, die den jeweiligen Werten t_1 entsprechen. Dann wird die zweite Fourier-Transformation nach der Variablen t_1 durchgeführt, d.h. die Daten, die in Matrixspalten angegeben sind, werden als die einzelne FID-Signale betrachtet, und sie werden, wie üblich, der Fourier-Transformation untergezogen. Die Fourier-Transformation führt wie im eindimensionalen Fall zu realen und imaginären Teilen. Meistens wird nur der Realteil oder das Funktionsmodul $S(\omega_1, \omega_2)$ berechnet, die Intensität von zweidimensionalen Spektren sieht wie eine graphische Darstellung der Funktion $z=f(x,y)$ aus [15-17].

Z.Z. existieren mehrere Varianten von zweidimensionaler NMR-Spektroskopie, für biologischen Anwendung sind nur einige davon nutzbar. Man unterscheidet zwischen homonuklearer und heteronuklearer NMR-Spektroskopie, wobei die letzte eine sehr grosse Bedeutung erlangt hat.

Bei homonuklearer NMR-Spektroskopie wird die Wechselwirkung zwischen Kernen einer Sorte (z.B. Protonen) beobachtet. In diesem Fall besteht ein zweidimensionales Impulsschema aus den Impulsen, die auf das Spinsystem auf den nahen Frequenzen einwirken. Basis für alle mehrdimensionalen NMR-Experimente ist das s.g. COSY-Experiment (die Korrelationsspektroskopie) (Abb. 2.1), es beruht auf dem Kohärenztransfer zwischen zwei Kernen. Dieser Kohärenztransfer nutzt direkt den Antiphasezustand der beiden Kerne, zwischen denen Magnetisierung übertragen werden soll. Das COSY-Experiment besteht aus zwei 90° -Impulsen [15,16]. Infolge bekommt man ein COSY-Spektrum, das aus Diagonal- und Kreuzsignalen besteht. In letzteren ist die Hauptinformation enthalten.

In heteronuklearen Experimenten werden die Wechselwirkungen von Kernen verschiedener Typen beobachtet, z.B.: ^{13}C und ^1H und im Impulsschema werden die

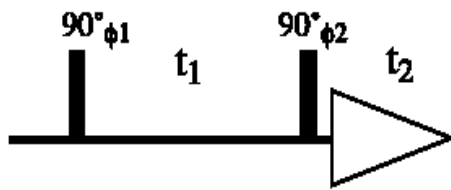
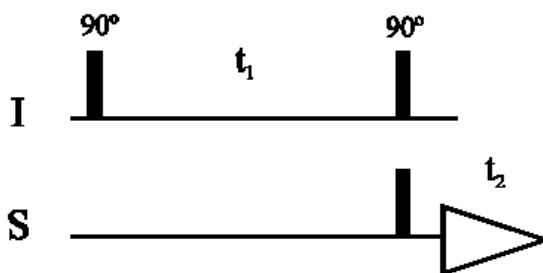


Abb. 2.1. Impulsschema des elementaren-COSY-Experiments [13].

Impulse aus verschiedenen Frequenzbereichen auf den unterschiedlichen Achsen dargestellt. Für die Untersuchungen an Proteinen und RNA haben insbesondere ^{15}N - und ^{13}C -Isotope große Bedeutung erlangt. Die einfachste Variante eines heteronuklearen Korrelationsexperimentes ist dem COSY-Experiment ähnlich: das in dieser Methode verwendete Impulsschema besteht aus zwei 90° -Impulsen, zwischen denen es auch ein t_1 -Intervall gibt, wobei die Impulse auf der Resonanzfrequenz des Kernes I eingestrahlt werden, und der FID wird während der Zeit t_2 angesammelt. Der Unterschied besteht darin, dass im Moment, in dem der zweite 90° -Impuls auf der Resonanzfrequenz des Kernes I eingestrahlt wird, der zusätzliche 90° -Impuls auf der Resonanzfrequenz des Kernes S abgegeben wird.

Das erhaltene zweidimensionale Spektrum weist auf einer Koordinate (in einer Dimension) die chemische Verschiebung eines Kerntyps (z.B. Protonen) auf und in der

Abb. 2.2. Impulsschema eines elementaren heteronuklearen Korrelationsexperimentes [13].



zweiten Koordinate die chemische Verschiebung des Hetero-Kerns (z.B. ^{13}C), der mit dem ersten Kerntyp verbunden ist. Die protonendetektierte heteronukleare Spektroskopie (oft auch inverse Spektroskopie genannt) ist heute die gebräuchlichste Variante der H,X-Korrelation. Der Empfindlichkeitsgewinn gegenüber den Heterokern-detektierten Experimenten ist so groß, dass es nur in den seltensten Fällen sinnvoll ist, nicht invers aufzunehmen [13].

Das erste protonendetektierte heteronukleare Korrelationsexperiment wurde bereits 1977 von Ernst und Maudsly [15] durchgeführt, das in seinem Impulsschema dem einfachsten H,C-COSY (Abb. 2.2) entspricht.

Die heute üblichen Experimente sind HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Correlation) und HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation) (tatsächlich die Korrelationen der chemischen Verschiebungen) [13] (Abb. 2.3). Das HSQC-Experiment hat im Produktoperatorformalismus folgende Darstellung [13,17]:

$$\begin{aligned}
 I_z &\xrightarrow{90^\circ_x} I_{-y} \xrightarrow{\Delta} 2I_x S_z \xrightarrow{90^\circ(I), 90^\circ(S)} 2I_z S_x \xrightarrow{t_1} 2I_z S_x \cos(\Omega_s t_1) \\
 &\xrightarrow{90^\circ(I), 90^\circ(S)} 2I_x S_z \cos(\Omega_s t_1) \xrightarrow{\Delta} I_y \cos(\Omega_s t_1)
 \end{aligned}
 \quad (10)$$

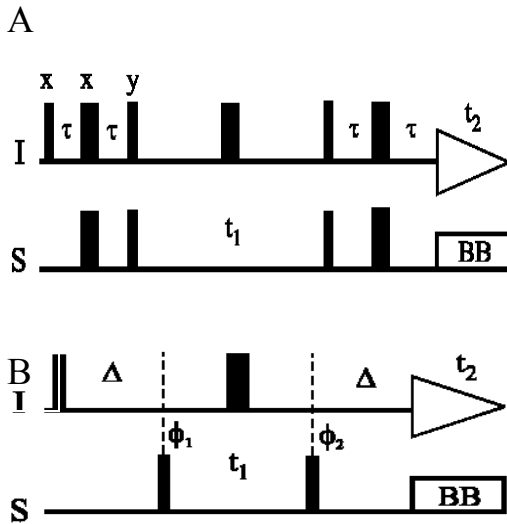


Abb. 2.3. Impulschemata von HSQC- (A) und HMQC-Experimenten (B) [13].

Da nur 1 % der Protonen bei der C,H-Korrelation und nur 0,3 % bei N,H-Korrelation detektiert werden, muss man alle anderen Protonen unterdrücken, um keine Artefakte im Spektrum zu erhalten, was eine hohe Gerätestabilität verlangt (RF-Erzeugung, Phasenänderungen, Homogenität etc.). Es gibt aber Methoden, die ^{12}C -H Protonen bereits vor Erreichen des Empfängers zu unterdrücken (oder ihre Intensität reduzieren) [16]. Im HSQC-Experiment gibt es die Möglichkeit vor dem 90°_y -Impuls auf Protonen einen Spinlockimpuls (SL) einzubauen, der die Magnetisierung dephasiert, die nicht entlang der x -Achse orientiert ist. Die entlang der y -Achse liegenden Kohärenzen werden durch das inhomogene Spinlockfeld dephasiert, während die X-Kern tragenden Protonen ($X = ^{13}\text{C}$ oder ^{15}N) entlang der x -Achse nicht beeinflusst werden.

Die in dieser Arbeit durchgeführte NMR-Experimente (Messung von R_1 , $R_{1\rho}$ und HetNOE) basierten auf dem HSQC-Schema. Dabei wird dieses Schema entsprechend erweitert und modifiziert (Impulsschema ist in Abb. 3.1 dargestellt, verwendete Relaxationsdelays und Intervalle sind im Kapitel 3.1 angeben).

2.1.5 Der NOE-Effekt

Intensitätsänderungen von Signalen in NMR-Spektren durch Sättigung der entsprechenden Resonanzzustände des Elektronenspins werden als Nuklear-Overhauser-Effekt (NOE) bezeichnet [15]. Übertragung von Experimentprinzipien auf ein Zweispinsystem mit dipolarer Wechselwirkung ist Grundlage für die Raumstrukturbestimmung mittels NMR. Im NOE-Experiment stört man durch Einstrahlung auf einen Kern dessen Populationsdifferenz, die ursprünglich durch das Boltzmann-Gleichgewicht gegeben ist. Der Kern kehrt unter Energieabgabe in seinen Gleichgewichtszustand zurück. Ein Teil der Energie, die dabei abgegeben wird, wird von benachbarten Kernen „aufgenommen“ und verändert deren Populationsdifferenzen. Da die dipolare Wechselwirkung die Besetzungsdichteänderung bestimmt und von der Entfernung zwischen den Spins abhängt, hängt auch der NOE von der Entfernung zwischen ihnen [13,16] ab. Die für den NOE verantwortliche dipolare Relaxation kann, im Prinzip, als Kreuzrelaxation zwischen zwei Kernen bezeichnet werden [14].



Der NOE wird als Verhältnis zwischen den Intensitäten I_0 und I vor bzw. nach der Anregung gemessen.

Generell wird zwischen zwei NOE-Arten unterschieden: steady-state-NOE und transient-NOE. Beim steady-state-NOE werden Kerne sehr lange angeregt, damit sie eine Art Gleichgewichtszustand erreichen, der mit Hilfe von 90° -Impulsen detektiert wird. Steady-state-NOEs im Zweispinsystem sind aber abstandsunabhängig. Die Abstandsinformation kann man aus den transient-NOE-Experimenten erhalten. Bei solchen Experimenten wird der NOE-Aufbau in Abhängigkeit von der Einstrahlzeit untersucht [13].

Während der homonukleare NOE zur Bestimmung von z.B. Protonen-Abständen genutzt wird, kann mittels des heteronuklearen NOEs (HetNOE) eine Charakterisierung der Dynamik eines Proteins oder RNA erreicht werden. Dabei stellt der steady-state-HetNOE die Kreuzrelaxation zwischen zwei Kernen dar. Die Bedeutung des HetNOE zur Charakterisierung der Moleküldynamik wird im folgenden Kapitel genauer dargestellt.

2.1.6 Biomoleküldynamik und ihre Untersuchung mittels NMR

Moleküldynamik auf atomarer Ebene kann man mittels verschiedener Methoden untersuchen: Röntgenstrukturanalyse, NMR-Spektroskopie, IR-, Raman-Spektroskopie, Moleküldynamik-Simulation (MD-Simulation). Bewegungsprozesse in Molekülen

verlaufen auf verschiedenen Zeitskalen und für Untersuchung werden entsprechende Methoden verwendet [14,16]:

Sehr schnelle Prozesse ($\tau < 30$ ps), wie Atomfluktuationen, thermische Vibrationen u.a. Sie werden in NMR zeitlich nicht aufgelöst, können aber indirekt durch T_1/T_2 -Analyse untersucht werden.

Schnelle Prozesse (30 ps $< \tau < 100$ ns), wie Rotationsbewegung, Seitenketten-Rotationen, konformationeller Austausch: Diese können mittels Auto- und Kreuz-Relaxationsexperimenten untersucht werden.

Prozesse mittlerer Zeitdauer (1 μ s $< \tau < 10$ ms), wie Umorientierung von Wasserstoffbrücken, Seitenketten-Rotationen, cis-trans-Isomerisierungen: Diese Zeitskala ist mittels $T_{1\rho}$ -Analyse erfassbar.

Langsame Prozesse (1 ms $< \tau < 1$ s), wie Wasserstoff-Austausch, Protein-Faltung: Solche Prozesse können mittels 2D-Austausch-Spektroskopie bestimmt werden.

Sehr langsame Prozesse ($\tau > 1$ s), wie Protein-Faltung, Wasserstoff-Austausch: Diese können durch Änderung der zu verschiedenen Zeiten akquirierten Spektren nachgewiesen werden.

Die transversale und longitudinale Relaxation wird von Prozessen induziert, die auf molekularem Niveau stattfinden und spiegeln damit die Wechselwirkung eines Spins mit seiner Umgebung wieder. Die Relaxationsgeschwindigkeiten sind dem Quadrat der diese Wechselwirkung charakterisierenden Größe proportional. Im Fall der Spin-Gitter-Relaxation, bei der der Energieaustausch mit der Umgebung stattfindet, werden diese Wechselwirkungen zeitlich moduliert. Das geschieht aufgrund von Wechselwirkung zwischen dem Spin und fluktuierenden Magnetfeldern, die Übergänge zwischen den stationären Zuständen eines Spinsystems auf der Frequenz ω_I auslösen. Die gleichen Prozesse, die die Spin-Gitter-Relaxation hervorrufen, führen auch zur Spin-Spin-Relaxation, da bei der Spin-Gitter-Relaxation gleichzeitig die Phasenkohärenz der Präzession von einzelnen Spins zerstört wird. Die zeitliche Modulation der Wechselwirkungen ist aber keine verbindliche Bedingung für die Phasenkohärenzzerstörung; Prozesse, die zeitmoduliert sind, stellen den zusätzlichen Weg für transversale Relaxation dar [15].

Bei der Untersuchung von Spinrelaxation in biologischen Systemen werden grundsätzlich fünf Kernspinwechselwirkungen berücksichtigt:

- 1) Dipolare Wechselwirkung,
- 2) Anisotropie der chemischen Verschiebung,
- 3) Indirekte Spin-Spin-Wechselwirkung,
- 4) Quadrupolare Wechselwirkung,

5) Wechselwirkung mit ungepaarten Elektronen (freie Radikale oder paramagnetische Ionen).

Hauptwechselwirkung für Protonen ist die dipolare Wechselwirkung zwischen Kernspins einer Art, weil diese Kernspins ein höheres Magnetmoment μ_I haben, deren Spindichte meistens hoch ist und sich außerdem Protonen in Biomolekülen immer nahe beieinander finden. Für andere Kerne mit Spin $I=1/2$ spielt die dipolare Wechselwirkung mit Protonen immer eine grundlegende Rolle. Quantitativ kann man die Relaxationsgeschwindigkeit $1/T_{1,2}^{DD}$, die durch dipolare Wechselwirkung zwischen Kern A mit Spin $I_A=1/2$ und Kern X mit Spin $I_X=1/2$ determiniert wird, so darstellen [15]:

$$\frac{1}{T_{1,2}^{DD}} = \left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right)^2 \frac{\gamma_A^2 \gamma_X^2 \hbar^2 \tau_{rot}}{r^6} \quad (12).$$

Die Gleichung (12) kann einfach interpretiert werden: der Spin A befindet sich im lokalen Magnetfeld, das von Spin X gebildet wird. Dieses Feld ist γ/r^3 proportional und hängt außerdem

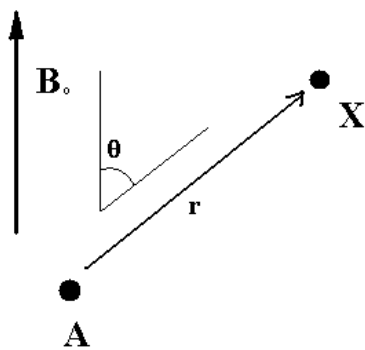


Abb. 2.4. A- und X-Kern im Magnetfeld B_0 .

vom Winkel θ zwischen r und B_0 ab. Das ist in Abb. 2.4 schematisch dargestellt. Die Zeitabhängigkeit der dipolaren Wechselwirkung für zwei Kernspins, die sich im entsprechenden Molekül befinden, entsteht, weil Brown'sche Bewegung den Winkel θ zwischen r und dem äußeren Magnetfeld ändert. Die Korrelationszeit der Rotationsbewegung τ_{rot} ist ein Maß für die Geschwindigkeit dieser Änderung. Wenn die wechselwirkenden Spins zu verschiedenen Molekülen gehören, so wird sich unter Diffusionseinfluss auch der Abstand r auch ändern. Ein Maß für diese Änderung ist die Korrelationszeit der Translationsbewegungen.

Ein zweiter wichtiger Wechselwirkungstyp, der die Relaxationsprozesse beeinflusst, ist die Anisotropie der chemischen Verschiebung (CSA, „Chemical Shift Anisotropy“) [15,18,19]. Die Elektronenhülle bildet im Punkt der Atomkernposition A ein lokales Nebefeld, das fast immer anisotrop ist, und infolge dessen seine Größe mit der Zeit unter dem Einfluss der Brown'schen Molekularbewegung ändert, wobei die Korrelationszeit τ_{rot} wieder ein Maß dieser Zeit-Abhängigkeit ist. Der Tensor der chemischen Verschiebung enthält die Information über die lokale Kernumgebung und ist so eine wertvolle Informationsquelle über die lokale Struktur und Molekülkonformation. Die Information über die einzelnen Komponenten des Tensors der chemischen Verschiebung kann man im allgemeinen Fall nicht aus dem NMR-Spektroskopie in der Lösung bestimmen, weil sie wegen schneller Umorientierungsbewegungen in der Flüssigkeit gemittelt ist. Insofern kann nur die isotrope

chemische Verschiebung $\sigma = tr(\underline{\sigma})/3$ aus den NMR-Spektren mit hoher Auflösung bestimmt werden. Der CSA-Beitrag kann für Proteine und RNA bei geringeren Spektrometer-Feldstärken vernachlässigt werden, kann aber Probleme bei höheren Feldstärken speziell für RNA darstellen. Laut Festkörper-NMR-Experimenten an Modellspezies, die Peptidbindungen enthalten, ist der CSA-Tensor nahezu axialsymmetrisch mit einem CSA-Wert ~ -160 ppm und seine Hauptachse bildet einen relativ kleinen Winkel $20-24^\circ$ mit dem Bindungsvektor N-H [19]. Für RNA wurde gezeigt, dass mit wachsender Feldstärke der CSA-Beitrag zunimmt, wobei für 9.4 T (400 MHz) und 11.7 T (500 MHz) der CSA vernachlässigbar noch ist, aber für 17.6 T (750 MHz) der CSA-Tensor schon eine bedeutende Anisotropie aufweist, die nicht als axialsymmetrisch approximiert werden kann [20].

Es zeigt sich folgende Situation: Die CSA-Werte für die Riboseatome C1'-H1' betragen konformationsabhängig 25 bis 50 ppm (durchschnittlicher Wert 40 ppm). Besonders große Bedeutung hat der CSA für aromatische Systeme. Für Basen-Atome finden sich in verschiedenen Quellen unterschiedliche Werte, wobei wir folgende Werte verwendet haben [20, 21]: Guanin: C8 – 114; Adenin: C8 – 117.5; Adenin C2 – 127; Cytosin C6 – 147.5; Cytosin C5 – 120 ppm. Dabei muss man aber betonen, dass diese Werte nur als Approximation betrachtet werden können, weil die realen CSA-Werte stark von Base, Molekül und Experimentbedingungen abhängig sind [21]. Diese starke Inhomogenität kann durch s.g. „Ringeffekte“ erklärt werden, wobei die komplizierte Basenstruktur und WW mit Nachbarresten berücksichtigt werden muss.

Die Übersetzung der NMR-Relaxationsdaten in mikrodynamische Parameter hängt von der Wahl des passenden Bewegungsmodells ab. Um das vielfältige Bild der lokalen Beweglichkeiten in den Polymeren und Biopolymeren beschreiben zu können, wurden verschiedene Modelle beschränkter Umorientierungsbewegungen [22-24] angewendet. Für die spätere Analyse probieren wir die Klassifikationen der Bewegungsprozesse zu verwenden, die der Topologie der zugänglichen Region für Umorientierung des Vektors entsprechen [14,25]:

- die Umorientierung, die den konstanten Winkel zwischen dem Vektor und der Achse der Symmetrie der lokalen Bewegung (den polaren Winkel) erhält; z.B. willkürliche Rotationen oder heftige Sprünge zwischen verschiedenen diskreten Positionen im Kegel oder Librationsbewegung innerhalb eines konkreten begrenzten Sektors auf der Konusoberfläche;
- Umorientierungsbewegungen ohne Erhaltung des polaren Winkels (das Modell „wobbling in the cone“), alle Orientierungen des Vektors sind von einem bestimmten ständigen Winkel begrenzt, z.B. die Diffusion im Kegel mit den Spiegelgrenzen oder die Diffusion auf dem „normalizing“ Potential;
- eine Menge von anderen komplizierteren Bewegungen, die obige Bewegungen wie auch einige Elementarbewegungen, die z. B. die Umorientierung der Symmetrieachse der lokalen Bewegung hervorrufen, einschließen [16,25].

2.1.7 Zusammenhang zwischen Relaxationsdaten und mikrodynamischen Parametern

Gemessene Relaxationsparameter (Geschwindigkeiten von longitudinaler Relaxation R_1 , transversaler Relaxation R_2 und heteronuklearer NOE) sind direkt mit Spektraldichten verbunden [22,23,26,27]. Diese Spektraldichten $J(\omega)$ sind durch Fourier-Transformation mit entsprechenden Korrelationsfunktionen der Reorientierungsbewegung verknüpft. Für ^{15}N -Amidkerne eines Protein-Rückgrats (oder ^{13}C -Kerne einer RNA) ergeben sich folgende Beziehungen über die spektralen Dichtefunktionen [22,26]:

$$R_1 = 3(d^2 + c^2)J(\omega_N) + d^2[3J(\omega_N) + J(\omega_H - \omega_N) + 6J(\omega_H + \omega_N)] \quad (13),$$

$$R_2 = \frac{1}{2}(d^2 + c^2)[4J(0) + 3J(\omega_N)] + P_{HF} + R_{ex} \quad (14),$$

$$NOE = 1 - |\gamma_H / \gamma_N| d^2 [6J(\omega_H + \omega_N) - J(\omega_H - \omega_N)] / R_1 \quad (15),$$

wobei $d = -(\mu_0 / 4\pi)\gamma_H\gamma_N h / (4\pi r_{NH}^3)$, $c = \gamma_N B_0(\sigma_{11} - \sigma_{\perp}) / 3$ bzw. den Anteil von dipolarer Wechselwirkung ^{15}N - ^1H (^{13}C - ^1H) und ^{15}N -CSA (^{13}C -CSA) darstellt;

$P_{HF} \equiv \frac{1}{2}d^2[J(\omega_H - \omega_N) + 6J(\omega_H) + 6J(\omega_H + \omega_N)]$ stellt den Beitrag der Hochfrequenzbewegung in R_2 dar; R_{ex} entspricht dem Beitrag von konformationellen Austausch;

r_{NH} -Bindungslänge ^{15}N - ^1H (^{13}C - ^1H); $\sigma_{11}, \sigma_{\perp}$ -Anisotropie der chemischen Verschiebung ^{15}N (^{13}C) für den axial-symmetrischen Fall; γ_H und γ_N -gyromagnetische Konstanten der Kerne; ω_N und ω_H -Larmorfrequenz für ^{15}N (^{13}C) und bzw. ^1H ; θ - Winkel zwischen dem Vektor ^{15}N - ^1H (^{13}C - ^1H) und der Hauptachse des ^{15}N (^{13}C)-CSA-Tensors [19].

Die Ausdrücke (13-15) werden für die Dynamikanalyse von Proteinen und RNA bei Vorhandensein von Relaxationsdaten weit verwendet. Die Primärziele sind: (1) die Spektraldichten $J(\omega)$ zu messen und (2) sie ins adäquate Bild der Protein/RNA-Dynamik zu übertragen. Das letztere Ziel erfordert adäquate theoretische Bewegungsmodelle, die z.B. aus dem Vergleich mit der MD-Simulation erhalten werden können. Eine sorgfältige Analyse der experimentellen Daten ist aber Voraussetzung für solche Vergleiche.

Ein großer Fortschritt in Dynamikuntersuchungen von Proteinen und RNA mittels NMR wurde durch Einführung des modellfreien („model-free“) Formalismus von Lipari & Szabo [22,23,25-27] erreicht. In dieser Näherung wird die lokale Proteindynamik mit dem allgemeinen Ordnungsparameter S^2 , der die Amplitude der lokalen Bewegungen in der Skala von 0 bis 1 darstellt, und mit der Korrelationszeit der lokalen Bewegungen τ_{loc} charakterisiert. Den modellfreien Ansatz für die Korrelationsfunktion der lokalen Bewegung kann man so darstellen:

$$C_{loc}(t) = S^2 + (1 - S^2)\exp(-t / \tau_{loc}) \quad (16).$$

In einer verfeinerten modellfreien Näherung [28] kann man die lokale Dynamik in schnelle und langsame Bewegung zerlegen ($\tau_{fast} \ll \tau_{slow}$, $S^2 = S_{slow}^2 S_{fast}^2$):

$$C_{loc}(t) = S^2 + (S_{fast}^2 - S^2) \exp(-t/\tau_{slow}) + (1 - S_{fast}^2) \exp(-t/\tau_{fast}) \quad (17).$$

Formal stellt S^2 das Abklingen von Korrelationsfunktionen dar, was durch Bewegung verursacht wird:

$S^2=0$ entspricht einer vollständig unbeschränkten Bewegung der Bindungen (N-H oder C-H), während $S^2=1$ eine festgehaltene Bindungsorientierung bedeutet. Der Ordnungsparameter ist mit den statistischen mechanischen Eigenschaften des Biomoleküls [22,23,25] verbunden, daher kann die Änderung des aus NMR-Daten abgeleiteten Ordnungsparameters als Zeichen der lokalisierten Beiträge an der Gesamtentropie des Systems dienen.

Wenn es keine Korrelation zwischen lokaler Dynamik und globaler Rotationsdiffusion eines Protein gibt, wie es eigentlich beim modellfreien Ansatz angenommen wird, kann die allgemeine Korrelationsfunktion, die die Relaxationseigenschaften von ^{15}N (^{13}C) bestimmt, so dargestellt werden ($\tau_{fast}, \tau_{slow} \ll \tau_c$) [22]:

$$C(t) = C_{ovrl}(t) C_{loc}(t) \quad (18),$$

wobei $C_{ovrl}(t)$ die Autokorrelationsfunktion der dipolaren Vektorwechselwirkung ^{15}N - ^1H (^{13}C - ^1H) für Festkörperrotation ist, die für den allgemeinen Fall anisotrop ist. Für den einfachsten Fall isotroper Rotation mit charakteristischer Korrelationszeit τ_c gilt [22,26]:

$$C_{ovrl}(t) = \frac{1}{5} e^{-t/\tau_c} \quad (19).$$

Laut des Formalismus von Lipari & Szabo [22,23] und auch im verallgemeinerten Modell von Clore et al. [28] können mikrodynamische Parameter aus Spektraldichtefunktionen mittels folgender Formel bestimmt werden [21-23]:

$$J(\omega) = \frac{2}{5} \left[\frac{S^2 \tau_c}{1 + (\omega \tau_c)^2} + \frac{(S_{fast}^2 - S^2) \tau}{1 + (\omega \tau)^2} \right] \quad (20),$$

wobei $\tau = \tau_{loc} \tau_c / (\tau_{loc} + \tau_c)$.

D.h. der modellfreie Ansatz beruht auf Spektraldichteparametrisierungen mit Einsatz von wenigen Approximationsparametern, wodurch sich eine Möglichkeit ergibt, die Gleichungen (13-15 und 20) zu lösen.

2.1.8 Dynamikanalyse

Globale Rotation

Globale Rotation eines Biomoleküls in Lösung ist eine Hauptquelle der Reorientierung von NH/CH-Bindungen im Laborsystem und leistet so einen Hauptbeitrag zur ^{15}N (^{13}C)-Relaxation [22,26]. Die adäquate Deutung der Globalrotation und ihre Trennung von der Lokalbewegung ist somit ein Schlüssel für eine präzise Analyse der Dynamik eines Proteins oder einer RNA in Lösung. Diese Aufgabe ist nicht trivial, weil (1) globale und lokale Dynamik verbunden sein können (z.B. wenn beträchtliche Segmentalbewegung vorhanden ist) und (2) eine Anisotropie von globaler Rotationsdiffusion vorliegen kann, die die fast immer nicht ideal sphärische Molekülform widerspiegelt.

Berechnung des Rotationsdiffusionstensors

Für den Fall zugänglicher Strukturinformation können die Komponenten des Rotationsdiffusionstensors mittels Minimierung einer Zielfunktion bestimmt werden [26]:

$$\chi^2 = \sum_i \left[\frac{\rho_i^{\text{exp}} - \rho_i^{\text{calc}}}{\sigma_{\rho_i}} \right]^2 \quad (21)$$

wobei ρ^{exp} den experimentell ermittelten Wert $\{2R'_2/R'_1 - 1\}^{-1}$ darstellt; ρ^{calc} – einen Wert, der für einen bestimmten Satz von Hauptachsen und Eigenwerten des Rotationsdiffusionstensors berechnet ist; σ_{ρ_i} der experimentelle Fehler in ρ_{exp} ist, wobei die Summation über alle internukleare Vektoren durchgeführt wird.

Die Minimierung der Zielfunktion für den axialsymmetrischen Tensor stellt die Suche von Tensoreigenwerten $\{D_{\parallel}, D_{\perp}\}$ und Eulerwinkeln $\{\varphi, \theta\}$ im 4D-Raum dar. Für den allgemeinen Fall eines vollständig anisotropen Rotationsdiffusionstensors, muss man 6 Parameter bestimmen: 3 Eigenwerte und 3 Eulerwinkel [29,30]. Obwohl die 6-Parameter-Suche einen genaueren Tensor liefern kann, ist sie immer mit größeren Rechenfehlern verbunden. Die Tensorparameter werden für die weitere Analyse der Biomoleküldynamik benutzt, nämlich für die Analyse von Bewegungen einzelner Resten [26].

Dynamik von NH-Bindungen

Wir betrachten jetzt die Methode, die benutzt wurde, um mikrodynamischen Parameter für jede NH-Gruppe aus den ^{15}N -Relaxationsdaten zu berechnen (diese Methode ist in das Computerprogramm DYNAMICS von D. Fushman et al. [24,31,32] implementiert). Gleiches gilt auch für die CH-Bindungen. Die Methode beruht auf der modellfreien Parametrisierung der Spektraldichte. Je nach der Zahl der zugänglichen experimentellen Parameter, können sieben verschiedenen Modelle für die Spektraldichteberechnung betrachtet werden, wobei die Anzahl der

Approximationsparameter von 1 bis 5 variieren kann (Tabelle 2). Dabei wird folgendes Prinzip verwendet: wenn für vorhandene Relaxationsdaten mehr als ein Modell passt, wird das einfachere Modell angenommen.

Tabelle 2: Approximationsparameter im Lipari & Szabo-Modell für die Dynamikanalyse laut Beziehung (21) [24,26]:

Modell	S^2	τ_{loc}	S^2_{fast}	τ_{fast}	R_{ex}	N_{par}	Anmerkung
A	x	0	1	0	0	1	Lipari & Szabo-Modell (1982); $\tau_{loc} \ll \tau_{rot}$
B	x	x	1	0	0	2	
C	x	0	1	0	x	2	
D	x	x	1	0	x	3	
E	x	x	x	0	0	3	Verfeinertes Modell von Clore et al. (1990). S^2_{fast} und τ_{fast} charakterisieren schnelle Lokalbewegungen, S^2/S^2_{fast} und τ_{loc} charakterisieren langsame Lokalbewegungen. Für Korrelationszeiten gilt: $\tau_{fast} \ll \tau_{loc} < \tau_{rot}$
F	x	x	x	x	0	4	
G	x	x	x	0	x	4	
H	x	x	x	x	x	5	

„x“ weist auf verwendete Approximationsparameter hin, N_{par} stellt die Anzahl der Approximationsparameter dar. Werte „1“ oder „0“ bedeuten, dass entsprechende Parameter zur Approximation nicht herangezogen bzw. konstant bei entsprechenden Werten gehalten werden, so dass ein Modell ohne diese Parameter verwendet wird [24].

Für jedes Bewegungsmodell werden alle Parameter mittels Minimierung der folgenden Zielfunktion ermittelt:

$$\chi_i^2 = \sum_k (R_{k,i}^{exp} - R_{k,i}^{calc})^2 / \sigma_{k,i}^2 \quad (22)$$

wobei der Index k alle gemessenen Relaxationsparameter für den Rest i nummeriert, σ_k den experimentellen Fehler in R_k bedeutet und die Bezeichnungen „exp“ und „calc“ den experimentellen und berechneten Werten entsprechen. Die Dynamik wurde auch mittels der Programme „Quadric Diffusion“ und „ModelFree“ [33-35] analysiert. In diesen Programmen ist die gleiche Methodologie implementiert, nur die Berechnungsalgorithmen sind unterschiedlich.

2.1.9 Quantenmechanische Beschreibung

Relaxation, d.h. der Systemübergang zum Gleichgewichtszustand wird durch Übergangswahrscheinlichkeiten zwischen den Energieniveaus bestimmt [36,37]. Diese Übergangswahrscheinlichkeiten hängen ab von Fluktuationen eines Hamilton-Operators, der die Relaxation beschreibt und, besonders, von jenen Frequenzkomponenten der Fluktuationen, die den Übergangsfrequenzen entsprechen.

Der Hamilton-Operator, der ein Spinsystem beschreibt, kann in zwei Komponenten aufgeteilt werden: Spinfunktion und Raumfunktion, wobei die letztere alle Zeitfluktuationen enthält. Für dipolare Wechselwirkung zwischen zwei Spins I und S kann der Operator wie folgt dargestellt werden [36]:

$$\hat{H}(t) = \frac{\mu_0 \gamma^2 \hbar^2}{4\pi r^3(t)} (\hat{I}(t) \cdot \hat{S}(t) - \frac{3}{r^2(t)} (\hat{I}(t) \cdot r(t)) (\hat{S}(t) \cdot r(t))) = \frac{\mu_0 \gamma^2 \hbar^2}{4\pi r^3(t)} \sum_{m=-2}^2 (-1)^m Y_{2,-m}(\theta(t), \phi(t)) \hat{T}_{2,m}(I, S) \quad (23),$$

mit $\hat{T}_{2,m}(I, S)$ - irreduzibeler Spinoperatortensor 2. Ordnung, $Y_{2,-m}(\theta, \phi)$ - sphärische Potentialfunktion 2. Ordnung, $r(t)$ - der internukleare Vektor, $\theta(t)$ und $\phi(t)$ zeitabhängige Polarwinkel im Laborsystem, γ - gyromagnetische Konstante des Protons, μ_0 - magnetische Permeabilität des Vakuums.

In [36] wurde gezeigt, dass die Zeitkorrelationsfunktion, die die Relaxation bestimmt, wie folgt dargestellt werden kann:

$$C(\tau) = \frac{1}{5} \sum_{m=-2}^2 C^{mm}(\tau) = \left\langle \frac{P_2(\cos \chi_{t,t+\tau})}{r^3(t)r^3(t+\tau)} \right\rangle \quad (24),$$

wobei $C^{mm}(\tau)$ - die Fourier-Koeffizienten der Spektraldichtefunktion sind, $P_2(x) = \frac{3}{2}x^2 - \frac{1}{2}$ - Legendre-Polynome der 2. Ordnung, $\chi_{t,t+\tau}$ Winkel zwischen Positionen eines internuklearen Vektors zu Zeitpunkten t und $t + \tau$.

Die normierte Zeitkorrelationsfunktion kann man auf folgende Weise berechnen [36]:

$$C(\tau) = \left\langle r^{-6}(t) \right\rangle^{-1} \left\langle \frac{P_2(\cos \chi_{t,t+\tau})}{r^3(t)r^3(t+\tau)} \right\rangle, \quad (25),$$

Den Ordnungsparameter S^2 und die charakteristische Korrelationszeit der lokalen Bewegungen τ_{loc} kann man so bestimmen [25,36]:

$$S^2 = C(\infty) = \frac{4\pi}{5} \sum_{|M| \leq 2} \left| \langle Y_{2M}(\theta, \varphi) \rangle \right|^2 = \frac{4\pi}{5} \sum_{|M| \leq 2} \left| \frac{1}{T} \int Y_{2M}(\theta_t, \varphi_t) dt \right|^2 \quad (26)$$

$$\tau_{loc} = \frac{1}{C_1 - S^2} \int (C(t) - S^2) dt \quad (27),$$

wobei $C_1 = C(\Delta t)$ ist (Δt =Schrittweite).

2.2. Simulation der Molekulardynamik

2.2.1 Struktur von Kraftfeldern

Um Protein- und RNA-Strukturen zu beschreiben, sind quantenchemische Rechnungen nicht notwendig, da man deren Molekularbewegung mittels klassischer Mechanik beschreiben kann. Hierbei unterscheidet man zwischen zwei Möglichkeiten: Newton'sche Bewegungsgleichungen (Molekulardynamik) oder Langevin'sche Bewegungsgleichungen (stochastische Dynamik) [14,38].

Bei Molekulardynamik-Simulationen werden Atome wie Punktmassen betrachtet, denen laut festgesetzter Temperatur eine kinetische Energie in Form eines Geschwindigkeitsvektors zugeschrieben wird. Z.Z. gibt es eine Reihe von verschiedenen Computerprogrammen (GROMOS, CHARMM, SYBYL, AMBER) [38], die diese Näherung für die MD-Simulation verwenden. Unterschiede in den zugrundeliegenden Parametrisierungen und zwar in Funktionen und Konstanten des Kraftfeldes, können zu verschiedenen Ergebnissen bei der zeitlichen Beschreibung von Diederwinkeln, Seitenkettenrotationen etc. führen. Aber auf jeden Fall sollte das Ziel der Strukturinterpretation jeweils der Abgleich mit den zur Verfügung stehenden experimentellen Daten sein [14,16,38].

Newton'sche Bewegungsgleichungen für ein System aus N Atomen der Masse m_i mit Positionen x_i kann man folgendermaßen formulieren:

$$m_i \frac{d^2}{dt^2} x_i(t) = - \frac{\partial}{\partial x_i} U(x_1, x_2, \dots, x_N) \quad i = 1 \dots N \quad (28)$$

Die potentielle Energie ergibt sich aus dem Kraftfeld, das mindestens aus den folgenden Termen besteht [14,38,39]:

$$U(R) = \frac{1}{2} \sum_i K_r (r - r_{eq})^2 \quad \text{- kovalente Bindungen} \quad \{1\} \quad (29)$$

$$+ \frac{1}{2} \sum_i K_\theta (\theta - \theta_{eq})^2 \quad \text{- Bindungswinkel} \quad \{2\}$$

$$+ \sum \frac{V_n}{2} (1 + \cos[n\phi - \gamma]) \quad \text{- freie Diederwinkel} \quad \{3\}.$$

Das sind pseudoharmonische Potentiale, die Bindungslängen, Bindungswinkel und Diederwinkel einschränken. Zudem müssen auch Van-der-Waals'sche und Coulomb'sche Wechselwirkungen berechnet werden:

$$+ \sum_{i < j} \frac{A_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{R_{ij}^6} - \text{Van-der-Waals'sche Wechselwirkung} \quad \{4\}$$

$$+ \sum_{i < j} \frac{q_i q_j}{\epsilon R_{ij}} - \text{Coulomb'sche Wechselwirkung} \quad \{5\}$$

wobei {4} – das Lennard-Jones-Potential ist, welches anziehende und abstoßende Terme enthält, und {5} die Wechselwirkung zwischen zwei geladenen Teilchen beschreibt.

Die experimentellen Daten in der Form der Zwangskräfte können folgendermaßen [39] berücksichtigt sein:

$$+ \frac{1}{2} \sum_{ij} k_{r_{ij}} (r_{ij} - r_{ij}^{\text{exp}})^2 - \text{Abstandsrestriktions-Potential} \quad \{6\}$$

$$+ \frac{1}{2} \sum_i k_{\varphi_i} (1 + \cos[\varphi_i - \delta_i])^2 - \text{J-Restriktions-Potential} \quad \{7\}$$

$$+ \frac{1}{2} \sum_i k_{r_i} (r_i - r_0)^2 - \text{Positionen-Festlegungen} \quad \{8\}.$$

Dabei stellen experimentellen Daten die Einschränkungen der Struktur „constraints“ dar, die im Laufe der Berechnung berücksichtigt werden sollen.

Ohne Einführung von Näherungen zur Reduzierung der Summationsglieder wäre eine vernünftige Simulationsdauer für Biomoleküle (Systeme mit > 2000 Atome) nicht erreichbar. Die wichtigsten Vereinfachungen sind folgende [14,38]:

- Energetische Beträge der Änderungen von Bindungslängen werden mittels des SHAKE-Algorithmus vernachlässigt, dabei wird die Länge der Bindungen bei den elementaren Schritten der Modellierung bis zu 1-2 fs festgehalten. Dies beeinflusst die Beschreibung von Winkeln nicht ideal und so die berechneten Eigenschaften beeinflussen kann.
- Bei der Rechnung werden nur nächstbenachbarte Atome verwendet. Dies wird mittels Einführung eines s.g. Ausschlussradius („cutoff“) erreicht.
- Durch Translation wird das System in die Raumrichtungen kopiert. Makroskopische Größen werden mit einer begrenzten Zahl von Lösungsmittelmolekülen berechnet.

2.2.2 Algorithmen von Energieminimierung und Äquilibration

Energieminimierung

Eine Energieminimierung ist die Suche nach dem nächsten lokalen Minimum der potentiellen Energie einer Struktur. Es gibt verschiedene Minimierungsalgorithmen, wobei die am

häufigsten verwendeten die Methode des steilsten Abstiegs („steepest descent“), die Methode konjugierter Gradienten („conjugated gradients“, Powell) und die (quasi) Newton-Raphson-Methode [16,38] sind. Alle diese Methode ändern physikalisch Atompositionen im kartesischen Raum mit dem Ziel einen Potentialtopf (lokales Minimum) zu erreichen. Obwohl die Abstiegs geschwindigkeit für die Methode des steilsten Abstiegs in Anfangsstadium schnell genug ist, ist sie nicht konvergent und kann oft große Oszillationen neben einem Minimum hervorrufen. Diese Methode kann zur Strukturen führen, die aus dem Potentialtopf zur höher liegenden Niveaus „hinaufgehen“ [14,16]. Bei der Minimumsuche mit der Methode des steilsten Abstiegs wird das Minimum auf der Gerade des lokalen Gradienten gesucht, dann wird die Richtung um 90° geändert und der Prozess wird wiederholt.

Die Methode konjugierter Gradienten erreicht das Minimum langsamer, ist aber stabil konvergent; diese Methode kann erfolgreich für instabile Anfangsstrukturen verwendet werden. Das Hauptprinzip dieser Methode besteht darin, dass bei Berechnung der neuen Richtung der vorhergehende Gradient beachtet wird.

Der Newton-Raphson-Algorithmus enthält eine explizite Berechnung der 2. Ableitung und eine Suche des Gradientenminimums 2. Ordnung. Nachteile dieser Methode sind die Möglichkeit, einen Sattelpunkt zu treffen und ein großer Rechneraufwand. Meistens wird eine Kombination aus zwei Methoden verwendet, so wird für Biomoleküle oft folgendes Verfahren eingesetzt: Nach etwa 200-500 Schritten mit der Methode des steilsten Abstiegs folgen etwa 500-2000 Minimierungsschritte mit der Methode konjugierter Gradienten oder einem modifizierten Newton-Raphson Algorithmus [16,38]. Die Minimierung kann entweder unter Einfluss der experimentellen Daten oder ohne diese durchgeführt werden, wobei längere Minimierungen ohne experimentelle Daten (und ohne Lösungsmittelmoleküle) zu Strukturen führen können, die weit von den experimentellen kristallographischen oder NMR-Strukturen liegen. Deswegen wurde die Zahl der Minimierungsschritte in allen Experimenten nicht über 2000 gewählt und die Minimierung immer im System von Protein/RNA mit dem Lösungsmittel zusammen durchgeführt.

Algorithmen der Äquilibration

MD-Simulationen von Makromolekülen im Lösungsmittel bestehen meist aus einer Äquilibrationsperiode [38,40,41], die zwischen 10 und 100 Pikosekunden dauern kann, und deren Ziel die Relaxation des Systems ist sowie der eigentlichen Trajektorie. Der nichtstationäre Anfangsabschnitt der Trajektorie wird bei Berechnung der Gleichgewichtszustandscharakteristika nicht betrachtet.

Die Äquilibrationsprotokolle können sehr unterschiedlich sein [40]. Einige Protokolle verwenden einen langsamen schrittweisen Temperaturanstieg, während andere grober sind und einen

linearen Temperaturgradienten verwenden, der das System bis zur erwünschten Temperatur erwärmt. In dieser Arbeit wurden drei verschiedene Äquilibrierungsprozeduren verwendet [40-42].

2.2.3 Informationen aus der MD-Simulation

Durch eine MD-Simulation bekommt man eine sogenannte Trajektorie, in der die Koordinaten von allen Atomen im System für jeden Zeitpunkt (in Abständen der gewählten Schrittweite) abgespeichert sind. Aus diesen Koordinaten werden mittels geeigneter Prozeduren Charakteristika der MD-Simulation berechnet. Energie-, Temperatur- und Dichteverlauf stellen dabei Kontrollparameter der MD-Simulation dar. Sie zeigen, ob das System während der MD-Simulation stabil ist und ob die Äquilibrierung konvergent verlief. Bei einem stabilen Systemzustand können die MD-Charakteristika berechnet werden.

RMSD: Einer der wichtigsten Charakteristika von MD-Simulationen ist der RMSD-Wert, der entweder für das ganze Molekül oder für einige Molekülteile und einzelne Reste berechnet werden kann. Die allgemeine Formel sieht wie folgt aus [38]:

$$RMSD = \frac{\sqrt{\sum (x_{i1} - x_{i2})^2 + (y_{i1} - y_{i2})^2 + (z_{i1} - z_{i2})^2}}{\sqrt{N}} \quad (30).$$

Der RMSD-Wert charakterisiert die strukturelle Übereinstimmung von Molekülen oder –Teilen und stellt die Mittelquadratabweichung der Koordinaten von einem Vergleichskordinatensatz dar. RMSD-Fluktuationen für ein Atom i können nach folgender Formel ausgerechnet werden:

$$RMSD_{fl}^i = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (r_{i,j} - r_{i,av})^2} \quad (31).$$

B-Faktor: Dieser charakterisiert die Beweglichkeit von einzelnen Resten und kann nach folgender Formel berechnet werden [38]:

$$B_j = \frac{8}{3} \pi^2 (RMSD_j^{fl})^2 \quad (32).$$

Die einzelnen Strukturen einer MD-Trajektorie sind, im Gegensatz zu denen aus Monte Carlo-Simulationen, zeitlich gekoppelt. Sie eignen sich daher zur Berechnung zeitabhängiger Eigenschaften wie:

Kreuzkorrelation zweier beliebiger Parameter:

$$c_{xy} = \frac{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i y_i}{\sqrt{(\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i^2)(\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N y_i^2)}} = \frac{\langle x_i y_i \rangle}{\sqrt{\langle x_i^2 \rangle \langle y_i^2 \rangle}} \quad (33) \text{ und}$$

Autokorrelation (Zeit-Korrelation einer Variable) [38]:

$$C_{vv}(t) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N v_i(t)v_i(0) \quad (34)$$

Diederwinkelanalyse

Der Diederwinkelverlauf kann die Stabilität eines gesamten Moleküls und einzelner Reste charakterisieren und Übergänge bzw. Änderungen in Konformationen zeigen [25,38]. Die Diederwinkel-Definition jeweils für Proteine und RNA ist in Abb. 2.5. dargestellt.

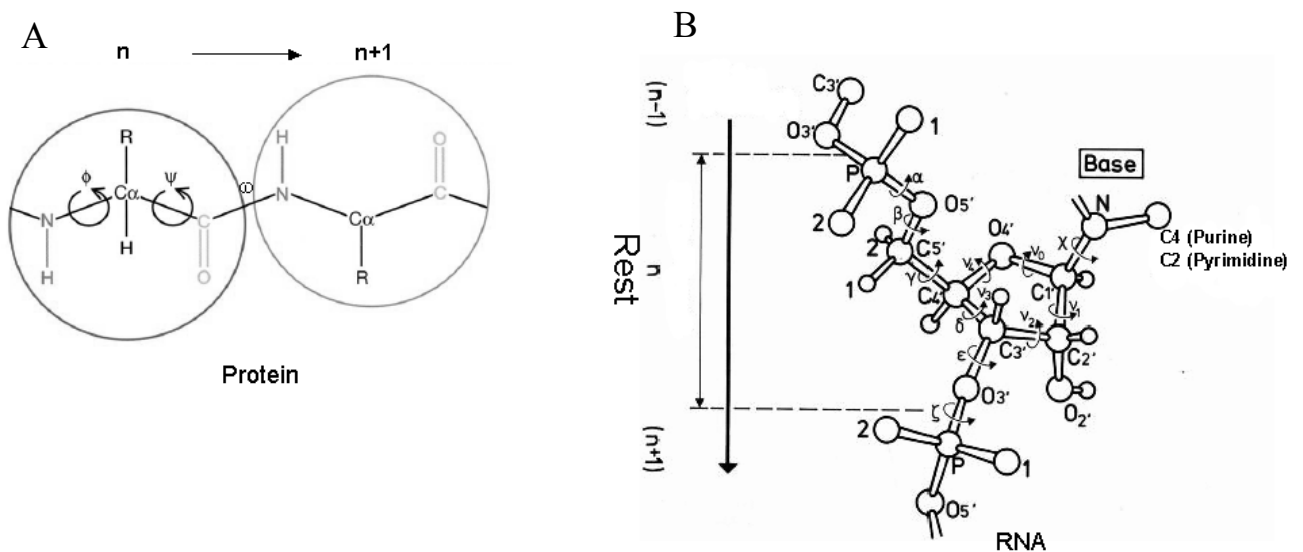


Abb. 2.5. Diederwinkel-Definition für Protein (A) und RNA (B) [38].

IRED-Analyse („Isotropic Restricted Eigenmode Dynamics“)

IRED stellt eine neu eingeführte Möglichkeit dar, die Trennbarkeit von Global- und Lokalbewegungen zu untersuchen, die Rechtmäßigkeit des modellfreien Ansatzes zu bestätigen und die Bewegungsbeiträge von einzelnen Moden sowie Kreuzkorrelationen zu untersuchen [43,44]. Das Hauptprinzip von IRED ist die Kollektivbeschreibung. In der IRED-Methode wird aus der Trajektorie die Kovarianzmatrix der $Y_{LM}(\Omega_j(t))$ -Funktionen ausgerechnet. $\Omega_j(t)$ sind Hauptachsen-Richtungen und Y_{LM} sind Legendre-Polynome 2.Ordnung (s. Punkt 2.1.10). Im folgenden Schritt wird die Kovarianzmatrix isotrop über alle möglichen Orientierungen gemittelt. Die durch isotrope Mittelung verursachte Kugelsymmetrie führt zu einer wesentlichen Vereinfachung der Kovarianzmatrix, wobei alle notwendigen Informationen in einer realen symmetrischen Matrix $M_{n \times n}$ mit Elementen M_{kl} stehen [43]:

$$M_{kl} = \overline{P_L(\cos(\Omega_k - \Omega_l))} \quad (35).$$

Reorientierungseigenmoden und ihre Amplituden sind Eigenvektoren $|m\rangle$ und Eigenwerte λ_m der Matrix \mathbf{M} , die die Gleichung $\mathbf{M}|m\rangle = \lambda_m|m\rangle$ (36) erfüllen.

Ein Maß für den Kollektivitätsgrad der Eigenmodi ist die Anzahl von Vektoren, die durch diese Modi beeinflusst werden. Die Kollektivität k bestimmt sich zu [43]:

$$k_m = \frac{1}{n} \exp \left\{ - \sum_{k=1}^n \| |m\rangle_k \|^2 \log \| |m\rangle_k \|^2 \right\} \quad (37),$$

wobei $|m\rangle_k$ die k -Komponente des genormten Eigenvektors $|m\rangle$ ist. k variiert zwischen $1/N$ und 1 und gibt den Anteil von Vektoren im Prozent, der von den Reorientierungseigenmoden $|m\rangle$ beeinflusst wird.

Als Maß für die Trennbarkeit der Global- und Lokalbewegungen wird der Trennbarkeitsindex definiert:

$$g_L = \sum_{i=1}^n \lambda_i / \sum_{i=1}^{n-(2L+1)} \lambda_i \quad (38),$$

wobei die Eigenwerte λ_i der Kovarianzmatrix entsprechend ihre Größe geordnet sind. Der Zähler entspricht der Spur der Kovarianzmatrix ($=n$), der Nenner entspricht der Spur der Kovarianzmatrix minus den $2L+1$ -größten Eigenwerten (Globalbewegung). Je größer g_L ist, desto besser ist die Trennbarkeit der Global- und Lokalbewegungen. Im Grenzfall eines rigiden Moleküls gilt: $g_L \rightarrow \infty$. Mittels IRED können Korrelationszeiten für einzelne Modi berechnet werden. Wenn die Korrelationsfunktion $C_m(t)$ exponentiell abfällt, kann die mit Mode $|m\rangle$ verbundene Korrelationszeiten wie folgt bestimmt werden [43]:

$$\tau_m \cong \frac{1}{C_m(0) - C_m(t \rightarrow T)} \int_0^T (C_m(t) - C_m(t \rightarrow T)) dt \quad (39)$$

$C_m(t \rightarrow T)$ symbolisiert den Plateau-Wert für $C_m(t)$.

Der Beitrag von Mode m zum Abfall der Korrelationsfunktion j -Wechselwirkung ist die Hauptkomponente des Ordnungsparameters:

$$\delta S_{j,m}^2 = \lambda_m (|m\rangle\langle m|)_{jj} \quad (40),$$

wobei $\delta S_{j,m}^2 \geq 0$ und $\sum_m \delta S_{j,m}^2 = 1$.

Signifikant große $\delta S_{j,m}^2$ für verschiedene Reste einer Mode zeigen eine Korrelation zwischen diesen Resten bezüglich dieser Mode.

Fourier-Analyse

Fourier-Analyse bietet die Möglichkeit, periodische Bewegungen in einem Molekül nachzuweisen und zu untersuchen sogar wenn diese Komponenten stark unterdrückt werden. Bei der Fourier-Analyse wird ein Signal in der Zeitdimension einer Fourier-Transformation unterzogen. Der Vorgang kann mit der Formel (8) aus Punkt 2.1.2 beschrieben werden. Da während der MD-Simulation die begrenzte Anzahl von Datenpunkten angenommen wird, ist die maximale Periode der zu beobachtenden Prozesse laut Nyquist-Theorem begrenzt. Für unseren Fall $t=40$ ns betrug die Periode des langsamsten noch detektierbaren Prozesses etwa 33 ns (2^{15} fs, da die Zeitperiode immer 2^n sein muss, wobei $n \in \mathbb{C}$). Mit dieser Methode können Diederwinkel, RMSD-Werte und andere Parameter analysiert werden.

3. EXPERIMENTELLER TEIL

3.1. NMR-Messungen

Die NMR-spektroskopischen Messungen wurden an den Spektrometern ^{UNITY}INOVA 600 MHz und ^{UNITY}INOVA 750 MHz (Varian) in der Arbeitsgruppe Molekulare Biophysik/NMR-Spektroskopie des FLI Jena durchgeführt. Diese Geräte sind 4-Kanal NMR-Spektrometer, bei denen Tripelresonanz-Probenköpfe für Probenröhrchen von 5 mm Durchmesser mit aktiv abgeschirmten Gradient genutzt wurden. Die Larmor-Frequenzen in MHz betragen:

Spektrometer	¹ H	¹³ C	¹⁵ N
Varian INOVA 600	599.825	150.826	60.780
Varian INOVA 750	750.195	188.636	76.017

3.1.1 Probenvorbereitung

Onkoprotein E7

Das Onkoprotein E7 lag in einheitlich ¹⁵N-markierter Form vor. Die verwendeten Proben waren zur Aufklärung der 3D-Struktur des Onkoproteins E7 von T. Seiboth hergestellt worden und wurden unverändert übernommen [6]. Die NMR-Proben hatten eine Konzentration von 1.0 mM U-[¹⁵N]-E7. Der NMR-Puffer enthält 20 mM Tris/HCl, pH 7.4 mit 100 mM NaCl, 0.2 mM EDTA und 10% v/v ²H₂O. Die Sequenz und Struktur des Onkoproteins E7 kann aus dem Kapitel 1.1 und der Abbildung 1.1 entnommen werden.

BEVSLD

Die 18mer Stemloop-D RNA (BEVSLD) des bovinen Enterovirus lag in einheitlich ¹⁵N,¹³C- markierter Form vor [10]. Die verwendeten Proben waren zur Aufklärung der 3D-Struktur von Y. Ihle hergestellt worden und wurden unverändert übernommen [45]. Die NMR-Proben haben Konzentration von 0.9 mM U-[¹⁵N,¹³C]-BEVSLD in H₂O und D₂O. Der NMR-Puffer enthält 10 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄, pH 6.2 mit 40 mM KCl, 0.2 mM EDTA and 10% v/v ²H₂O bzw. 99,99% v/v ²H₂O. Die Sequenz und Struktur des BEVSLD kann aus dem Kapitel 1.2 und der Abbildung 1.2 entnommen werden.

3.1.2 NMR-Spektroskopie/Relaxationsmessungen

Onkoprotein E7

Die NMR-Relaxationsmessungen für das Onkoprotein E7 wurden bei einer Temperatur von 293 K durchgeführt. Es wurden die ¹⁵N-Relaxationsparameter für die NH-Bindungen der Hauptkette bestimmt: Die Relaxationsgeschwindigkeiten R_1 , $R_{1\rho}$ und der steady-state HetNOE

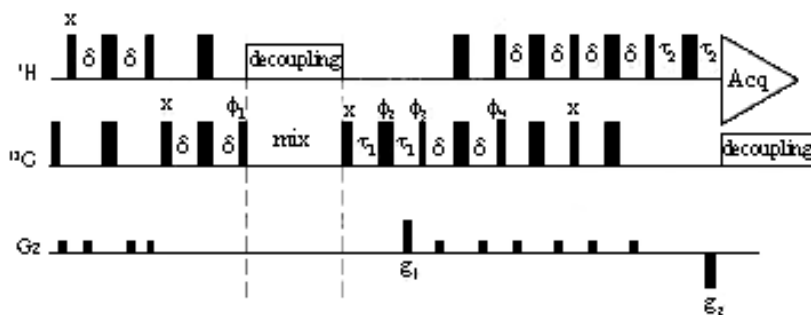
wurden mit Pulssequenzen entsprechend Farrow et al. [46-48] gemessen (Abb. 3.1). Alle Pulssequenzen bauen auf einem HSQC-Experiment auf. Ein „gradient-enhanced“ Pulsschema wurde verwendet, um die Wassersättigung zu minimieren. $R_{1\rho}$ wurde als „spin-lock“ gemessen, wie es im Abschnitt „Grundlagen“ und in [48] beschrieben wurde. R_2 konnte dann aus der folgenden Beziehung erhalten werden [48]:

$$R_{1\rho} = R_1 \cos^2(\arctan \frac{\omega_1}{\Omega}) + R_2 \sin^2(\arctan \frac{\omega_1}{\Omega}) \quad (41)$$

($\Omega = |\omega_{eff} - \omega_I|$ ist die chemische Verschiebung bezüglich der Eichfrequenz ω_I).

Da sowohl für das Onkoprotein E7 als auch für den BEVSLD $R_{1\rho} \approx R_2$ mit sehr hoher Genauigkeit gilt (besser als 0.5 %), wurden alle weiteren Analysen immer mit $R_{1\rho}$ statt R_2 durchgeführt.

T_1 - und $T_{1\rho}$ -Spektren wurden mit 2048 * 256 komplexen Datenpunkten in t_1 aufgenommen, wobei jeweils 16 Experimente pro t_1 Datenpunkt summiert wurden. HetNOE-Experimente wurden als 2k (t_2) * 300 (t_1) Realpunkte mit 96 Experimenten pro Inkrement akquiriert. 10 verschiedene Spektren wurden für eine T_1 -Messung aufgenommen, wobei die entsprechenden Relaxationsdelays 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 1.0 s betragen. $T_{1\rho}$ -Daten wurden mit folgenden Relaxations-



Das Schema für die E7-Messung kann durch Ersatz $^{13}\text{C} \rightarrow ^{15}\text{N}$ erhalten werden [47].

delays erhalten: 0, 0.005, 0.01, 0.02, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.1 s. Um Messfehler zu kontrollieren, wurde die Messung für den Relaxationsdelay = 0 in jeder Serie durchgeführt. Die Messung eines 2D-Spektrums dauerte ungefähr 8 Stunden. Das Intervall zwischen Übergängen („recycle delay“) für T_1 - und $T_{1\rho}$ -Messungen wurde auf 3 Sekunden gesetzt, während in HetNOE-Experimenten ein 5 s-Delay verwendet wurde. Der Fehler in den HetNOE-Werten wurde wie in [49] mit 5 % angenommen. Die Relaxationsdaten wurden nach Anwendung einer quadrierten Kosinusfunktion zur Apodisierung in eine Datenmatrix mit 2048*1024 realen Punkten Fourier-transformiert. Nach der Fourier-Transformation wurden die Spektren für das Erhalten eines rein absorptiven Signals entsprechend phasiert.

BEVSLD

Die NMR-Relaxationsmessungen für den BEVSLD wurden für C1'-H1'-Atome der Ribose und C2-H2, C6-H6, C8-H8-Atome der Basen bei einer Temperatur von 298 K durchgeführt. T_1 - und $T_{1\rho}$ -Daten für Base (und Ribose) wurden als 2k (2k) * 128 (256) komplexe Datenpunkte in t_1 in 16 (16) Experimenten aufsummiert. Die HetNOE-Experimente wurden als 2k (t_2) mal 300 (t_1) Realpunkte mit 96 Experimenten pro Inkrement aufgenommen. Die Relaxationsdelays für T_1 - und $T_{1\rho}$ -Messungen und „recycle delays“ waren gleich den entsprechenden Werten für die Onkoprotein E7-Messungen. Die Apodisierung, Phasierung und FT wurde wie für das Onkoprotein E7 beschrieben durchgeführt.

3.1.3 Datenanalyse

Die NMR-Spektren wurden mittels VNMR (Varian Assoc., Palo Alto, USA) prozessiert. Dann wurden sie mittels des Programms varian_xeas2d in das XEASY-Format konvertiert und mit den Programmen XEASY [50] und CARA [51] analysiert. Die Kreuzsignalintensität wurde aus dem Peak-Volumen berechnet. T_1 - und $T_{1\rho}$ -Raten wurden durch Kurvenanpassung der Kreuzsignalintensitäten für verschiedenen Relaxationsdelays an die Funktion $I=I_0\exp(-\tau/T_1)$ (42) mittels des Programms RELAXFIT [24] erhalten. Die Fehler wurden als Anpassungsfehler bestimmt.

$\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N (^{13}C) heteronukleare NOEs wurden als Verhältnis der $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N (^{13}C) Kreuzsignalintensitäten in Spektren, die mit oder ohne 3 Sekunden Protonensättigung akquiriert wurden bestimmt [26].

Die Berechnung des Rotationsdiffusionstensors aus den Relaxationdaten wurde mit Hilfe der Programme RotDif [29] und QuadricDiffusion [35] durchgeführt. Die zugrundeliegenden Approximationsprozeduren wurden von Fushman et al. [24] und Tjandra et al. [27] beschrieben und wurden im Abschnitt Grundlagen ausführlich diskutiert. Zur weiteren Analyse wurden die Programme DYNAMICS [24,31,32], HYDRONMR [30,52], ModelFree [34,35] verwendet. Alle Rechnungen wurden auf Arbeitsplatzrechnern SILICON GRAPHICS (USA) der Arbeitsgruppe Molekulare Biophysik/NMR-Spektroskopie am FLI Jena durchgeführt. Mathematische Analyse und graphische Darstellungen wurden mittels des Software-Paketes MATLAB 6.5 [53], Microsoft Excel 2000, ADOBE PHOTOSHOP und selbst geschriebenen Routinen in der Programmiersprache Delphi erstellt.

3.2 MD-Simulation

Für die MD-Simulation wurde das Programmpaket AMBER 8.0 („Assisted Model Building With Energy Restraints“) [39,54] verwendet. Die Rechnungen wurden auf den SILICON GRAPHICS-Computern und auf dem Linux-Cluster des FLI Jena durchgeführt. Dabei wurden die SILICON GRAPHICS-Arbeitsplatzrechner generell für die Modellvorbereitung und die Energieminimierung verwendet, während auf dem Linux-Cluster die Äquilibration und der Produktions-MD-Lauf durchgeführt wurde. Für die MD-Simulation wurde als Startstruktur jeweils die Struktur verwendet, die der mittleren Struktur des NMR-Strukturbündels am nächsten kam (RMSD - klein). Die Vorbereitung von Modellen und der Topologie wurde mittels der Programme Xleap (AMBER 8.0) [54], SYBYL und MolMol [7] durchgeführt. Die Visualisierung von Molekülen wurde mittels der Programme Sybyl, MolMol, VMD [55] erreicht. Die numerische Bearbeitung der Trajektorien wurde mittels des Paketes ptraj (AMBER 8.0 [39,56]) durchgeführt, das erlaubt, Diederwinkel, Entfernungen, Koordinaten von Atomen, Korrelationsfunktionen zu extrahieren. Zur weiteren Bearbeitung wurden die Programmpakete MATLAB 6.5 und Microsoft Excel 2000 verwendet.

3.2.1 Onkoprotein E7

Als Startkonformation für die 40 ns MD-Simulation wurde eine NMR-Struktur eines Monomers verwendet, die von Ohlenschläger et al. in unserer Arbeitsgruppe erhalten wurde [6]. Die Gründe für die Verwendung eines Monomers statt eines Dimers werden im Kapitel 4.2.1 ausdrücklich erklärt.

Für die Simulation wurde das modifizierte AMBER-Kraftfeld von 1994 (Cornell 1996) [39,54] verwendet. Da es in den Bibliotheksdatensätze, die dieses Feld beschreiben, keinen Eintrag für Zink gibt, welches ein Strukturelement von E7 ist, wurden diese Datensätze entsprechend modifiziert, wozu die Zinkparametrisierung aus [57,58] verwendet wurde. Diese Struktur wurde in einen Oktaeder mit Kantenlänge 5.75 nm eingepasst (oder in einen rechtwinkligen Kasten („box“) mit den Kantenlängen 5,47 nm/5.03 nm/4.70 nm im 2. Experiment). Der Oktaeder (der Kasten) wurde mit 4550 (4004) Wassermolekülen gefüllt, dann wurde ein Wassermolekül gegen ein Chloridion ausgetauscht, das zur Kompensation des Ladungsüberschusses an den Aminosäureseitenketten dient. Dabei wird das Gegenion an der Stelle des höchsten Positivpotentials eingefügt. Um den möglichen Einfluss von verschiedenen Methoden der Äquilibration auf die Ergebnisse der MD-Simulation und auch den Einfluss von verschiedenen Schrittweiten zu bewerten, wurden mehrere MD-Simulationen mit verschiedenen Startparametern und Prozeduren durchgeführt. Die zweischrittige Energieminimierung [39,42] war für alle MD-Läufe identisch:

1) „Restrained“ Energieminimierung von insgesamt 1000 Schritten (250 Schritte mit der Methode des steilsten Abstiegs, dann 750 Schritte mit der Methode konjugierter Gradienten).

2) „Unrestricted“ Energieminimierung von 500 Schritten mit der Methode des steilsten Abstiegs, dann 1000 Schritte mit der Methode konjugierter Gradienten.

Es wurde verschiedene Äquilibrierungsprotokolle verwendet:

Das Äquilibrierungsprotokoll 1 hatte 10 Schritte (nach Prof. Dr. M. Zacharias, IUB Bremen, persönliche Kommunikation) und besteht im allmählichen Erwärmen des Systems von 50 bis zu 300 K (die ersten 4 Schritte) unter voller Wirkung der Distanzeinschränkung, und dann allmählicher Reduzierung des Restraintscoeffizienten (die folgenden 6 Schritte). Die Gesamtdauer beträgt 150 ps.

Das Äquilibrierungsprotokoll 2 hat 3 Schritte [41], ist schneller und verzichtet auf Distanzeinschränkungen:

1) Systemerwärmung von 100 bis 300 K bei konstantem Volumen im Laufe von 10 ps,

2) Äquilibrierung bei konstantem Druck und Temperatur für 10 ps.

Da nach 10 ps das System seinen Gleichgewichtszustand nicht erreicht hatte, wurde noch ein Äquilibrierungsschritt durchgeführt:

3) Äquilibrierung bei konstantem Druck und Temperatur für 100 ps.

Das Äquilibrierungsprotokoll 3 hat sechs Schritte ist eine Zusammenstellung aus den Protokollen 1 und 2:

1) Etappen 1-5: schrittweise Erwärmung des Systems von 50 K bis zu 300 K während 60 ps,

2) Etappe 6: Äquilibrierung bei konstantem Druck und Temperatur während der nächsten 100 ps.

Insgesamt wurden 3 MD-Läufe durchgeführt. Die MD-Simulationen 1 und 2 benutzen die Äquilibrierungsprotokolle 1 und 2 mit Schrittweiten von bzw. 2 und 1 fs (SHAKE-Algorithmus) und MD-Simulation 3 baut auf das Äquilibrierungsprotokoll 3 mit einer Schrittweite von 1 fs auf. Im Abschnitt „Ergebnisse“ wird der MD-Lauf 3 analysiert, weil er die besten Ergebnisse geliefert hat.

3.2.2 BEVSLD

Die Modellvorbereitung für den BEVSLD wurde ähnlich wie für das Onkoprotein E7 durchgeführt. Die Struktur wurde in einen Oktaeder mit Kantenlänge 5.30 nm eingepasst. Der Oktaeder wurde mit 3631 Wassermolekülen gefüllt, dann wurden 17 Wassermoleküle gegen 17 Na⁺ Ionen ausgetauscht, die zur Kompensation von Ladungsüberschüssen der RNA dienen. Dabei werden Gegenionen an der Stelle der niedrigsten Negativpotentiale eingefügt. Auch hier wurden verschiedene Äquilibrierungsmethoden getestet. Die erste Prozedur der Äquilibrierung für die RNA

war der Prozedur 1 für das Onkoprotein E7 ähnlich, die Prozeduren 2 und 3 für RNA hatten sechs Schritte:

- 1) Etappen 1-5: schrittweise Erwärmung des Systems von 50 K bis zu 300 K während 60 ps,
- 2) Etappe 6: Äquilibrierung bei konstantem Druck und Temperatur während der nächsten 100 ps.

Insgesamt wurden 3 volle MD-Simulationen durchgeführt, wobei die MD-Simulationen 1 und 2 mit dem Kraftfeld 1996 und mit den Äquilibrierung-Protokollen 1 und 2 bei einer Schrittweite von 2 bzw. 1 fs (SHAKE-Algorithmus) gemacht wurden. Der MD-Lauf 3 wurde mit dem Kraftfeld vom 2003 mit dem Äquilibrierungsprotokoll 3 und einer Schrittweite von 1 fs durchgeführt. Einer weiteren Analyse wurde der MD-Lauf 3 unterzogen, da er die stabilsten Ergebnisse geliefert hat.

4. ERGEBNISSE

4.1 NMR-Spektroskopie

4.1.1 Onkoprotein E7

Da das Onkoprotein E7 in der Lösung immer Dimere ausbildet, liefern die NMR-Experimente an E7 immer Dimerdaten und müssen als solche analysiert werden. Dazu wurden die Prozeduren und Methoden entsprechend modifiziert.

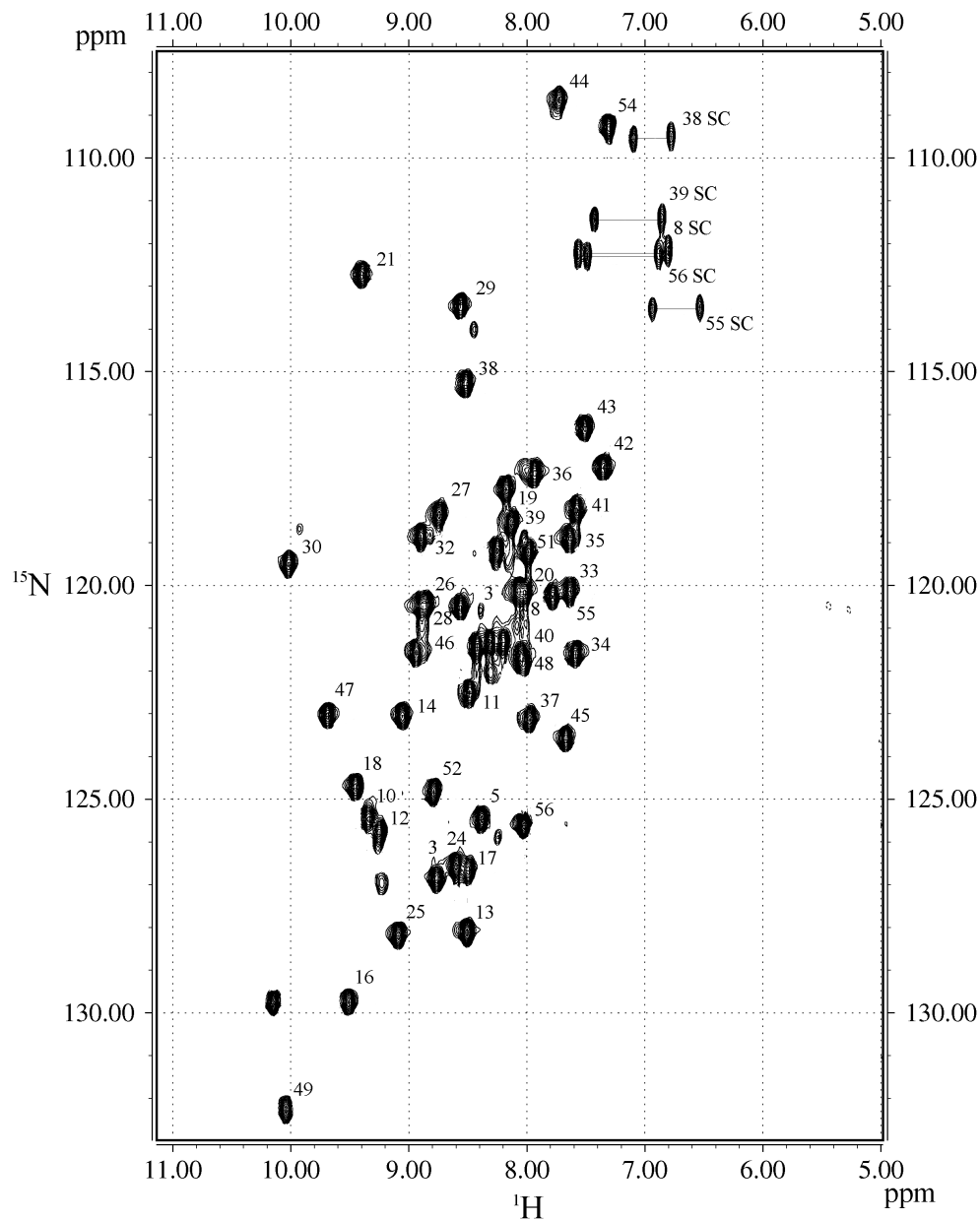
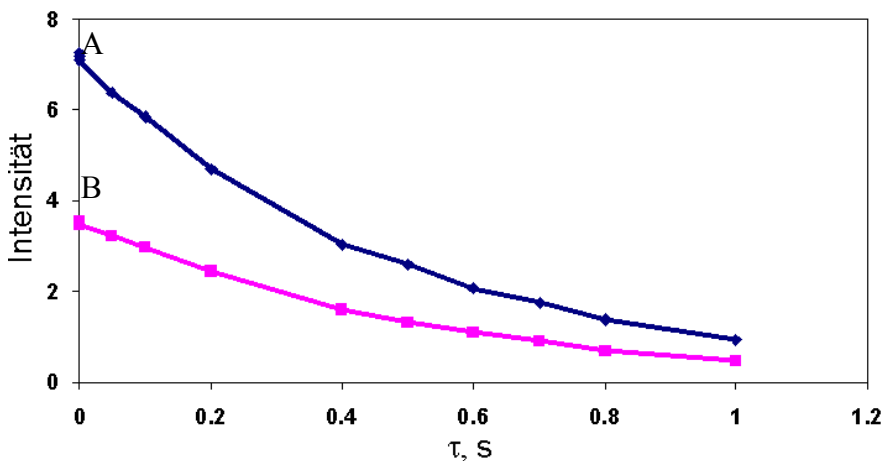


Abb. 4.1. $\{^1\text{H}\text{-}^{15}\text{N}\}$ HSQC-Spektrum für das Onkoprotein E7 (R_f -Messung, Relaxationsdelay 300 ms). Zahlen geben Aminosäurepositionen in der Sequenz an.

In Abb. 4.1 ist ein typisches HSQC-Spektrum für das Onkoprotein E7 dargestellt. Es sind 49 NH-Signale für das 56 AS lange Molekül zu erkennen, da die Aminosäuren 1 – 4 aufgrund großer Beweglichkeit des N-Terminus des Moleküls nicht observierbar sind und Pro7 und Pro50 wegen des fehlenden H^N-Protons nicht mit diesem Spektrum detektiert werden können. Die Spektren für $R_{I\rho}$ und den heteronuklearen NOE sehen analog den R_I -Spektren aus. Aus diesem Satz von R_I -, $R_{I\rho}$ - und HetNOE-Daten wurden die Werte für Auto- und Kreuzrelaxationsgeschwindigkeiten entsprechend (42) extrahiert und berechnet.

Typische Kurven für den R_I - und $R_{I\rho}$ -Verlauf sind in Abb. 4.2 dargestellt. Die Kurven wurden auf eine einfache Exponentialkurve gefittet und entsprechende Werte für R_I -, $R_{I\rho}$ - sowie HetNOE sind in Abb. 4.3 dargestellt. Der mittlere Fehler in den R_I -Messungen beträgt 2.3 %, für $R_{I\rho}$ 4.5 %, während der Fehler für HetNOE's wie in [49] beschrieben mit 5 % angenommen wurde.

Abb. 4.2. Exponentialkurve des $R_{I\rho}$ -Verlaufes für das Onkoprotein E7.



A: Rest Gln38; B: Rest Leu42 (beide in der α_1 -Helix).

Für einige Reste wurden größere Fehler beobachtet. Die maximalen Fehler für R_I betragen bis 4.2 % (AS Val48, 600 MHz) und 6.6 % (AS Asn55, 750 MHz), für $R_{I\rho}$ -Messungen bis 9.1 % (AS Trp51, 600 MHz) und 15.2 % (AS Val48, 750 MHz). Der größte Fehlerbeitrag ist von Problemen in der Signalauflösung hervorgerufen, wenn zwei Signale sehr nah liegen und partiell überlappen (z.B.: 8 und 20, 26 und 28, 40 und 48).

Alle Messungen wurden für zwei Frequenzen durchgeführt: 600 und 750 MHz, damit kann die Genauigkeit der Analyse erhöht werden. Der durchschnittliche R_I -Wert für 600 MHz beträgt 1.36 s^{-1} , für 750 MHz aber 1.14 s^{-1} . Die Daten für 600 MHz liegen etwas höher als für 750 MHz, aber die Kurven für die zwei Frequenzen stimmen sehr gut miteinander überein. Die gleiche Tendenz gilt auch für $R_{I\rho}$: der durchschnittliche $R_{I\rho}$ für 600 MHz liegt um 13.74 s^{-1} und für 750 MHz um 13.18 s^{-1} . Für die HetNOE-Daten kehren sich die Verhältnisse um, so liegt der durchschnittliche HetNOE für 600 MHz um 0.76 während er für 750 MHz um 0.85 liegt. Alle diese Beobachtungen sind in guter Übereinstimmung mit der Theorie und vorangehenden Arbeiten

[24,25,34]. Eine klare Korrelation zwischen $R_{1\rho}$ und HetNOE ist auffällig. Die $R_{1\rho}$ -Werte und HetNOE erlauben schon einige Aussagen über die Beweglichkeit von verschiedenen Aminosäuren zu äußern. Die Aminosäuren 5 – 8, 13, 16, 23 – 25, 43 – 45, 49, 54 – 56 sind beweglicher als andere

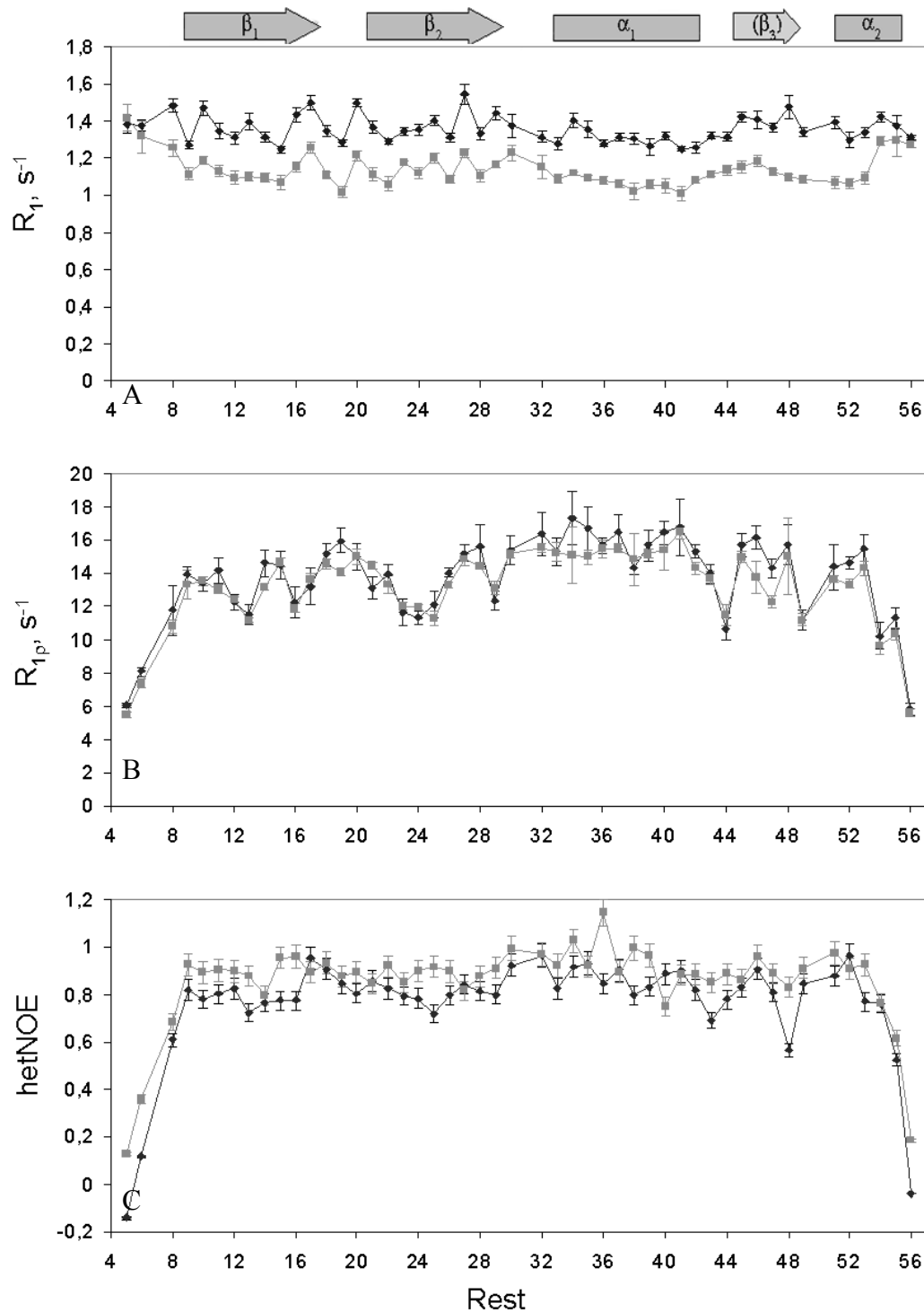


Abb. 4.3. Relaxationsraten R_1 (A), $R_{1\rho}$ (B) und steady-state HetNOE (C) für das Onkoprotein E7. Schwarz: 600 MHz; grau: 750 MHz. Entsprechende Fehler sind gekennzeichnet. Über dem Plot sind die Elemente der Sekundärstruktur schematisch dargestellt.

ASn im Proteinmolekül. Für ASn 5 – 8 und 54 – 56 lässt sich dieser Befund mit ihrer Lage im C- und N-Terminus des Moleküls erklären. Detaillierte Aussagen kann man aber erst nach einer weiteren Analyse der Dynamik machen. Aus R_1 , $R_{1\rho}$ und HetNOE wurden hierzu mittels der Programme DYNAMICS [24,32], RotDif [29] und ModelFree [34,35] und dem darin implementierten Ansatz [22,23] sowie des Clore-Modell [28] die mikrodynamischen Parameter des Proteinmoleküls bestimmt. Wie schon früher erwähnt wurde, werden diese Rechnungen in zwei Schritten durchgeführt: zuerst wurde die globale Korrelationszeit und der Rotationstensor bestimmt, und dann die lokalen Parameter, wie Ordnungsparameter, lokale Korrelationszeit und der Beitrag von konformationellen Austausch.

Globale Rotationsbewegung

Die ermittelte Korrelationszeit der Rotationsbewegung des Gesamtmoleküls beträgt $\tau_{rot}=8.0 \pm 0.4$ ns (DYNAMICS, 750 MHz), $\tau_{rot}=8.4 \pm 0.6$ ns (DYNAMICS, 600 MHz), bzw. $\tau_{rot}=8.6 \pm 0.4$ ns (RotDif, 750 MHz), $\tau_{rot}=10.0 \pm 0.4$ ns (RotDif, 600 MHz). Diese Werte sind gut miteinander korreliert, sind aber im Gegenteil zu unseren Erwartungen etwas von der Feldstärke abhängig. Die Korrelationszeit nimmt für kleinere Feldstärken etwas zu, als ob sich das Molekül bei kleineren Feldstärken langsamer bewegen würde. Das kann durch „Lösungseffekte“ erklärt werden, wie es schon in [15] und auch in [52] erwähnt wurde. Das Molekül befindet sich also nicht im Vakuum sondern in der Lösung, die bei verschiedenen Feldstärke etwas unterschiedliche Eigenschaften aufweist.

Mittels der Programme RotDif [29], ModelFree [34,35] und QuadricDiffusion [35] wurde der Rotationsdiffusionstensor entsprechend (21) berechnet. Der Tensor wurde anhand der ASn 8-55 berechnet, da die große Beweglichkeit von ASn in N- und C-Terminus ausgeschlossen werden sollte. Die Berücksichtigung der Daten für AS 5 – 7 und 56 führte zu großen Fehlern nach Formel (21). Der Rotationsdiffusionstensor wurde mit verschiedenen Näherungen berechnet: isotrop, axialsymmetrisch und anisotrop. Die Eigenwerte des Rotationsdiffusionstensors für die verschiedenen Modelle betragen:

Tabelle 3: Rotationsdiffusionstensor für das Onkoprotein E7

		600 MHz	750 MHz
1) isotropes Modell:	D_{iso}	$1.65 \pm 0.01 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$	$1.92 \pm 0.01 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$
2) axialsymmetrisches Modell:	D_{zz}	$1.83 \pm 0.16 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$	$2.20 \pm 0.15 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$
	$D_{xx}=D_{yy}$	$1.57 \pm 0.05 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$	$1.82 \pm 0.05 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$
3) anisotropes Modell:	D_{xx}	$1.47 \pm 0.13 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$	$1.77 \pm 0.16 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$
	D_{yy}	$1.67 \pm 0.13 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$	$1.85 \pm 0.16 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$
	D_{zz}	$1.84 \pm 0.14 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$	$2.20 \pm 0.22 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$

Die Asymmetrie des Rotationsdiffusionstensors beträgt 1.17 (± 0.05) (600 MHz) und 1.20 (± 0.05) (750 MHz). Die Rechnungen haben kleinere Fehler gezeigt, wenn der Tensor in isotroper und axialsymmetrischer Näherung berechnet wurde: Der Maximalfehler beträgt im Fall 1) 10 % und im Fall 2) 2 % im Vergleich zu 3), was kleiner als die zu erwartenden experimentellen Fehler bzw. bestimmten Methodologiefehler ist.

Das Programm DYNAMICS liefert noch einen Wert für $\tau_{rot}=6.4$ ns, der aber durch RotDif nicht bestätigt wird. Der Wert 6.4 ns liegt in der Nähe der erwarteten Korrelationszeit für das E7-Monomer, wenn es in der freien Natur existieren könnte. Die Tatsache, dass DYNAMICS noch einen Wert im Gegensatz zu RotDif liefert, kann man dadurch erklären, dass in RotDif und DYNAMICS zwei etwas unterschiedliche Methoden implementiert sind. In RotDif wird eine gleichzeitige 6-Parameter Suche nach den Variablen τ_{rot} , Tensorwinkeln α , β , γ , Tensorasymmetrie D_{zz}/D_{xx} und D_{yy}/D_{xx} verwendet, während in DYNAMICS im Gegenteil die s.g. „konsequente Suche“ (s. Abschnitt „Grundlagen“) implementiert ist. Bei ungünstigen Bedingungen kann DYNAMICS (oder RotDif) sogar bei kleinen Fehlern in den Eingabedaten in ein lokales Minimum eintreten [24,29], weswegen nur diejenigen Werte, die mit beiden Programmen bestätigt wurden, akzeptiert und in weiteren Berechnungen verwendet wurden.

Um die Genauigkeit der Berechnungen zu bestätigen, wurden für das Proteinmolekül (für das Monomer und Dimer) hydrodynamische Berechnungen mit dem Programm HYDRONMR („beads“-Modell) durchgeführt [30,52].

Die berechnete Korrelationszeit für nur das theoretisch bestehende E7-Monomer beträgt $\tau_{rot}=5.5$ ns (harmonisches Mittel von fünf Zeiten), und die Asymmetrie des Rotationsdiffusionstensors beträgt: $D_{zz}/D_{xx}=1.35$ und $D_{yy}/D_{xx}=1.1$. Diese Werte stimmen verständlich nicht mit den experimentell bestimmten Werten überein, sind aber nicht weit vom Wert 6.4 ns entfernt, der mit dem Programm DYNAMICS bestimmt wurde. Wie in [52] gezeigt wurde, gilt für einige Homodimere (v.a. kugelförmige mit Anisotropie bis 1.2 und Sequenzlänge bis ca. 100 ASn) folgende empirische Beziehung:

$$\tau_{rot}(Dimer) \approx \sqrt{2} \tau_{rot}(\text{Monomer}) \text{ und } D_{iso}(\text{Monomer}) \approx \sqrt{2} D_{iso}(Dimer) \quad (43).$$

Laut dieser Formel liefert HYDRONMR in der „Homodimer“-Näherung den Wert 7.8 ns, und $D_{iso} = 2.13 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$, was nahe des experimentellen Wertes liegt und zeigt, dass das Onkoprotein E7 zu den „regelmäßigen“ Proteinen im Sinne [52] gehört. Die Berechnungen für den Dimerfall haben einen τ_{rot} -Wert geliefert, der mit dem experimentellen übereinstimmt, und zwar $\tau_{rot}=8.7$ ns. Es ist interessant zu betonen, dass im Monomerfall das Proteinmolekül eine Anisotropie von 1.35 (theoretischer Wert, HYDRONMR) ausweist und sich diese bis auf 1.17 (experimentell bei Verwendung der Daten im RotDif und QuadricDiffusion) reduziert, d.h. der Rotationsdiffusionstensor wird symmetrischer. Das bestätigt auch die einfache visuelle

Einschätzung des Moleküls mittels der Programme VMD [55] oder MolMol. Für die Anisotropie ≤ 1.2 ist die Nutzung des einfachen Lipari & Szabo-Modells [22-23] rechtmäßig, dabei wird Isotropie (oder höchstens axiale Symmetrie) des Rotationsdiffusionstensors angenommen. Diese Annahme haben wir verwendet, um aus den vorhandenen experimentellen Daten mittels der Formeln (16 – 22) die Ordnungsparameter und andere mikrodynamische Parameter zu berechnen.

Lokale Bewegung

Der allgemeine Ordnungsparameter S^2 , die charakteristische Korrelationszeit der lokalen Bewegungen τ_{loc} und der Beitrag des konformationellen Austausches R_{ex} sind in Abb. 4.4 zusammen mit den Sekundärstrukturelementen dargestellt (α -Helices und β -Faltblätter). Wie schon früher von Ohlenschläger et al. bestimmt wurde [6], besitzt das E7-Protein folgende Sekundärstruktur in jedem Monomer: $\beta_1\beta_2\alpha_1(\beta_3)\alpha_2$ (siehe dazu auch Einleitung und Abbildung 1.1). Das Element β_3 kommt nur im Dimerzustand als Faltblattstrang vor und wird von ASn, die zwei Monomeren angehören, gebildet. Das β_1 -Faltblatt wird von ASn 8-16 gebildet, das β_2 -Faltblatt aus 21 – 29, die α_1 -Helix (große α -Helix) von den Resten 31 – 43, das (β_3)-Faltblatt bilden die AS 45-48 und die C-terminale α_2 -Helix formen die AS 50-55. Nicht geordnete Strukturteile finden sich mit den ASn 1-7 nur im N-Terminus. Aus Abb. 4.4 ist ersichtlich, dass die Ordnungsparameter verschiedene Werte für einzelne ASn besitzen, aber alle im Bereich 0.8-1.0 für ASn 8 – 55 (Kernregion des Moleküls) liegen. Eine gute Korrelation zwischen den Ordnungsparametern und der Sekundärstruktur ist zu erkennen. Die Bereiche von N- und C-Terminus (5-7 und 56) haben einen durchschnittlichen Ordnungsparameter von 0.60 ± 0.21 (600 MHz) und 0.40 ± 0.09 (750 MHz). Im Gegenteil dazu weist die Kernregion des Moleküls (8-55) einen durchschnittlichen Ordnungsparameter von 0.86 ± 0.05 (600 MHz) bzw. 0.91 ± 0.04 (750 MHz) auf. Die Daten für 600 MHz und 750 MHz sind gut miteinander korreliert, wobei der durchschnittliche Wert für 750 MHz in der Kernregion (8-55) etwas höher (0.91 gegen 0.86) liegt, der S^2 -Verlauf aber sehr ähnlich mit einem Maximalunterschied von 0.3 für die C-terminale AS 56 und 0.12 (AS 30, 32 „Übergangszone“ zwischen β_2 und α_1) ist. Da sich die AS 31 höchstwahrscheinlich stark bewegt, konnte für diese Aminosäure kein NH-Signal im NMR-Spektrum nachgewiesen werden. Elemente von geordneter Struktur zeigen sich als Bereiche mit stabil höheren Ordnungsparameter. So zeigen die ASn 32 – 43 als α -Helix einen durchschnittlichen Ordnungsparameter von 0.83 ± 0.03 (600 MHz) und 0.88 ± 0.03 (750 MHz); die ASn 50 – 55 bilden eine α_2 -Helix mit einem hierfür typischen $\langle S^2 \rangle = 0.86 \pm 0.03$ für beide Frequenzen. Durchschnittliche S^2 -Werte für β_1 betragen 0.88 ± 0.06 (0.92 ± 0.04) und für β_2 0.88 ± 0.05 (0.93 ± 0.04) jeweils für 600 MHz und 750 MHz. Der durchschnittliche S^2 -Wert für das spezifische Faltblatt β_3 beträgt ebenfalls 0.88 ± 0.03 (0.93 ± 0.03). Bereiche von kanonischen β -Faltblättern zeigen eine charakteristische Sägezahnstruktur für

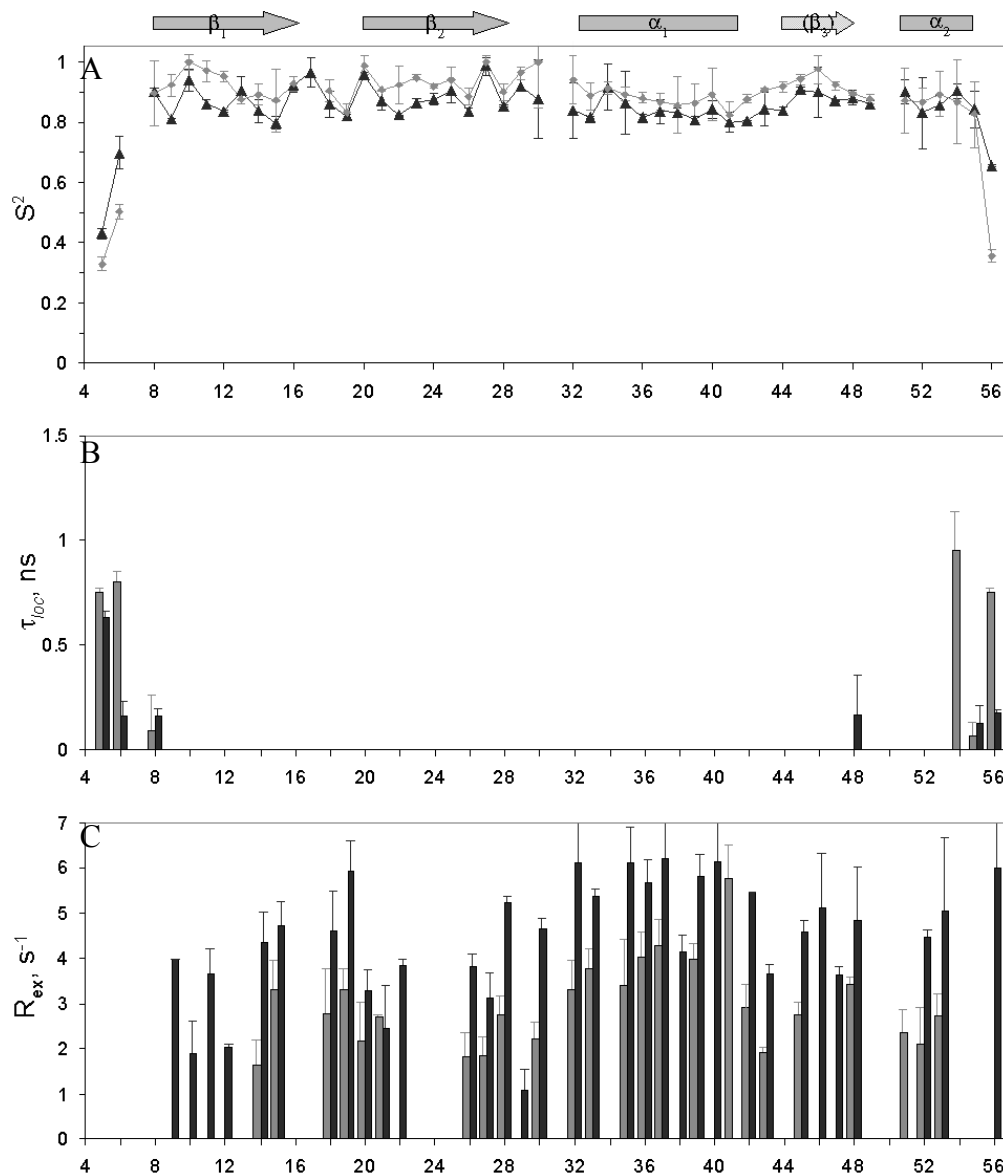


Abb. 4.4. Mikrodynamische Parameter (lokal) des Onkoproteins E7.

S^2 – Ordnungsparameter nach dem Lipari & Szabo-Modell (A); τ_{loc} – Korrelationszeit der lokalen Bewegungen (B); R_{ex} – Beitrag des konformationellen Austausches in $R_{1\rho}$ (C); über dem Ordnungsparameter-Plot sind die Elemente der Sekundärstruktur dargestellt.

Schwarz: Daten für 600 MHz; grau: Daten für 750 MHz.

Keine Beiträge für einige Reste im τ_{loc} - und R_{ex} -Plot deuten auf einfache Modelle für diese Reste ohne Heranziehung von τ_{loc}/R_{ex} (s. Kapitel 2.1.8 „Dynamikanalyse“).

S^2 . Dies ist mit der alternierenden Reihenfolge der H-Brücken im β -Faltblatt verbunden, wobei die nach außen gerichteten H^N -Atome nicht in Wasserstoffbrücken involviert sind und etwas höhere Beweglichkeit aufweisen. Erstaunlicherweise liegt der durchschnittliche S^2 -Wert für die α_1 -Helix etwas niedriger als für andere ASn in der Kernregion des Moleküls (0.83 gegen 0.86 für 600 MHz). In Abb. 4.4 ist auch klar zu sehen, dass sich der α_1 -Helix-Bereich durch höhere Homogenität mit

einem Minimalwert 0.80 und Maximalwert 0.91 und kleineren Fehlern unterscheidet. Etwas niedrigere S^2 -Werte für die α_1 -Helix können auf eine etwas höhere Gesamtbeweglichkeit der α_1 -Helix hindeuten, wobei die Struktur der α_1 -Helix aber stabil erhalten bleibt. Größere Fehler werden für die ASn 8, 30, 32 und 51 beobachtet und können dadurch entstehen, dass sich diese Reste in Übergängen zwischen den verschiedenen Sekundärstrukturelementen befinden; AS 8 liegt am Beginn des β -Faltblatts und bei AS 32 beginnt die α_1 -Helix.

Die Größe τ_{loc} ist die charakteristische Korrelationszeit der lokalen Bewegungen. Die Korrelationszeiten weisen höhere Werte von ~ 0.8 ns im Bereich des N- und C-Terminus (5-7 und 56) auf sowie in Anfangsbereich des ersten β -Faltblatts (AS 8), von β -Faltblatt 3 (AS 44) und im Terminalbereich der α_2 -Helix (54 – 55). Für geordnete Strukturelemente ist τ_{loc} nicht feststellbar. Höhere Werte $\tau_{loc} > 0.2$ ns für ASn sind ein Merkmal für niedrige Stabilität der Struktur und/oder höhere Beweglichkeit. In Bereichen mit höheren lokalen Korrelationszeiten wird die Trennbarkeit von Global- und Lokalbewegungen gestört. Für gute Trennbarkeit von Lokal- und Globalbewegungen sollen die lokalen Korrelationszeiten um einige Größenordnungen niedriger als die globale Korrelationszeit sein. In unserem Fall sollte sie daher weniger als 0.2 – 0.5 ns betragen. ASn 1 – 7 und 56 weisen eine sehr große Beweglichkeit auf, dies wird auch durch die höheren lokalen Korrelationszeiten bestätigt. Es existiert also eine gute Korrelation zwischen Ordnungsparametern und lokale Korrelationszeiten: τ_{loc} nimmt höhere Werte für ASn mit höherer Beweglichkeit an. Abwesenheit der Daten für τ_{loc} bedeutet nicht, dass die lokalen Korrelationszeiten gleich Null sind, sondern dass diese Korrelationszeiten so niedrig sind (lokale Bewegung so schnell), dass das Approximationsmodell ohne τ_{loc} verwendet wurde [24].

R_{ex} ist der Beitrag des konformationellen Austausches zur Relaxationsgeschwindigkeit R_{lp} [24,26]. Dieser soll ungleich Null für geordnete Elemente einer Struktur sein. ASn 9-53 haben hohe R_{ex} -Werte sowohl für 600 MHz als auch für 750 MHz. Die Werte für 750 MHz liegen signifikant höher als für 600 MHz, jedoch zeigt R_{ex} insgesamt eine gute qualitative Korrelation mit den Ordnungsparametern und lokalen Korrelationszeiten.

4.1.2 BEVSLD

In Abb. 4.5 ist ein typisches HetNOE-Spektrum für den H1'-Bereich der Riboseprotonen des BEVSLD dargestellt. Die Spektren zur Messung von R_I und $R_{I\rho}$ sind analog dem HetNOE-Spektrum, unterscheiden sich aber in der spektralen Weite und dem Aufnahmeverfahren (TPPI vs. States) [47].

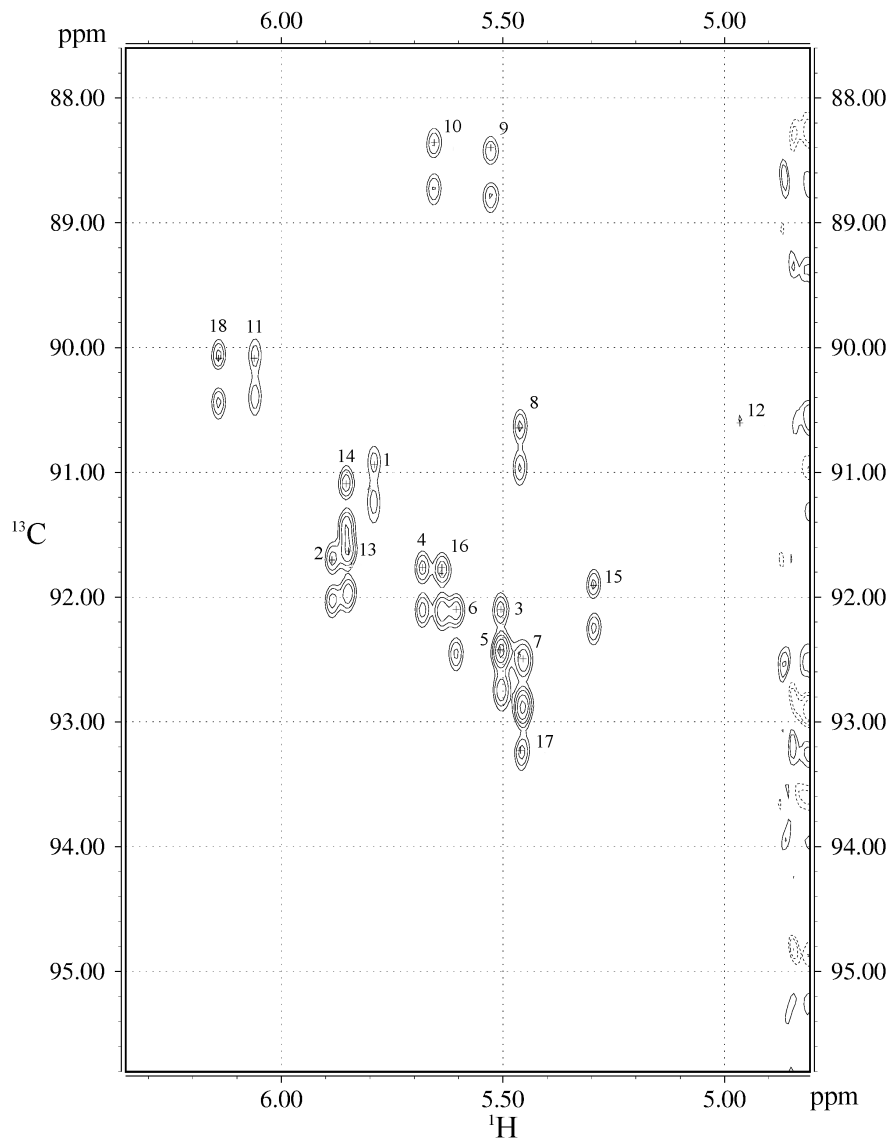


Abb. 4.5. Typisches $\{^1\text{H}-^{13}\text{C}\}$ HetNOE-Spektrum für den untersuchten BEVSLD (Ribose). Die Zahlen sind die Restnummern aus der Sequenz. Bei Auswertung des Dubletts wurde immer das Signal mit kleinerem ppm-Wert in der ^{13}C -Dimension verwendet.

Das Experiment wurde wie für das Onkoprotein E7 aufgenommen. Die Messungen wurden für Atome C1'-H1' (Ribose) und C2-H2 (A), C8-H8 (A, G) oder C6-H6 (C, U) (Basen) durchgeführt,

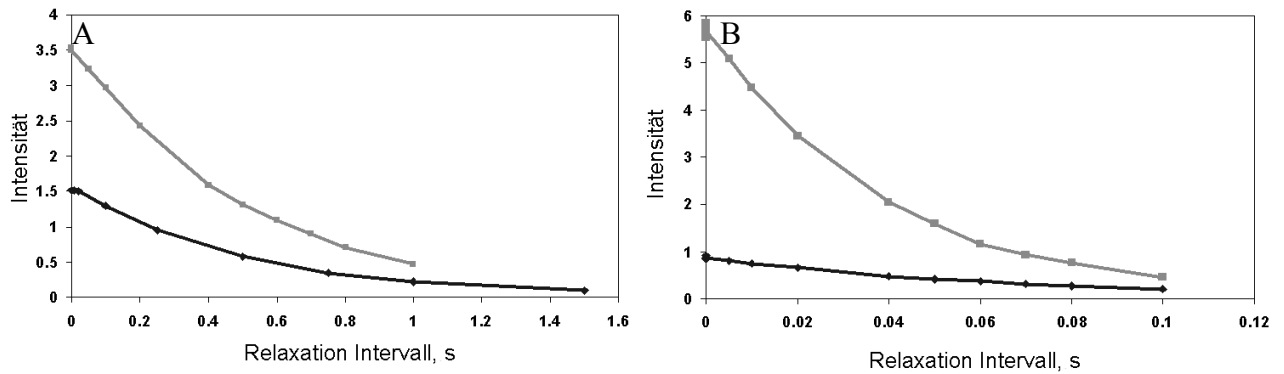


Abb. 4.6. Kurvenverlauf für Relaxationsdaten des BEVSLD.

A: R_1 -Messung. Grau - G12 Basen 750 MHz; schwarz - U5 Ribose, 600 MHz;

B: $R_{1\rho}$ -Messung. Grau - A11 Ribose 750 MHz; schwarz - G16 Base, 600 MHz.

Die Kurven zeigen einen einfachen exponentiellen Verlauf.

wodurch 18 Ribose- bzw. 21 Basen-Signale zur Beschreibung der Beweglichkeit der RNA zur Verfügung standen. Die Kurven wurden einfach exponentiell gefittet und die extrahierte R_1 -, $R_{1\rho}$ -Werte (sowie auch die HetNOE) sind in Abb. 4.7 und 4.8 dargestellt. Typische Kurven für R_1 - und $R_{1\rho}$ -Verläufe jeweils für Ribose und Basen getrennt sind in Abb. 4.6 gezeigt. Der durchschnittliche Fehler bei R_1 -Messungen für Ribose und Basen betrug 1.6 % bzw. 1.7 %, für die $R_{1\rho}$ -Messungen 3.8 % bzw. 3.3 %. Der Fehler für HetNOE wurde wie in [49] mit 5 % angenommen. Für einige Reste sind die Fehler größer, die maximalen Fehler in R_1 -Messungen erreichen für Reste 10 – 12 bis 5%, was mit vermutlich größerer Beweglichkeit dieser Reste erklärt werden kann; außerdem war in zwei von drei Experimenten $R_{1\rho}$ für den Rest 12 aufgrund der Signalintensität (s. Abb. 4.5) nicht bestimmbar, deshalb wurden entsprechende Kurven auf 4 Punkte gefittet und nicht auf 12 wie üblich; außerdem wurde auch eine Interpolation unter Berücksichtigung der Daten der Nachbarreste durchgeführt [20].

Da das untersuchte RNA-Molekül aus zwei strukturell verschiedenen „Teilen“ besteht: dem helikalen Stem und dem D-Loop, ist es sinnvoll, die Daten für die Doppelhelix (Stem) und den Loop getrennt zu charakterisieren. Dabei beinhaltet die Doppelhelix die Reste G1 - C7 und C12 - C18 und der D-Loop die Nukleotide G8-U9-U10-A11.

Doppelhelix (Stem)

R_1 : Der durchschnittliche R_1 bei 600 MHz für die Reste G1 - C7 und G12 - C18, die den A-helikalen Stem des BEVSLD darstellen, beträgt 2.7 s^{-1} und 3.7 s^{-1} für Purin- und Pyrimidin-Kohlenstoffe (Basen). Bei 750 MHz haben die R_1 -Werte für die Kohlenstoffe der Purine und Pyrimidine generell abgenommen und betragen entsprechend 2.0 s^{-1} und 3.0 s^{-1} . Die R_1 -Werte für

Ribose zeigen einen deutlichen Rückgang in den 750 MHz-Daten (1.4 s^{-1} gegen 2.0 s^{-1}). Purine und Pyrimidine C1' - H1' weisen ungefähr gleiches Niveau auf.

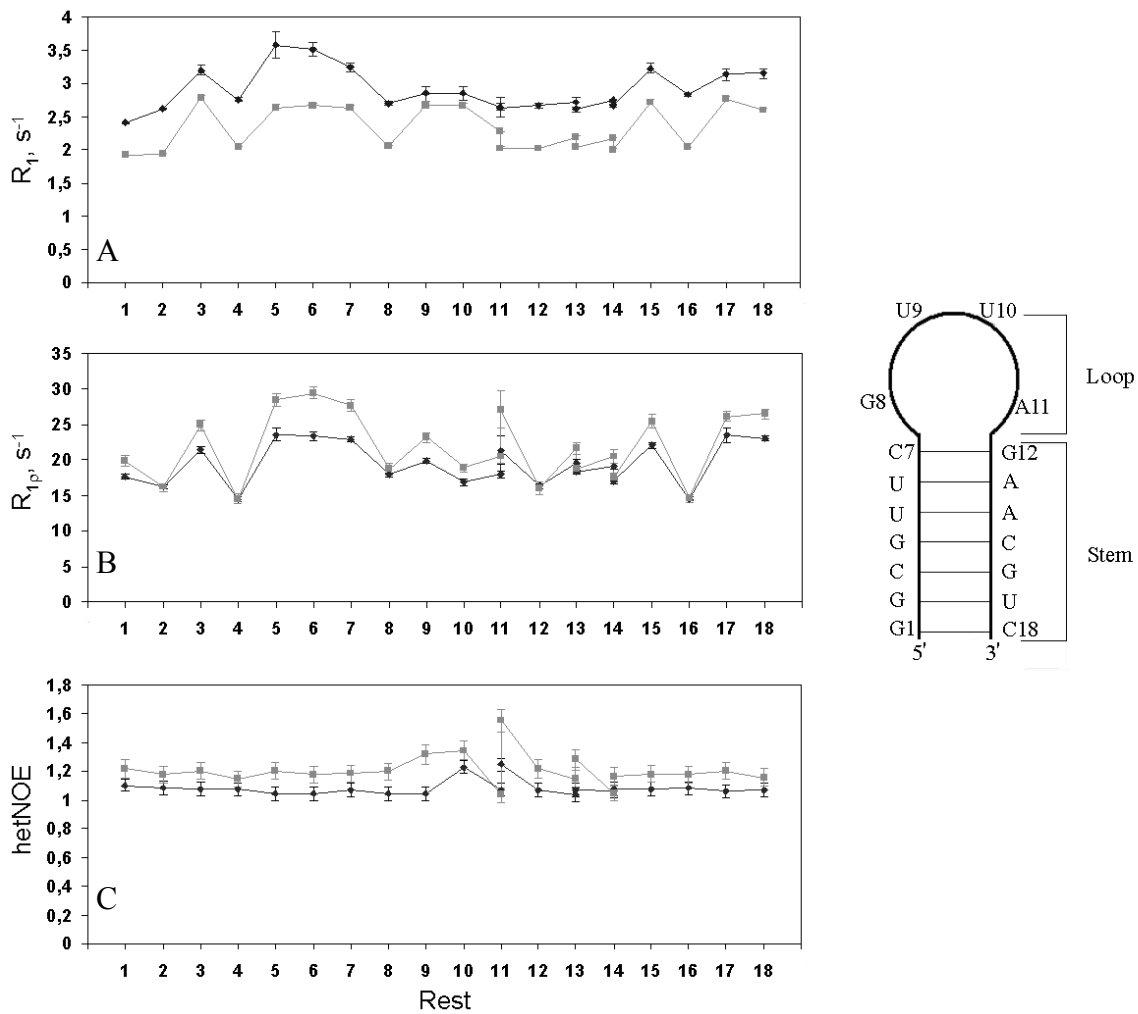


Abb. 4.7. Relaxationsraten R_1 (A), $R_{1\rho}$ (B) und HetNOE (C) für die BEVSLD Basenatome C2, C6 und C8. Schwarz: 600 MHz; grau: 750 MHz. Daneben ist die Struktur des BEVSLD schematisch dargestellt.

$R_{1\rho}$: Während die $R_{1\rho}$ -Werte für Purine bei den zwei Feldstärken sich nicht stark unterschieden (durchschnittlich 17.4 s^{-1} , 600 MHz: 17.0 s^{-1} , 750 MHz: 17.8 s^{-1}), sind für Pyrimidine die $R_{1\rho}$ -Werte bei 600 MHz signifikant niedriger (22.9 s^{-1}) als bei 750 MHz (27.0 s^{-1}). Für C1'-H1' sieht dies anders aus: $R_{1\rho}$ -Werte für 600 MHz (durchschnittlich 12.3 s^{-1}) sind generell größer als die entsprechenden 750 MHz-Daten (10.3 s^{-1}). Wie für R_1 zeigen die $R_{1\rho}$ -Werte keine signifikanten Unterschiede zwischen Purinen und Pyrimiden. Der Rest A11 aus dem D-Loop und G12 haben signifikant höhere Werte, was aber auf einen höheren Beitrag des konformationellen Austausches an der „Grenze“ zwischen dem Stem und dem D-Loop zurückzuführen ist.

HetNOE: Für den heteronuklearen NOE gibt es keine signifikanten Unterschiede zwischen Purin- und Pyrimidin-Daten. Die HetNOE-Werte für 600 MHz liegen signifikant niedriger (1.07) als für

750 MHz (1.18) und das gleiche Bild zeigen die HetNOE-Werte für die Ribose (1.05 und 1.14). Generell muss man aber betonen, dass HetNOE-Werte mit drei Ausnahmen nicht weit voneinander

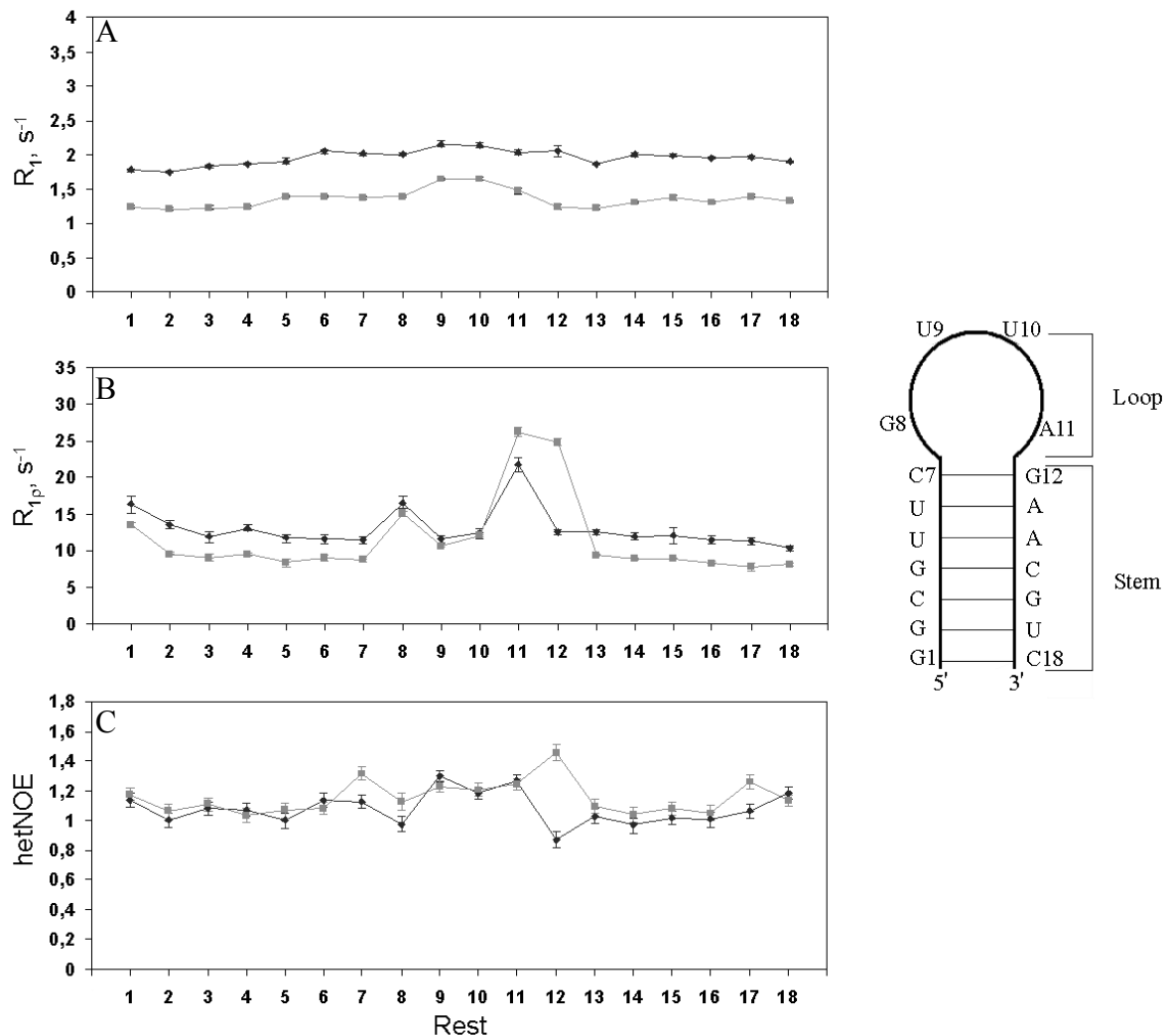


Abb. 4.8. Relaxationraten R_1 (A), $R_{1\rho}$ (B) und HetNOE (C) für Riboseatome C1' des BEVSLD.

Schwarz: 600 MHz; grau: 750 MHz.

Daneben ist die Struktur des BEVSLD schematisch dargestellt.

lagen: Lediglich die Reste C7 und G12, die ein Basenpaar bilden, und der Rest U17, der neben dem 3'-terminalen C18 liegt, haben signifikant größere HetNOE-Wert bei 750 MHz.

Loop

R_1 : Die R_1 -Werte bei 600 MHz und 750 MHz für Basen in Loop G8-U9-U10-A11 haben im Prinzip das gleiche Niveau wie die für die Stem-Reste. Im Gegensatz hierzu weisen Ribose-Daten ein Maximum für R_1 bei den Resten U9 und U10 (1.6 s⁻¹ bei 750 MHz, 2.2 s⁻¹ bei 600 MHz) auf und die Daten für die Loop-Reste 1 (G8) und 4 (A11) sind etwas niedriger, liegen aber dennoch über den durchschnittlichen Werten, die für die Stem-Reste gefunden werden.

$R_{I\rho}$: $R_{I\rho}$ -Werte verhalten sich für beide Feldstärken gleich, wobei die Riboseatome der Loop-Reste 1 und 4 (d.h. G8 und A11) höhere Werte zeigen: (15 s^{-1} und 26 s^{-1} gegen etwa 12 s^{-1} für U9 und U10). Höhere Werte für G8 und A11 sind mit einem größeren Beitrag des konformationellen Austausches verbunden (vgl. auch Überlegungen für $R_{I\rho}$ -Werte im Stem).

HetNOE: Ausser G8 gibt es keine signifikanten Differenzen zwischen den Daten bei 600 MHz und 750 MHz. Für Loop-Rest 1 (G8) wird ein etwas niedrigerer HetNOE-Wert bei 600 MHz beobachtet.

Zwischen den $R_{I\rho}$ - und HetNOE-Daten für Ribose und Basen gibt es eine schwache Korrelation, deutliche Korrelation gibt es zwischen R_I und $R_{I\rho}$ für Basen. Für Ribose kann man auch eine schwache Korrelation zwischen $R_{I\rho}$ und HetNOE beobachten, nicht aber im Loop-Bereich. Die Daten für die beiden Feldstärken sind gut miteinander korreliert mit Ausnahme der Reste 7, 8 und 12 für Ribose.

Für Proteine gibt der $R_{I\rho}$ - und HetNOE-Verlauf die Möglichkeit, eine schnelle erste Aussage über die Beweglichkeit von ASn zu treffen. Wenn wir diesen Vorgang auf die RNA-Analyse erweitern, kann man vermuten, dass das RNA-Molekül eine weitgehend homogene Beweglichkeit zeigt. Obwohl der $R_{I\rho}$ -Wert für Basen eine relativ große Variabilität zeigt, wird das jedoch durch den HetNOE-Wert nicht gestützt (korrelierte Variabilität in $R_{I\rho}$ und HetNOE deutet auf Variabilität in der Beweglichkeit).

Aus den R_I -, $R_{I\rho}$ - und HetNOE-Werten wurden ähnlich wie für das Onkoprotein E7, mikrodynamische Parameter des RNA-Moleküls bestimmt. Da DYNAMICS für Analyse von Proteindynamik entwickelt wurde, wurde das Programm entsprechend den Hinweisen des Autors (Prof. Dr. D. Fushman, Department of Chemistry and Biochemistry, University of Maryland, USA, persönliche Kommunikation) modifiziert. Die Rechnungen wurden wie üblich in zwei Schritten (Bestimmung des Rotationsdiffusionstensor, Bestimmung lokaler mikrodynamischer Parameter) durchgeführt (vgl. Abschnitt 2.1.8).

Globale Rotationsbewegung

Die berechneten Korrelationszeiten der Rotationsbewegung τ_{rot} waren:

	Basen (DYNAMICS/RotDif)	Ribose (DYNAMICS/RotDif)
600 MHz:	3.0 ns (3.0 ± 0.1 ns)	3.1 ns (3.1 ± 0.3 ns)
750 MHz:	2.9 ns (2.9 ± 0.1 ns)	2.6 ns (2.6 ± 0.3 ns)

Diese Werte stimmen gut miteinander überein und liegen innerhalb der Fehlergrenzen. Mittels der Programme RotDif, ModelFree, QuadricDiffusion [29,35,36] wurde der Rotationsdiffusionstensor in verschiedenen Näherungen berechnet: 1) isotrop, 2) axialsymmetrisch, 3) anisotrop. Die Eigenwerte des Rotationsdiffusionstensors für verschiedene Modelle sind in Tabelle 4 dargestellt:

Tabelle 4. Rotationsdiffusionstensor für den BEVSLD

Ribose (C1'-H1'):		600 MHz	750 MHz
1) isotropes Modell:	D_{iso}	$5.40 \pm 0.15 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$	$5.52 \pm 0.32 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$
2) axialsymmetrisches Modell:	D_{zz}	$7.46 \pm 1.38 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$	$8.59 \pm 2.58 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$
	$D_{xx}=D_{yy}$	$4.52 \pm 0.43 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$	$4.79 \pm 0.71 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$
3) anisotropes Modell	D_{xx}	$4.34 \pm 0.91 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$	$4.72 \pm 0.77 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$
	D_{yy}	$5.03 \pm 0.84 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$	$5.33 \pm 0.86 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$
	D_{zz}	$7.69 \pm 1.13 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$	$8.03 \pm 1.24 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$
Basen (C2-H2, C6-H6, C8-H8):		600 MHz	750 MHz
1) isotropes Modell:	D_{iso}	$5.59 \pm 0.10 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$	$5.67 \pm 0.11 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$
2) axialsymmetrisches Modell:	D_{zz}	$6.67 \pm 1.19 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$	$6.61 \pm 1.71 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$
	$D_{xx}=D_{yy}$	$5.31 \pm 0.31 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$	$5.37 \pm 0.47 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$
3) anisotropes Modell	D_{xx}	$4.15 \pm 1.19 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$	$2.79 \pm 1.27 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$
	D_{yy}	$4.95 \pm 1.25 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$	$5.78 \pm 1.56 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$
	D_{zz}	$7.45 \pm 1.42 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$	$10.99 \pm 2.56 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$

Die Asymmetrie des Rotationsdiffusionstensors ist hoch: $D_{zz}/D_{xx}=1.60$ und $D_{yy}/D_{xx}=1.21$ für 600 MHz und bis $D_{zz}/D_{xx}=1.8$ für 750 MHz. Der Rotationsdiffusionstensor für den BEVSLD hat also eine komplizierte Form, die annähernd als axialsymmetrisch approximiert werden kann. Dies spiegelt nicht sphärische Form des RNA-Moleküls wieder (Abb. 1.2). Die Tensorcharakteristika für Basen bei 750 MHz konnten nur mit großen Fehlern berechnet werden. Höchstwahrscheinlich wird das durch einen großen CSA-Beitrag für Basen bei 750 MHz ausgelöst. Der Tensor hat einen sehr großen Modellfehler für das isotrope Modell (30 %) (in den Tabellen sind die Rechenfehler angegeben, die um so größer sind, je komplizierter das Modell ist). Es wurde Modell 2 (axialsymmetrisch) verwendet, weil hier sowohl der Modellfehler als auch Rechenfehler annehmbar klein waren (insgesamt bis 10 %). Das anisotrope Modell könnte im Prinzip genauere Werte liefern, dessen Anwendung war aber mit sehr hohen Rechenfehlern verbunden (zu viel zu bestimmende Parameter für vorhandene nicht ideale Daten).

Um die Richtigkeit der Berechnungen zu bestätigen, wurden auch für das RNA-Molekül hydrodynamische Rechnungen mittels HYDRONMR durchgeführt. Die Korrelationszeit beträgt $\tau_{rot}=4.3 \text{ ns}$ (harmonisches Mittel von fünf Zeiten), der kleinste Wert 3.7 ns und die Eigenwerte des Rotationsdiffusionstensors: $D_{zz}=5.19 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$, $D_{xx}=3.31 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$, $D_{yy}=3.22 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$. Die Asymmetrie

des Tensors beträgt: $D_{zz}/D_{xx}=1.60$ und $D_{yy}/D_{xx}=1.08$. Die Ergebnisse der theoretischen Rechnungen stimmen mit experimentellen Werten nicht so gut überein, wie es für das Onkoprotein E7 der Fall war. Der höhere Wert für τ_{rot} und die niedrigeren Werte für die Tensorkomponenten laut theoretischen Rechnungen zeigen, dass sich das Molekül langsamer drehen muss. Diese Nichtübereinstimmung kann durch Grobheit der zugelassenen Annahmen über den Bewegungsverhalten des Moleküls, einen hohen anisotropen Beitrag am CSA [20,21], hohe Anisotropie des Rotationsdiffusionstensors, aber auch durch die Mangelhaftigkeit der im Programm verwendeten Näherung („beads model“) erklärt werden.

Lokale Bewegung

Der allgemeine Ordnungsparameter S^2 und der Beitrag des konformationellen Austausches sind in Abb. 4.9 dargestellt. Aus dieser Abbildung ist leicht zu sehen, dass der Ordnungsparameter

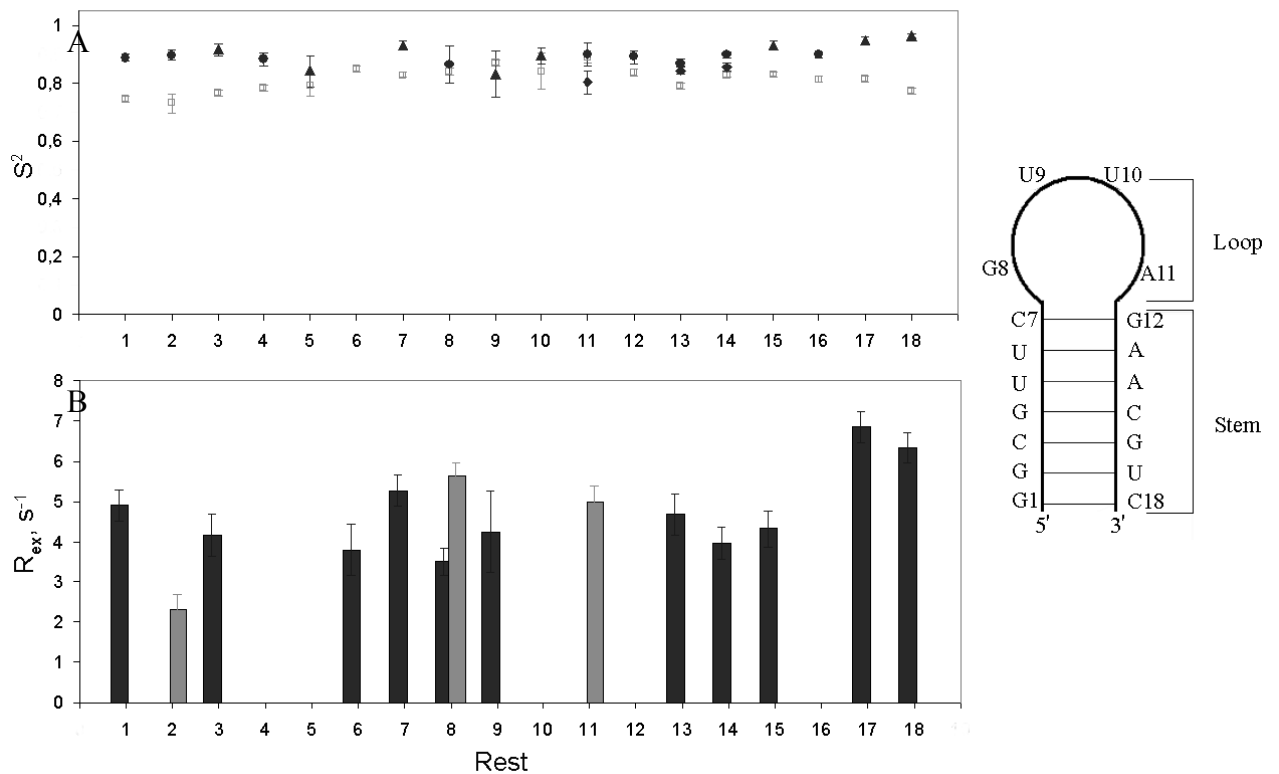


Abb. 4.9. Mikrodynamische Parameter (lokal) des BEVSLD.

S^2 – Ordnungsparameter nach Lipari & Szabo-Modell (A); R_{ex} – Beitrag des konformationellen Austausches in $R_{1\rho}$ (B). Daneben ist die Struktur des BEVSLD schematisch dargestellt.

Schwarz: 600 MHz; grau: 750 MHz.

Keine Beiträge für einige Reste im τ_{loc} - und R_{ex} -Plot deuten auf einfache Modelle für diese Reste ohne Heranziehung von τ_{loc}/R_{ex} (s. Kapitel 2.1.8 „Dynamikanalyse“).

des Moleküls im Bereich 0.75-0.95 liegt.

Im Stem-Bereich liegt der Ordnungsparameter für Basen etwas höher als für Ribose. So beträgt für Ribose der durchschnittliche S^2 -Wert ca. 0.80 und für Basen ca. 0.89. Maximale Unterschiede zwischen Ribose und Basen zeigen die Reste in 5'- und 3'-Termini 1 – 3 und 16 – 18 mit einem Maximalwert von 0.19 für C18. Die Reste 12-18 haben etwas höhere S^2 -Werte als die Reste 1-7 (0.78 gegen 0.82 für Ribose und 0.89 gegen 0.91 für Basen). Im Loop-Bereich liegt der durchschnittliche S^2 -Wert bei 0.85 für Ribose und Basen. Für Basen gibt es signifikante Unterschiede im Stem zwischen Purin- und Pyrimidin-Atomen. Der durchschnittliche S^2 -Wert im Stem für Purine liegt bei 0.88, und für Pyrimidine bei 0.92, im Loop liegen beide Werte um 0.85.

Obwohl es einige Unterschiede im Ordnungsparameter für alle Reste gibt, liegt er in einem engen Bereich zwischen 0.75-0.95 und die Unterschiede zwischen den einzelnen Resten betragen nicht mehr als 0.2. Als signifikant können Unterschiede im Ordnungsparameter gelten, die größer als 0.2 sind. Deshalb lässt sich sagen, dass das RNA-Molekül eine homogene Beweglichkeit aufweist. Siehe hierzu auch die Diskussion.

Der Beitrag des konformationellen Austausches zur Relaxationsgeschwindigkeit $R_{1\rho}$ [24,26] R_{ex} deutet für Proteine auf geordnete Strukturelemente hin. Für den BEVSLD ist R_{ex} relativ regelmäßig über das gesamte Molekül verteilt. Grosse Beiträge des konformationellen Austausches zu $R_{1\rho}$ können Inhomogenitäten in $R_{1\rho}$ erklären, wenn für dieselben Reste gleichzeitig Homogenität in S^2 beobachtet wird. Wenn wir die Differenz $R_I - R_{1\rho}$ für den BEVSLD berechnen, zeigt diese ein homogenes Bild für das RNA-Molekül.

Für die RNA-Analyse wurde für keinen Rest das Modell mit lokalen Korrelationszeiten verwendet. Das bedeutet jedoch nicht, dass die lokalen Korrelationszeiten gleich Null sind, sondern dass sie nur sehr niedrig (< 0.1 ns) sind.

4.2 MD-Simulation

Bei der MD-Simulation wurden verschiedene Methoden der Äquilibration verwendet. Die besten Endparameter und beste Systemstabilität haben für das Onkoprotein E7 und den BEVSLD die Prozeduren 3 geliefert (s. Abschnitt 3.2). Weiter wurden diejenigen MD-Läufe analysiert, die mittels dieser Prozeduren erhalten und mit einer Schrittweite von 1 fs berechnet wurden. Rechnungen mit $\Delta t=2$ fs wiesen eine schlechtere Stabilität für einige Reste sowohl für das Onkoprotein E7, als auch für den BEVSLD auf, was auf den SHAKE-Algorithmus bei $\Delta t=2$ fs zurückgeführt werden kann.

4.2.1 Onkoprotein E7

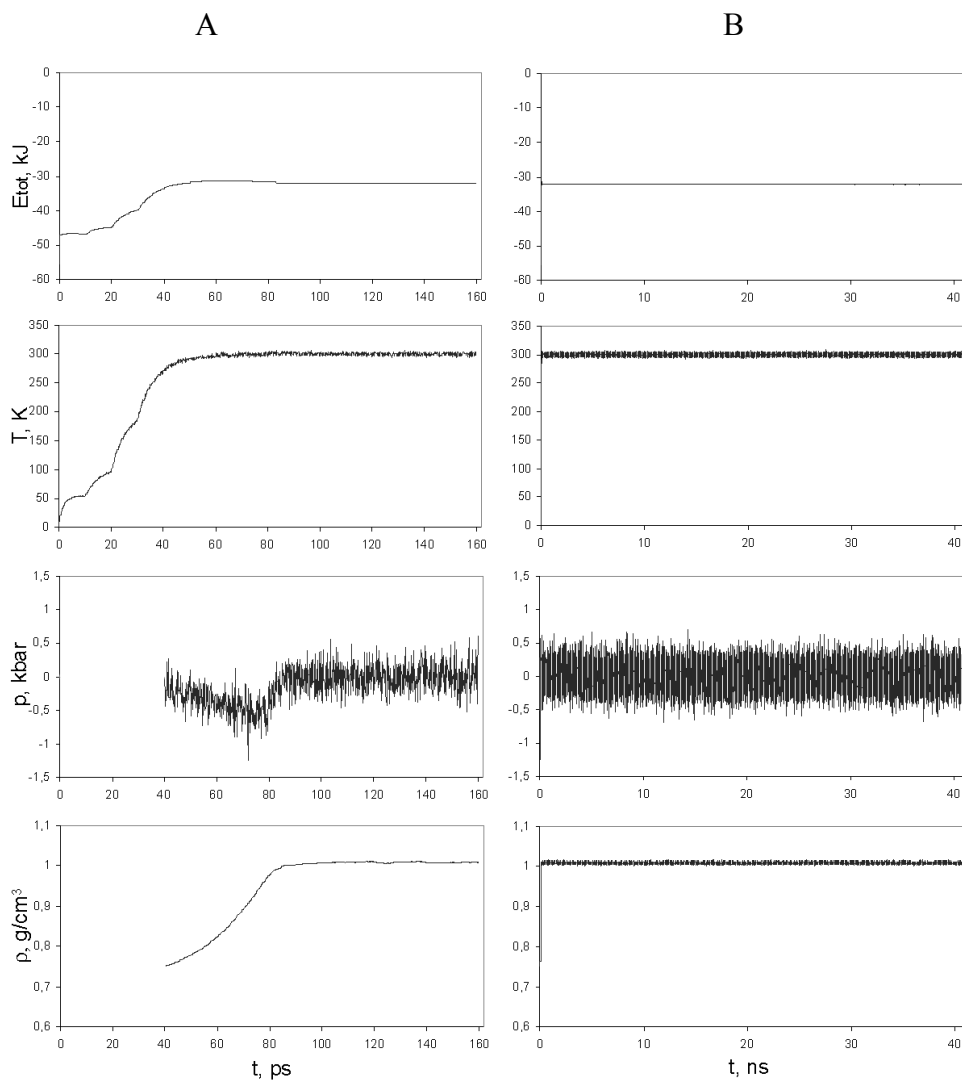


Abb. 4.10. Die Parameter des Systems „E7-Wasser“ während der MD-Simulation.

A: Äquilibration (0-160 ps), B: ganzer MD-Lauf (0-40 ns); E_{tot} - Gesamtenergie; T - Temperatur; p - Druck (der durchschnittliche Wert für die gesamte Simulation lag bei dem erwarteten Wert von 1 bar); ρ - Dichte.

Das Onkoprotein E7 kommt in der Natur als Dimer vor und wurde so auch während der NMR-Experimente vermessen. Für die MD-Simulation wurde im Gegensatz hierzu ein Monomer-Modell verwendet, da die MD-Simulation von Dimeren mit einem sehr großen Zeit- und Rechnerleistungsaufwand verbunden (1 ns Simulation \approx 5 Tage Höchstleistung des Rechners) ist. Die Strukturinformation für das E7-Dimer ist erst seit wenigen Wochen vorhanden, deswegen war es nicht möglich, eine aussagekräftige MD-Simulation eines Dimers in der vorhandenen Zeit durchzuführen. Dennoch erlaubt MD-Simulation eines Monomers nicht nur Aussagen über die Stabilität bzw. Dynamik im „theoretischen“ Monomerezustand sondern auch Information für kanonische Strukturelemente im Dimerzustand zu bekommen (Beweglichkeiten von kanonischen Elementen sollten in einem Monomer und einem Dimer ungefähr gleich sein, da stabilisierende WW schon in der Monomerstruktur vorhanden sind: z.B., H-Brücken in α -Helices). Zudem sollten auch solche ASn zu identifizieren sein, die in der Monomernäherung nicht erfolgreich modelliert werden können (niedrigere Stabilität während der MD-Simulation).

Die physikalischen Parameter der MD-Simulation von E7 in einem Wassermodell (Energie, Temperatur, Druck, Dichte) sind in Abb. 4.10 dargestellt (links sind Parameter während der Äquilibration und rechts während der gesamten Simulation). Wie man sehen kann, ändern sich die Parameter schnell aber gleichmäßig während der ersten 60 ps und erreichen dann einen Gleichgewichtszustand. Der Druck und die Dichte sind erst ab $t=40$ ps definiert, da bis zu diesem Zeitpunkt das Volumen konstant gehalten wird.

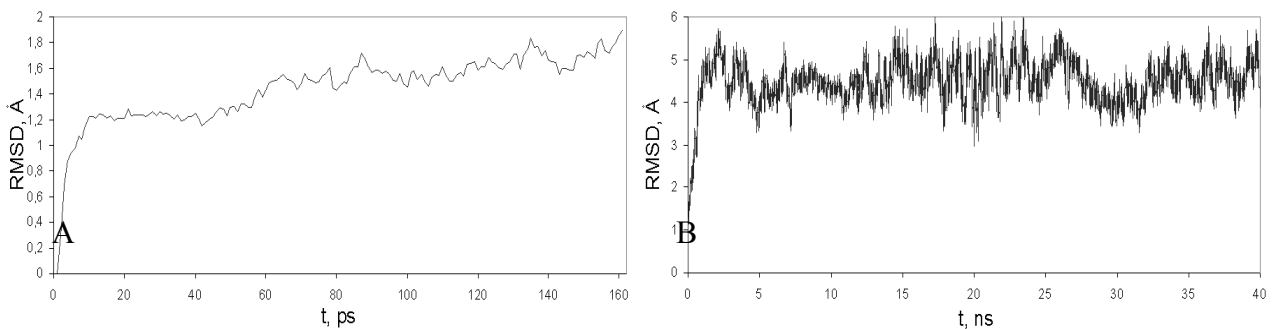


Abb. 4.11. RMSD-Verlauf für das Onkoprotein E7.

A: Äquilibration, B: gesamter MD-Lauf.

Während der letzten 100 ps der Äquilibration ändert sich der Systemzustand nur noch wenig weiter und bezüglich des MD-Parameters kommt das System in einen Gleichgewichtszustand. Während des gesamten MD-Laufes bleiben die Systemparameter stabil. Die durchschnittlichen Parameter der MD-Simulation mit Standardabweichung betragen: $E_{tot} = -32.084 \pm 0.021$ kJ (0.07

%), $E_{kin} = 7.801 \pm 0.054$ kJ (0.7 %), $E_{pot} = 39.855 \pm 0.059$ kJ (0.2 %), $T = 300.0 \pm 2.1$ K (0.7 %), $\rho = 1.0089 \pm 0.0021$ g/cm³ (0.2 %), $p \sim 1$ bar.

Erster Schritt in der Analyse einer MD-Simulation ist die Berechnung des RMSD-Wertes für das gesamte Molekül und für einzelne Reste. Der RMSD-Verlauf ist in Abb. 4.11 dargestellt. Das System erreicht seinen Gleichgewichtszustand bezüglich RMSD während der Äquilibration nicht, für das Erreichen eines Quasi-Gleichgewichtszustands braucht es ca. 5 Nanosekunden.

Während des gesamten MD-Laufes ist der RMSD-Wert nicht besonders stabil. Der durchschnittliche Wert beträgt 4.5 Å mit einem Minimalwert von 3.2 Å, einem Maximalwert von 5.8 Å und einer Standardabweichung von 0.5 Å. Der große RMSD-Wert kann evtl. durch die Anwendung des Monomermodells erklärt werden, wodurch einige stabilisierende Wechselwirkungen durch das zweite Molekül verloren gehen.

Um den Beitrag von einzelnen ASn zum gesamten RMSD zu untersuchen, wurde der RMSD-Verlauf für jede AS getrennt charakterisiert. Der gemittelte RMSD-Wert ist in Abb. 4.12 dargestellt. Aus dieser Abbildung ist zu ersehen, dass es keine Korrelation zwischen Sekundärstruktur und RMSD-Werten gibt. Der durchschnittliche RMSD-Wert liegt zwischen 0.2 Å (Rest 52, terminale α -Helix) und 1.95 Å (Rest 9, β_1 -Faltblatt). Der RMSD-Verlauf zeigt während der MD-Simulation zahlreiche Übergänge, die durch Änderungen in den Diederwinkeln verursacht werden. Die maximale Standardabweichung hat Rest 41 (am Ende der α_1 -Helix), minimale Standardabweichung zeigen die Reste 21 (β_2 -Faltblatt) und 52 (terminale α_2 -Helix). Die fehlende

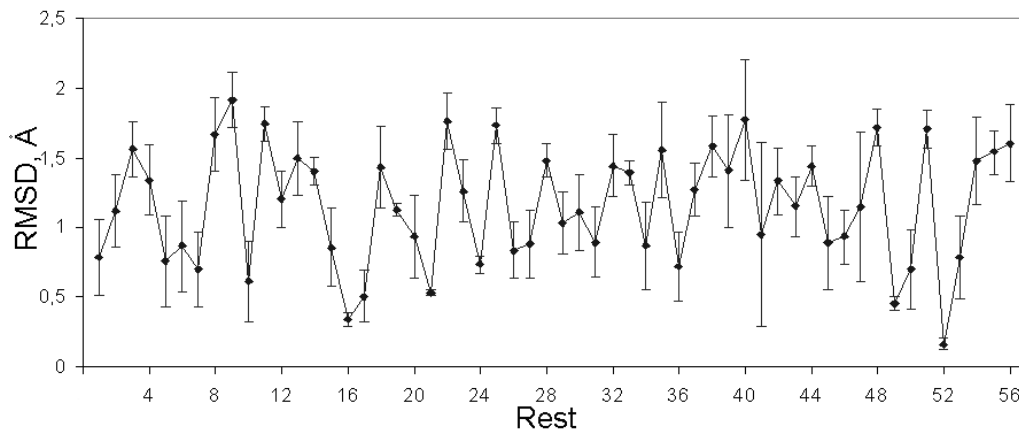


Abb. 4.12. RMSD-Wert für einzelne Reste des Onkoproteins E7. Es ist auch die Standardabweichung des RMSD während der gesamten MD-Simulation dargestellt.

Korrelation der RMSD-Daten mit den Sekundärstrukturelementen kann evtl. dadurch erklärt werden, dass nicht das Dimer sondern ein in der Natur nicht existierendes Monomer modelliert wurde. Außerdem können einzelne Strukturelemente nur beschränkte Beweglichkeit aufweisen, obwohl ihre Übergangsregionen flexibel sind. Dadurch können starke Bewegungen des gesamten

Strukturelementes entstehen (was z.B. für die α_2 -Helix beobachten werden kann). Der RMSD-Wert für einzelne Reste liefert insofern keine aussagekräftige Information über die Beweglichkeit derselben.

Über die Berechnung des thermischen B-Faktors, der die Beweglichkeit der einzelnen Reste charakterisiert, kann ein Vergleich mit dem Ordnungsparameter des Lipari & Szabo-Modells erreicht werden. Der B-Faktor für das Onkoprotein E7 ist in Abb. 4.13 dargestellt. Wie ersichtlich, nimmt der B-Faktor höhere Werte für Aminosäuren im N-Terminus, C-Terminus, für die Übergangsregion 30 – 32 und ASn 46 – 47 an. Der B-Faktor ist somit weitgehend mit der Sekundärstruktur korreliert. Trotz höher Beweglichkeit von einzelnen Resten, bleibt das Molekül

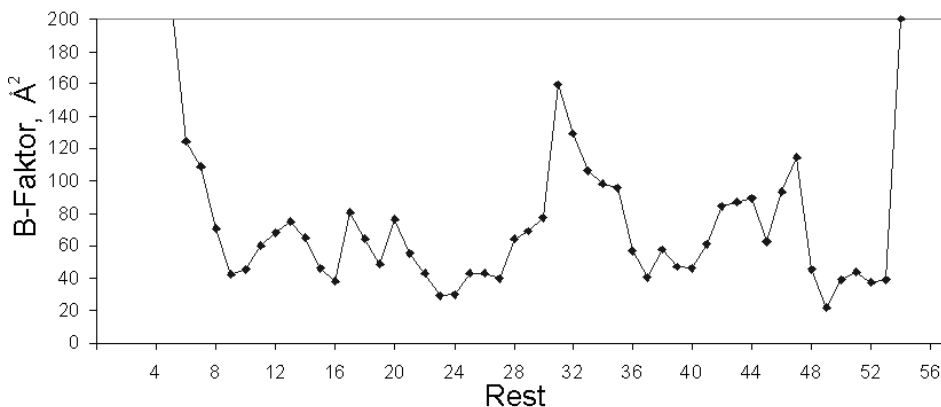


Abb. 4.13. B-Faktor für das Onkoprotein.

während der Simulationszeitspanne insgesamt stabil, was sowohl in der visuellen Einschätzung des Moleküls mittels des Programms VMD beobachtet werden kann, als auch durch die RMSD- und B-Faktor-Analyse, die hohe, aber stabile Werte zeigen, bestätigt wird.

Ordnungsparameteranalyse

Zur Berechnung des Ordnungsparameters dienen die NH-Bewegungen der Hauptkettenamide. Es konnten verschiedene Typen des Korrelationsfunktionenverlaufes beobachtet werden. In der Regel wiesen alle Korrelationsfunktionen einen sehr schnellen Abfall in der Zeitskala auf, die kleiner, als der Speicherschnitt war. Gefolgt wurde dieser initiale Abfall von einer weiteren allmählicheren Funktionsreduzierung in der nächsten Zeitperiode (Abb. 4.14). Die Korrelationsfunktionen für alle Aminosäuren reduzieren sich um 12 – 20 % im Laufe der ersten Pikosekunden. Ähnliche Ergebnisse wurden auch in anderen MD-Simulationen [14,25] beobachtet. Zusätzlich zum Subpikosekundenabfall, wird in der Literatur auch ein sehr schneller $C(t)$ -Abfall um 7 – 8 % während der ersten Femtosekunden beobachtet [25], der jedoch bei uns wegen des höheren Speicherzeitschritts (1 ps vs. 2 fs in [25]) nicht nachgewiesen werden konnte.

Der Hauptbeitrag am initialen Abfall der Autokorrelationsfunktion $C(t)$ ist mit den Librationsbewegungen der NH-Bindungen verbunden [14,25,36]. Die Aminosäuren kann man entsprechend des $C(t)$ -Verlaufes in folgende Klassen einteilen:

- 1) $C(t)$ fällt sehr schnell bis Null während der ersten Pikosekunden ab und liegt dann ständig bei Null. Beobachtet bei ASn: 1 – 5 (N-Terminus); 54 – 55 (Teil der α_2 -Helix); 56 (C-Terminus).
- 2) $C(t)$ ist nicht stabil während gesamtes MD-Laufes, ein Plateau-Wert existiert nicht. Beobachtet bei ASn: 25 – 26 (β_2 -Faltblatt); 31 – 32 (Übergangszone), 45 – 47 (β_3 -Faltblatt).

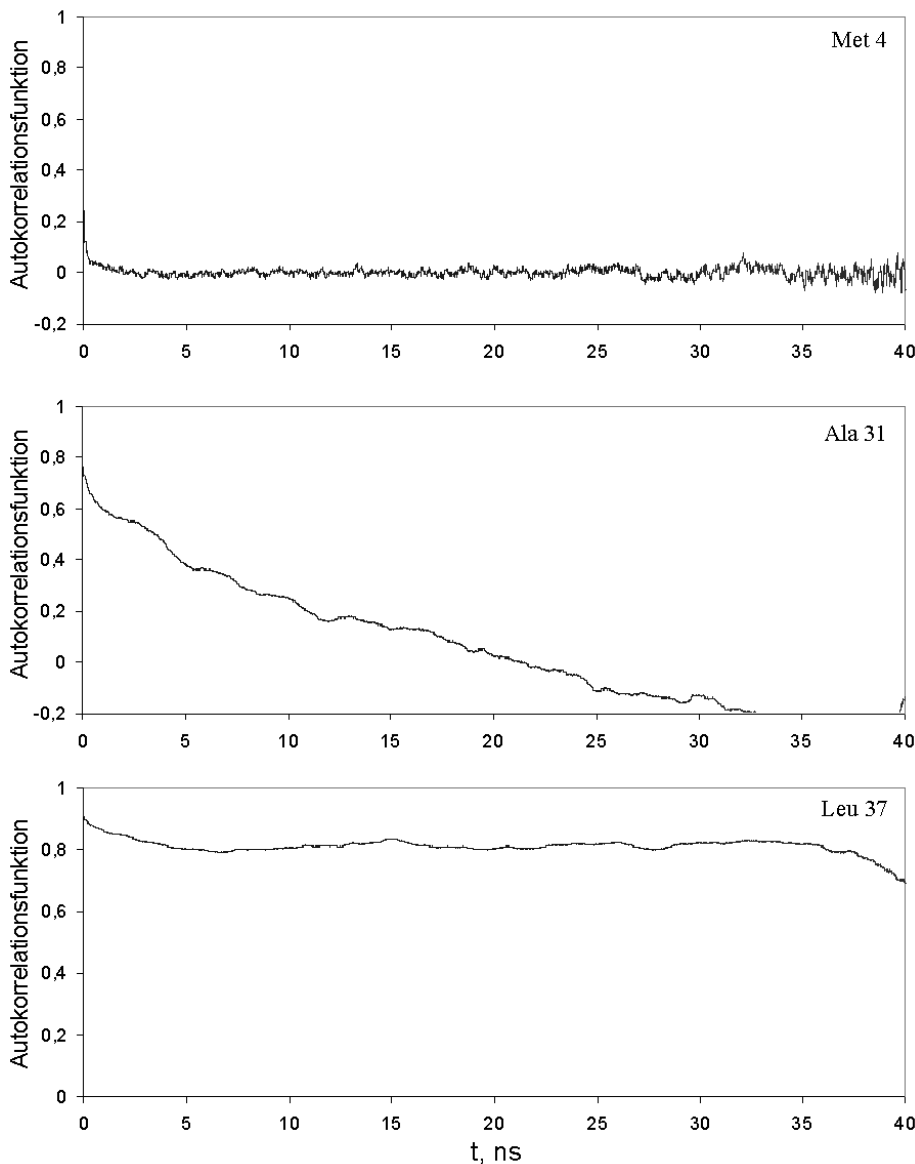


Abb. 4.14. Verlauf der Autokorrelationsfunktion für einige charakteristische Reste im Onkoprotein E7.

- 3) $C(t)$ ist bedingt stabil während des gesamten MD-Laufes, als Plateau-Wert für die Ordnungsparameterberechnung wurde ein durchschnittlicher Wert für $C(t)$ während der Periode von der 5.0 – 35.0 ns der MD-Simulation angenommen. Beobachtet bei ASn: 6 – 9 (teilweise β -

Faltblatt (8 – 9)); 13 (β_1 -Faltblatt); 16 – 18 (teilweise β_1 -Faltblatt (16)); 20; 29 – 30; 43 – 44; 49 (Übergangszonen).

- 4) $C(t)$ ist relativ stabil während gesamtes MD-Laufes (Stabilität höher als im Fall 3). Beobachtet bei ASn: 14 – 15 (β_1 -Faltblatt); 19, 48 (Übergangszonen).
- 5) $C(t)$ ist stabil während gesamtes MD-Laufes; $C(t)$ fällt im Laufe der ersten Nanosekunden und hat einen eindeutig mit kleinem Fehler zu bestimmenden Plateau-Wert. Beobachtet bei ASn: 10 – 12 (β -Faltblatt); 27 – 28 (β_2 -Faltblatt); 33 – 42 (α_1 -Helix); 51 – 53 (α_2 -Helix).

Der Korrelationsfunktionverlauf stimmt für folgende Aminosäuren gut mit der Sekundärstruktur überein: 1 – 5 (N-Terminus), 9 – 12, 21 – 24, 28 (β -Faltblätter); 33 – 42, 51 – 53 (α -Helices), 56 (C-Terminus). Für die übrigen Aminosäuren, entspricht das experimentelle Verhalten der Korrelationsfunktion der Sekundärstruktur nicht. Aus den Korrelationsfunktionen wurden anschließend mittels der Beziehungen (25-27) die Ordnungsparameter und lokalen Korrelationszeiten berechnet, die entsprechend in den Abb. 4.15 und 4.16 dargestellt sind.

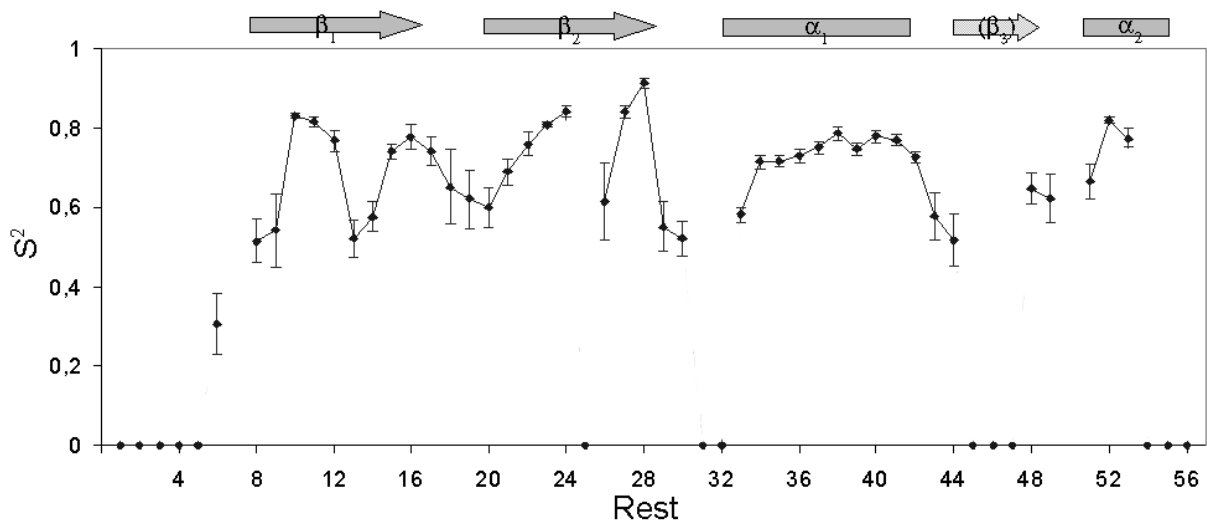


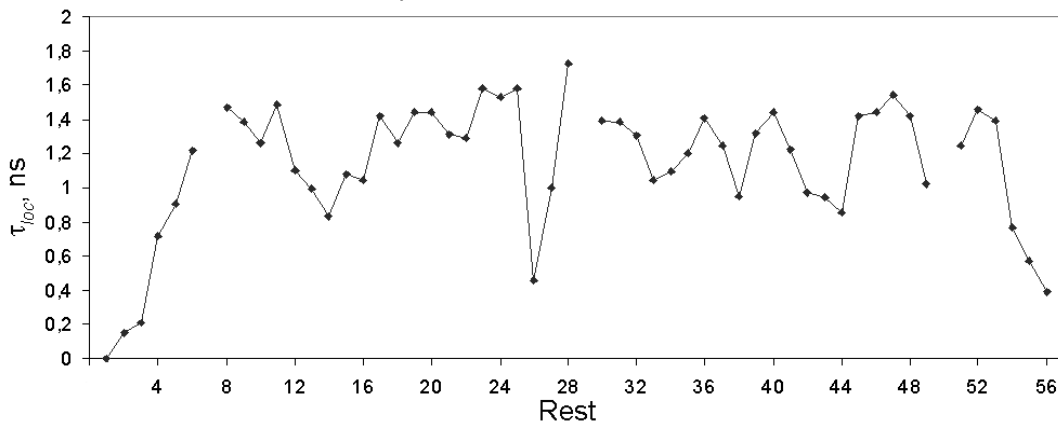
Abb. 4.15. Ordnungsparameter für das Onkoprotein E7 aus der MD-Simulation mit Standardabweichungen als Fehlerbalken. Über der Abbildung sind die entsprechenden Elemente der Sekundärstruktur dargestellt.

Wie man sehen kann, korreliert der Ordnungsparameter aus der MD-Simulation nicht vollständig mit der Sekundärstruktur. Gute Korrelation kann für Reste 5 – 8 (N-Terminus), teilweise 8 – 17 (β -Faltblatt), 34 – 42 (α_1 -Helix) beobachtet werden. Bereiche mit hinreichender Korrelation gibt es auch für einige Reste im β_2 -Faltblatt und in der terminalen α_2 -Helix. Differenzen in den S^2 -Werten, die kleiner als 0.2 waren, können als nicht signifikant gelten. Auffallend sind aber S^2 -Werte gleich Null für die Reste 25 (β_2 -Faltblatt), 31-32 (Übergangsregion), 45-47 (β_3 -Faltblatt). Einen auf den ersten Blick unerklärbaren Rückgang des Ordnungsparameters kann man auch für Reste 13-14 und 26 beobachten. Ein sehr niedriger aus der MD-Simulation des in der Natur nicht

existierenden Monomern erhaltener Ordnungsparameter deutet auf die Instabilität dieser Elemente im Monomer hin. Das β_3 -Faltblatt existiert nur im Dimerzustand und die entsprechenden Reste 13 – 14, 25 – 26, 45 – 47 werden durch die Dimerstruktur stabilisiert, wo einige dieser Reste ein intermolekulares β -Faltblatt bilden, das stabilisierende H-Brücken enthält.

In Abb. 4.16 sind Korrelationszeiten der lokalen Bewegungen dargestellt. In diesem Fall hat die Korrelationszeit der lokalen Bewegungen eine andere Bedeutung als die aus NMR-Experimenten extrahierten lokalen Korrelationszeiten. Die lokalen Korrelationszeiten aus der MD-Simulation können Beiträge von Rotationsbewegungen beinhalten, die von der lokalen Bewegung nicht vollständig abgetrennt werden können [36,37]. Im Gegensatz zu den lokalen Korrelationszeiten aus NMR-Experimenten bedeuten die dargestellten hohen lokalen Korrelationszeiten nicht reale lokale Korrelationszeiten, sondern entsprechen nur dem nicht eliminierten Betrag der Globalbewegungen. Der τ_{loc} -Wert ist ungleich Null für praktisch alle Aminosäuren. Besonders niedrig liegt der τ_{loc} -Wert aber für ASn in den terminalen Bereichen. Das bedeutet, dass kleinere Korrelationszeiten auf die schnelleren lokalen Bewegungen hinweisen. N- und C-terminale Reste haben keinen bedeutenden Beitrag von Globalbewegungen (s.u.), die Reste

Abb. 4.16. τ_{loc} -Werte für das Onkoprotein E7.



in der Kernregion hingegen nehmen an Globalbewegungen „aktiv“ teil. Als glaubwürdig können die τ_{loc} -Werte für die Aminosäuren 1-8 (N-Terminus); 8 – 12, 15 – 17, 21 – 24, 27 – 28 (β -Faltblätter); 33 – 42, 50 – 53 (α -Helices); 56 (C-Terminus) gelten. τ_{loc} -Werte für die übrigen ASn sind weniger aussagekräftig, da die entsprechenden ASn instabile $C(t)$ -Funktion haben.

Die τ_{loc} -Werte aus der MD beschreiben die Geschwindigkeit der lokalen Bewegungen und τ_{loc} -Werte aus NMR weisen auf das Vorhandensein von signifikanten Lokalbewegungen hin. Wenn das berücksichtigt wird, kann man eine formale Korrelation zwischen τ_{loc} -Werten aus NMR und MD beobachten.

Diederwinkelanalyse

Der Diederwinkel-Verlauf für das Onkoprotein E7 wurde analysiert. Die Winkel aus verschiedenen Resten zeigen unterschiedliche Verläufe. In Abb. 4.17 sind Verläufe der Winkel

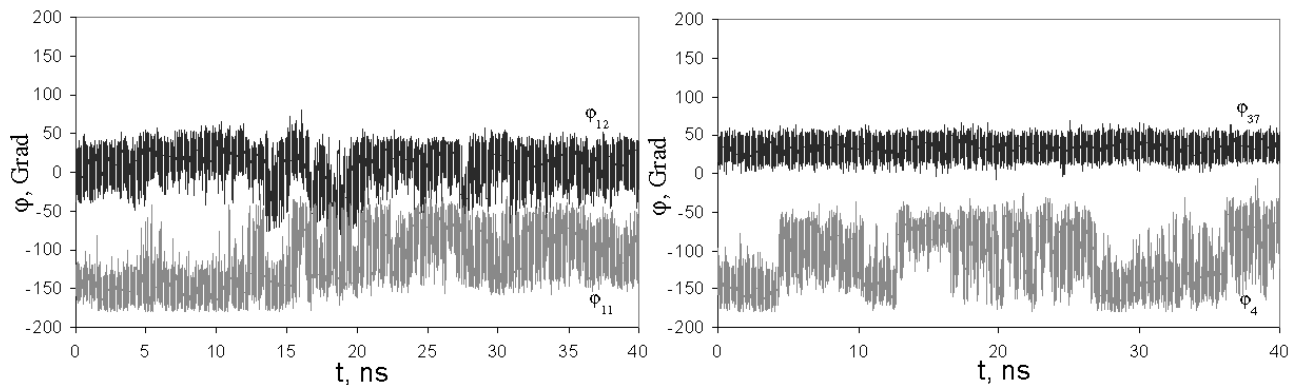


Abb. 4.17. Diederwinkeltrajektorien für das Onkoprotein E7. Winkel φ_{12} und φ_{37} sind um $+ 90^\circ$ verschoben, um die Darstellung zu verbessern.

$\varphi_{12}/\varphi_{11}$ (Nachbarreste im β -Faltblatt) und φ_{37}/φ_4 (φ_{37} liegt in der großen α -Helix, φ_4 liegt im N-Terminus) dargestellt. Wie man sehen kann, sind die φ -Winkel im β -Faltblatt nicht besonders stabil und zeigen relativ hohe Variabilität. Gleichzeitig kann man eine Korrelation im Verlauf der Diederwinkel beobachten: markante Übergänge zu den Zeitpunkten 5 ns, 14 ns, 16 ns u.a., die für zwei verschiedene Reste gut korreliert sind.

Die AS Leu37 zeigt im Gegenteil eine ausgezeichnete Stabilität mit kleiner Streuung, φ_{37} bleibt konstant während der gesamten MD-Simulation. Um den Unterschied darzustellen, ist im gleichen Bild der φ -Verlauf für Rest 4 (N-Terminus) gezeigt. Dieser Winkel ist außerordentlich instabil und streut stark, er hat viele Übergänge, was charakteristisch für Reste in ungefalteten Termini ist. Andere Diederwinkelverläufe (z.B. ψ) sehen ähnlich aus, d.h. die für die φ -Winkel festgestellten Gesetzmäßigkeiten gelten auch für ψ -Winkel.

Fourier-Analyse

Es wurden RMSD-, $C(t)$ -, Diederwinkelverläufe Fourier analysiert. In der Fourier-Analyse konnten keine bedeutenden Beiträge von bestimmten Frequenzen identifiziert werden. Das spricht dafür, dass das MD-Programm die Globalbewegung vollständig entfernt hatte und keine Bewegungsterme mit signifikanter Periodizität beobachtet werden können.

Kreuzkorrelationsanalyse

Außerdem wurden für alle Paare der Aminosäuren die Kreuzkorrelationsfunktionen berechnet. Die Analyse dieser Kreuzkorrelationsfunktionen zeigt eine große Abhängigkeit in der Bewegung aller Aminosäuren der einzelnen α -Helices (Minimalwert des Korrelationskoeffizientes beträgt 0.75, Maximalwert liegt bei 0.9). Auch β -Faltblätter zeigen eine hohe Kreuzkorrelation (Minimalwert liegt bei 0.7, Maximalwert beträgt 0.85), was auch für die benachbarten Aminosäuren gilt (für alle ausschließlich N-, C-Termini und einige Reste in Kernregion nicht niedriger als 0.7). Daraus kann man folgern, dass das Molekül stabil ist, obwohl ein Monomermodell untersucht wird. Es wurden aber auch Aminosäuren beobachtet, die hohe Kreuzkorrelationswerte haben obwohl sie sequentiell weit voneinander entfernt liegen. Diese hohen Bewegungskorrelationen kann man z.B. dadurch erklären, dass bei diesen Aminosäuren die lokalen Bewegungsvorgänge vollständig fehlen können, und sie nur globale Rotationsbewegung aufweisen. Solche Ergebnisse wurden für Bewegungen der einzelnen Aminosäuren in zwei verschiedenen α -Helices (der Kreuzkorrelationskoeffizient liegt bei 0.5-0.6), und auch in einigen Übergangszonen beobachtet. Die Wechselbeziehung in der Bewegung der Aminosäuren aus β -Faltblättern (z.B. 14 und 23, 10 und 27) wird selbstverständlich durch die Existenz der Wasserstoffbrücken zwischen diesen ASn erklärt.

Um die Resultate der Kreuzkorrelationsauswertung zu bestätigen, wurde eine Analyse der Wasserstoffbrücken für den MD-Lauf durchgeführt. Die Analyse hat gezeigt, dass für die Aminosäuren 33 – 43 und 50 – 53 (α -Helices) Wasserstoffbrücken des Typs $\text{CO}_i\text{-NH}_{i+4}$ existieren. Für ASn 10:27, 14:23, 16:21 (β -Faltblätter) wurden Wasserstoffbrücken entsprechend $\text{CO}_{i-1}\text{-NH}_j$ und $\text{NH}_{i+1}\text{-CO}_j$ nachgewiesen. Die Existenzdauer der Wasserstoffbrücken beträgt (prozentual zur gesamten Trajektorie) für die ASn in der großen α -Helix: von 88 % (39:43) bis 98 % (34:38); in der kleinen α -Helix: 70 % (49:53); in β -Faltblättern: von 55 % (14:23) bis 85 % (16:21). Auf solche Weise bestätigt die Wasserstoffbrückenanalyse die Resultate der Kreuzkorrelationsfunktionsanalyse und damit auch die Molekülstabilität.

IRED-Analyse

Um die Rechtmäßigkeit der Anwendung des Lipari & Szabo-Modells zu bestätigen, wurde eine IRED-Analyse für das Onkoprotein E7 durchgeführt, die es erlaubt, die Trennbarkeit von lokalen und globalen Bewegungsvorgängen einzuschätzen (s. Abschnitt „Grundlagen“). In Abb. 4.18 ist ein Gap zwischen den Lokal- und Globalbewegungseigenwerten für das Onkoprotein E7 zu erkennen. Obwohl dieses Gap klein ist, zeigt es eine gute Trennbarkeit zwischen den Bewegungsmoden (s. unten). Entsprechend der Formeln (40 – 42) wurden δS^2 -Werte berechnet, die

in Abb. 4.19 dargestellt sind. Hierbei ist links δS^2 für die Globalmoden dargestellt (1 und 4) und rechts die δS^2 -Werte für die Lokalmoden (7 und 8). Es ist gut sichtbar, dass Beiträge zu Globalmo-

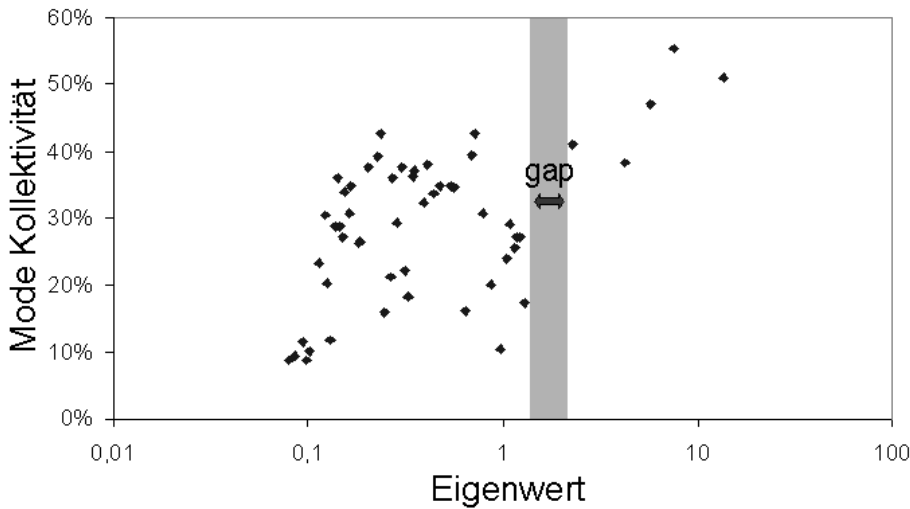


Abb. 4.18. IRED-Analyse für das Onkoprotein E7. Ein Gap zwischen Global- und Lokaleigenwerten ist gekennzeichnet.

den für diejenigen Molekülelemente hoch sind, die zu einer geordneten Struktur gehören. Das gleiche Bild zeigen auch die Globalmoden 2, 3 und 5 (nicht dargestellt). Die Mode 1 sieht so aus, dass sie die meisten Beiträge zur β -Faltblatt-Bewegung bringt. Erstaunlicherweise zeigt Mode 1

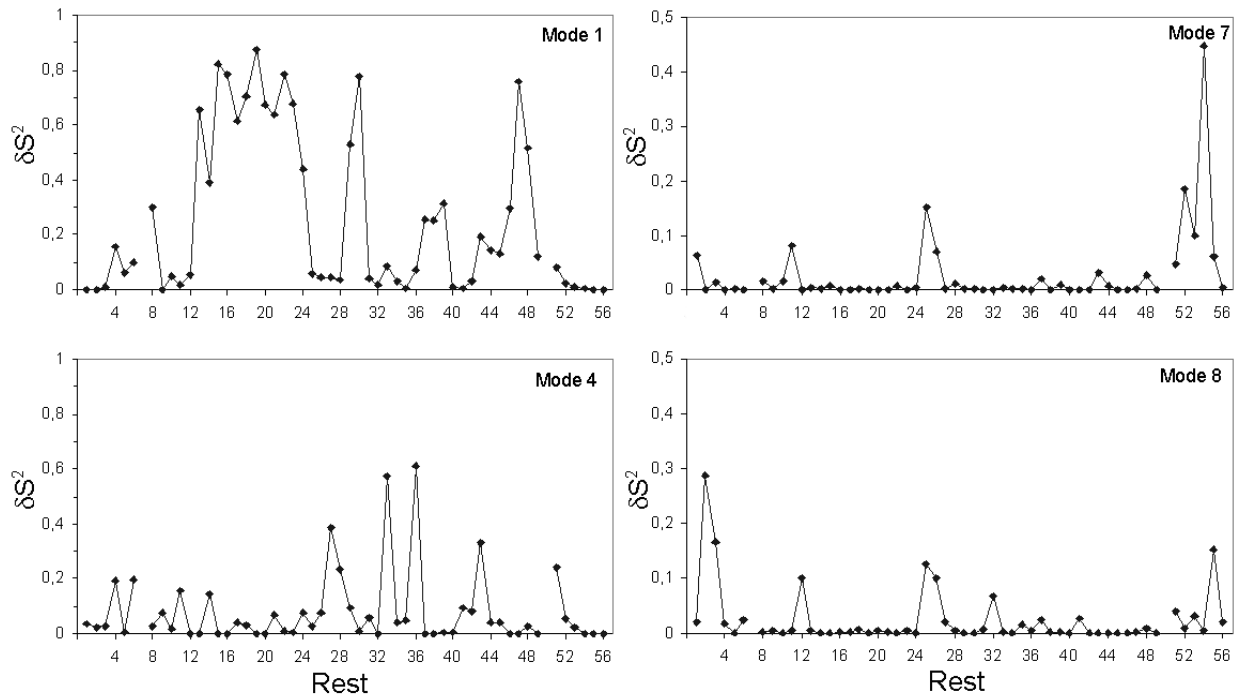


Abb. 4.19. δS^2 für das Onkoprotein E7. Moden 1, 4: Globalmoden; Moden 7,8: Lokalmoden.

auch höhere δS^2 -Werte für die Reste 46-48, die in der MD-Simulation gar nicht erfolgreich modelliert werden konnten. Das kann damit verbunden sein, dass Reste 45-48 in Dimerzustand ein intermolekulares β -Faltblatt bilden und die Möglichkeit für dieses Dimerstrukturelement schon im Monomer durch Einschränkung der Beweglichkeit angelegt ist. Das gilt als wahrscheinlich, weil eigentlich die gesamte Sekundär- und Tertiärstruktur schon durch Reihenfolge der ASn in Sequenz vorherbestimmt wird [38].

Alle Globalmoden zeigen niedrige δS^2 -Werte für nicht stabile Elemente, d.h. 1-5, 53-56, 31-32, auch 44-48 (außer Mode 1). Im Gegensatz hierzu zeigen alle Lokalmoden hohe δS^2 -Werte hauptsächlich für nicht stabile und stark bewegliche Elemente des Moleküls: 1 – 5, 25, 31 – 32, 53 – 56, nicht aber 45 – 48. Das bestätigt unsere Vermutung über die Stabilität der Reste 45 – 48 und die hohe Beweglichkeit von Resten in den N-, C-Termini und Übergangszonen.

4.2.2 BEVSLD

Die physikalischen Parameter des Systems „RNA-Wasser“ (Energie, Temperatur, Druck, Dichte) während der MD-Simulation sind in Abb. 4.20 dargestellt. Wie man sehen kann, ändern sich die Parameter schnell aber gleichmäßig während der ersten 60 ps und erreichen dann einen Gleichgewichtszustand. Druck und Dichte sind erst nach $t=40$ ps definiert, da bis zu diesem Zeitpunkt das Volumen konstant gehalten wurde. Während der letzten 100 ps der Äquilibration kommt das System in einen Gleichgewichtszustand. Im Laufe des gesamten MD-Laufes bleiben die Systemparameter stabil, die durchschnittlichen Parameter der MD-Simulation mit Standardabweichung betragen:

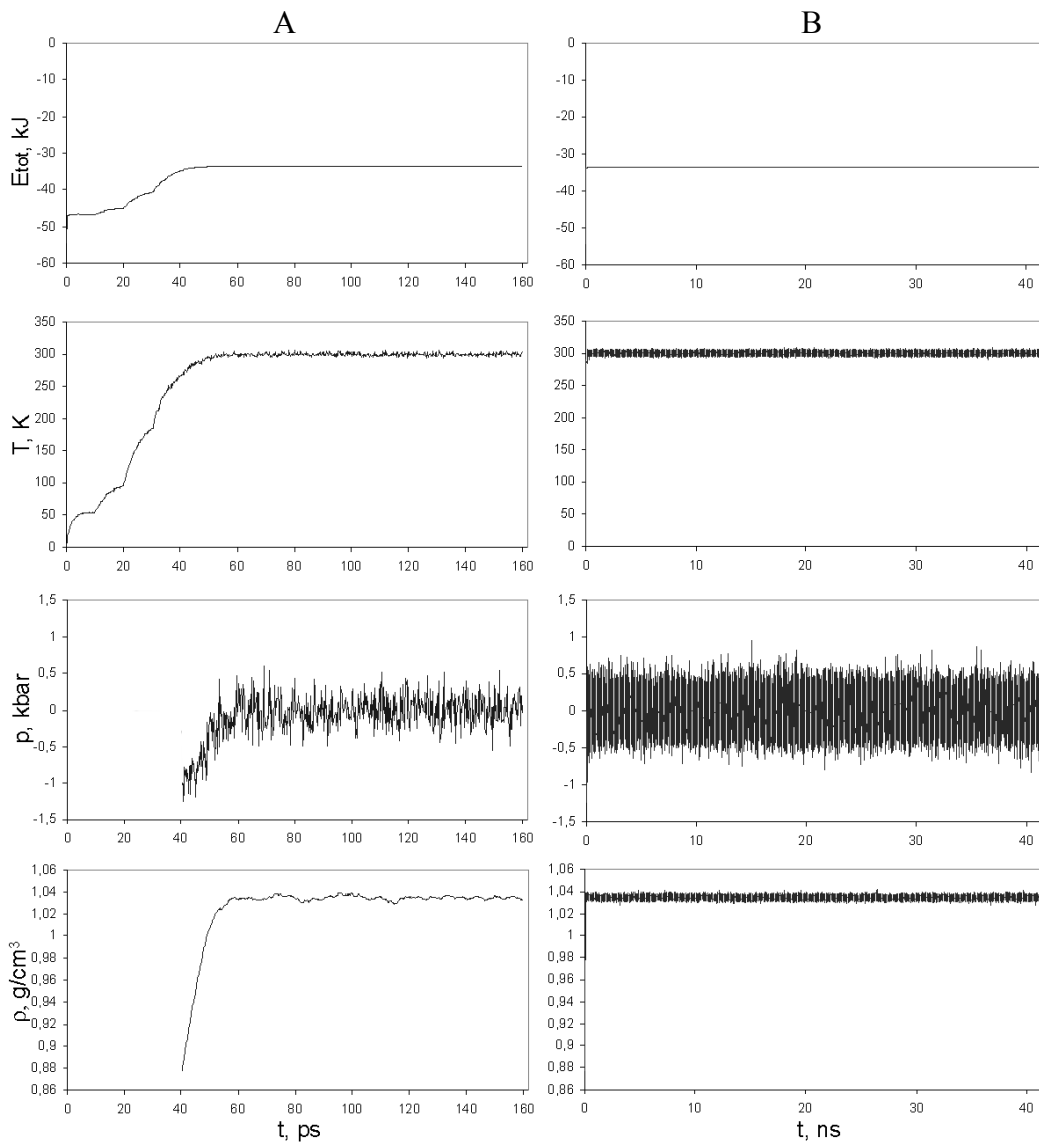


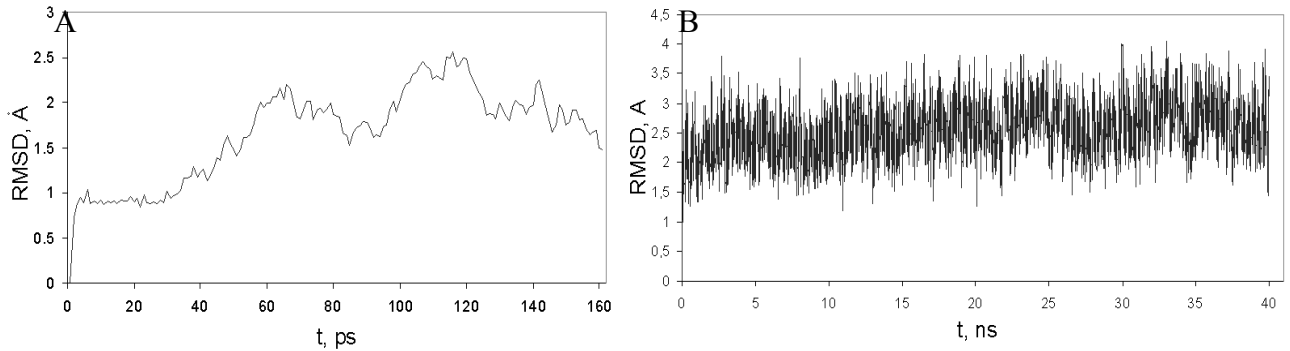
Abb. 4.20. Die Parameter des Systems „RNA-Wasser“ während der MD-Simulation.

A: Äquilibration (0-160 ps), B: gesamter MD-Lauf (0-40 ns);

E_{tot} - Gesamtenergie; T - Temperatur; p - Druck; ρ - Dichte.

$E_{tot} = 33.562 \pm 0.016$ kJ (0.05 %), $E_{kin} = 6.962 \pm 0.051$ kJ (0.7 %), $E_{pot} = 40.524 \pm 0.054$ kJ (0.1 %), $T = 300.0 \pm 2.2$ K (0.7 %), $\rho = 1.0347 \pm 0.0016$ g/cm³ (0.2 %), $p \sim 1$ bar (durchschnittlicher Wert über das gesamte Zeitintervall).

Zuerst wurde der RMSD-Wert berechnet. Der RMSD-Verlauf ist in Abb. 4.21 dargestellt. Das System erreicht seinen Quasi-Gleichgewichtszustand nach 60 ps der Äquilibration (RMSD ~ 2.0 Å). Während des gesamten MD-Laufes ändert sich der RMSD stark zwischen 1.2 Å und 4.0 Å. Abb. 4.21. RMSD-Verlauf für den BEVSLD während der MD-Simulation.



A: Äquilibrierungsperiode, B: gesamter MD-Lauf.

mit einem durchschnittlichen Wert von 2.7 Å und einer Standardabweichung von 0.4 Å. Ein durchschnittlicher Wert für RMSD-Werte einzelner Reste mit Standardabweichung während der Simulation ist in Abb. 4.22 dargestellt. Die Reste haben verschieden große RMSD-Werte von etwa 0.3 Å (Stem) bis zu ~ 0.8 Å (Loop, auch einige Reste in Stem). Besonders große RMSD-Werte zeigen die Reste 1, 9, 16 (große Variation) und 11/12 (kleine Variation). Es ist leicht zu sehen,

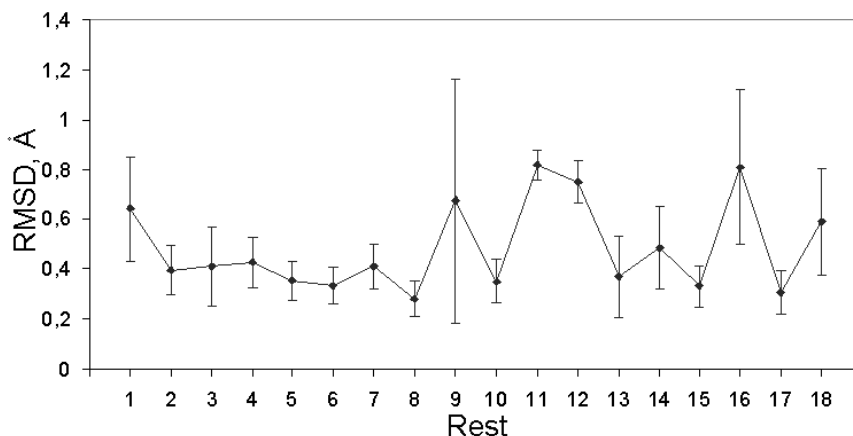


Abb. 4.22. Durchschnittlicher RMSD für einzelne Reste mit Standardabweichung als Fehlerbalken.

dass der 3'-Strang des RNA-Moleküls relativ größere RMSD-Werte zeigt. Die Diederwinkelanalyse zeigt als Grund, dass Reste im 3'-Strang häufigere Übergänge aufweisen (s.u.). Ob als Ursache für diese Asymmetrie der Bewegung von zwei verschiedenen Strängen eine physikalische Instabilität, die auch zu einem Aufschmelzen der RNA vom 3'-Ende her bei höheren Temperaturen führen sollte, existiert, bleibt noch abzuklären.

Die Berechnung des thermischen B-Faktors, der die Beweglichkeit von einzelnen Resten charakterisiert, führt zum in der Abb. 4.23 gezeigten Ergebnis für Ribose- und Basenatome. Der B-Faktor-Verlauf sieht ähnlich für Ribose- und Basenatome aus und liegt besonders hoch für Reste in 5'-Terminus (1-2) und für den Loop-Rest U9. Der durchschnittliche B-Faktor im 5'-Strang (3-7) liegt niedriger als für den 3'-Strang (12-17). Der B-Faktor für die Ribose von U9 liegt niedriger als der entsprechende Basenwert.

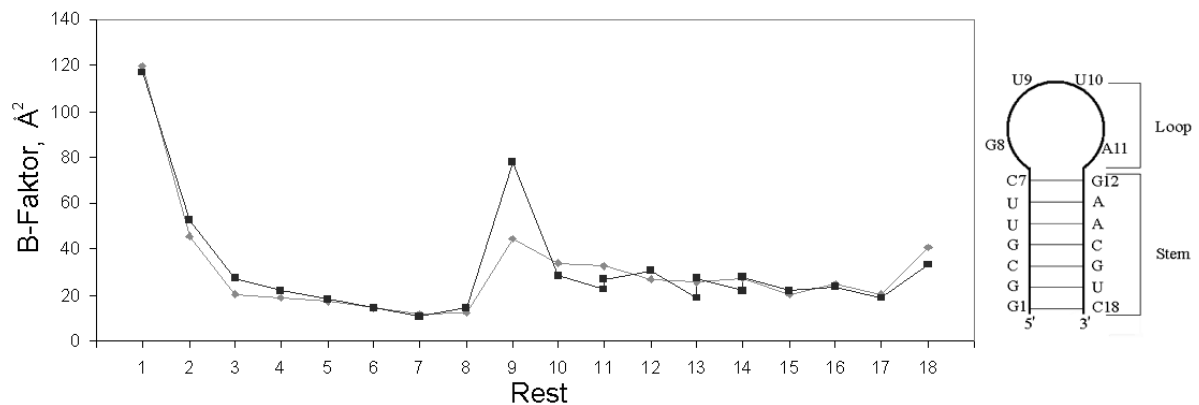
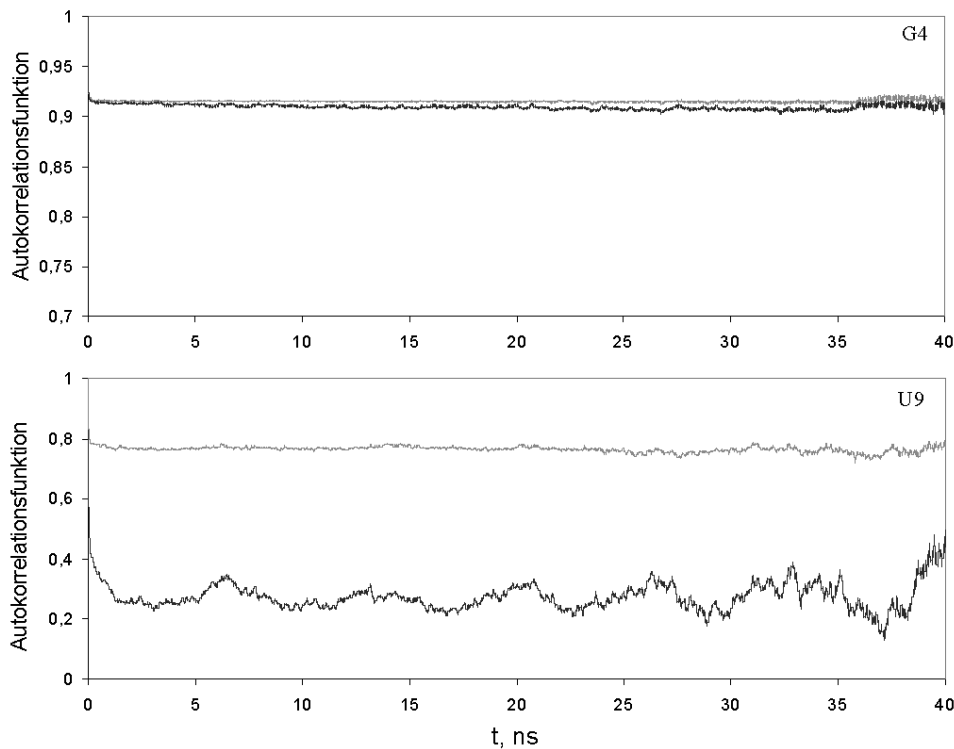


Abb. 4.23. B-Faktoren für den BEVSLD. Daneben ist die Struktur des BEVSLD schematisch dargestellt. Schwarz: Basen; grau: Ribose.

Schon aus der RMSD- und B-Faktor-Analyse kann über die Bewegung des RNA-Moleküls abgeleitet werden, dass die Molekültermini stärker beweglich als der zentrale Bereich des Stems sind. Interessanterweise ist der 3'-Strang beweglicher als der 5'-Strang. Besonders beweglich ist auch Rest U9. Eine genauere Betrachtung unter Einbeziehung der NMR-Datenanalyse erfolgt im Abschnitt „Diskussion“.

Ordnungsparameteranalyse

Für den BEVSLD wurden die Autokorrelationsfunktionen laut der Beziehungen (23-26) für die Bindungen C1'-H1' (Ribose) und C2-H2, C6-H6, C8-H8 (Basen) berechnet. Die wichtigsten Gesetzmäßigkeiten der Korrelationsfunktionen, die für Proteine genannt wurden, werden auch für RNA bestätigt. Es ist aber charakteristisch, dass die Autokorrelationsfunktionen für die RNA weit homogener und stabiler sind, so dass die Plateau-Werte für alle Reste außer U9 nicht niedriger als 0.8 liegen. Der zeitliche Verlauf der Autokorrelationsfunktion für einige typische Reste ist in Abb. 4.24 aufgezeichnet und zwar für die Reste G4 (Stem-Bereich) und U9 (Loop). Der Gleichgewichtswert für G4 liegt bei 0.92 jeweils für die Base und die Ribose; U9 weist einen schlechten Quasi-Gleichgewichtszustand mit einem Plateau-Wert von 0.25 für die Base, 0.8 für die Ribose auf.



A: G4 (Stem-Bereich), B: U9 (Loop). Schwarz: Base, grau: Ribose.

Ribose auf. Aus den Korrelationsfunktionen wurde mittels der Formeln (25-27) (Kapitel 2.1.9) der Ordnungsparameter und die charakteristische Korrelationszeit der lokalen Bewegungen für alle Reste berechnet. Die S^2 -Werte für Ribose- und Basenatome sind in Abb. 4.25 dargestellt.

Es existiert eine gute Korrelation in den S^2 -Werten für Ribose und Basen, nur der Rest U9 zeigt einen deutlichen Unterschied (bis 0.5) und weist einen extrem niedrigen Wert für die Base auf. Der S^2 -Wert für die 5'- und 3'-Termini (1-3 und 16-18) liegt um 0.1 niedriger als für andere Reste im Molekül. Höchstwahrscheinlich ist dieser sehr kleine S^2 -Wert für den U9 auf den Einfluss des MD-Programms zurückzuführen, da drei MD-Simulationen, durchgeführt jeweils mit verschiedenen Startbedingungen, Schrittweiten und Kraftfeldern, zu verschiedenen S^2 -Werten für U9 geführt haben (Abb. 4.25). Für die dargestellte und genauer analysierte MD-Simulation wurde das Kraftfeld von Duan et al. (2003) mit einer Schrittweite von 1 fs verwendet. So resultierte das Kraftfeld von Cornell et al. (1996) mit einer größeren Schrittweite von 2 fs in einer erhöhten Instabilität des Restes U9 (S^2 -Wert für Ribose und Basen um 0.1) (Abb. 4.25). Für die Reste G8 und U10 kommt eine s.g. „stacking“-Wechselwirkung vor, deren Term in „älteren“ Kraftfeldern fehlt. Die niedrige Stabilität für einige Reste im Loop ist auch mit höheren Schrittweiten verbunden. Anhand verschiedener Testrechnungen lässt sich zeigen, dass in unserem Fall die Stabilität von U9 zu 70%

Ergebnisse

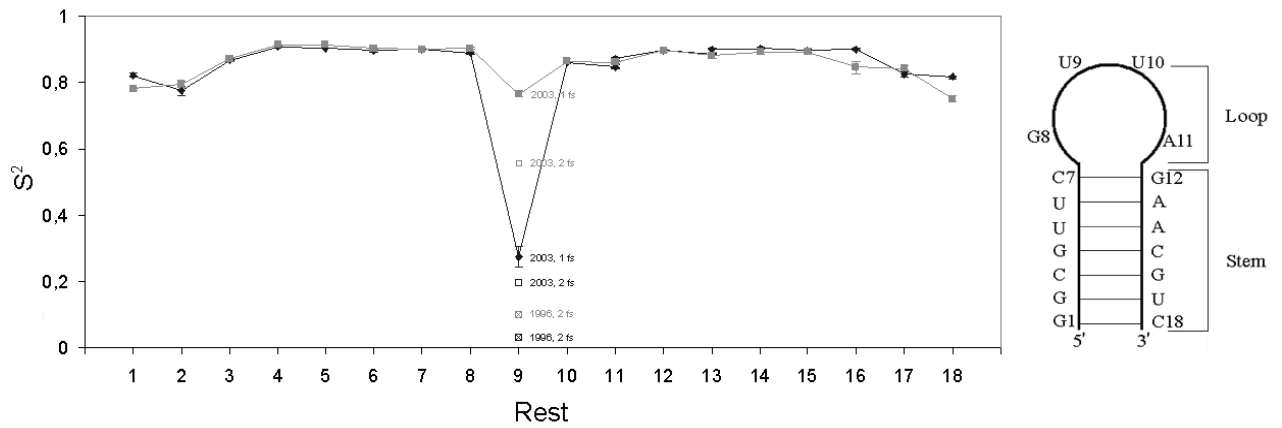


Abb. 4.25. Ordnungsparameter für den BEVSLD. Schwarz: Basen; Grau: Ribose.

Daneben ist die Struktur des BEVSLD schematisch dargestellt.

Es sind auch S^2 -Werte anderer MD-Simulationen für Rest U9 gekennzeichnet:

„1996, 2 fs“: Kraftfeld Cornell et al., 1996, Schrittweite=2 fs;

„2003, 2 fs“: Kraftfeld Duan et al., 2003; Schrittweite=2 fs;

„2003, 1 fs“: Kraftfeld Duan et al., 2003, Schrittweite=1 fs.

durch das Kraftfeld beeinflusst wurde und zu 30% durch die gewählte Schrittweite (vgl. Abb. 4.25).

Zusammenfassend kann man folgende Aussage über die Beweglichkeit des BEVSLD machen:

Mit Ausnahme der 3'- und 5'-terminalen Reste und U9 haben alle Nukleotide eine homogene geringe Beweglichkeit.

In Abb. 4.26 ist die lokale Korrelationszeit für einzelne Reste dargestellt. Für die Berech-

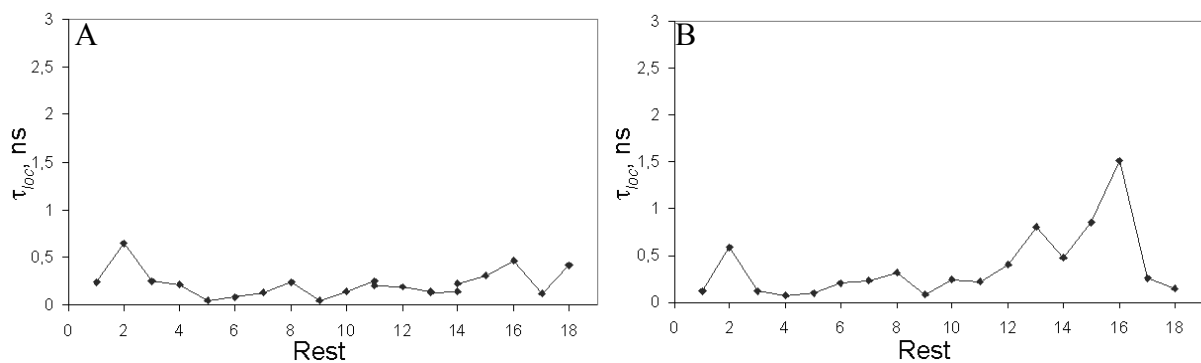


Abb. 4.26. Lokale Korrelationszeiten für den BEVSLD aus der MD-Simulation.

A: Basen, B: Ribose.

nung der lokalen Korrelationszeiten ist es nicht möglich, noch vorhandene Globalbewegungen vollständig zu eliminieren, deswegen kann der τ_{loc} -Plot auch höhere Werte für lokale Korrelationszeiten zeigen. Ribosereste zeigen ein etwas höheres τ_{loc} -Niveau in den Werten für den 3'-Strang. Gleiche Gesetzmäßigkeit zeigt auch der B-Faktor jeweils für Ribose und Basen. Besonders hohe Werte für Rest 16 und 17 können evtl. auf eine schwächere

Trennbarkeit zwischen Lokal- und Globalbewegungen für diese Reste hinweisen. Für die besonders hohen Werte für die Reste 13-16 fehlt eine Erklärung und die τ_{loc} -Werte für den BEVSLD in diesem Bereich sind daher nur wenig aussagekräftig und wahrscheinlich durch MD-Kraftfeld-Artefakte (nicht alle WW-Terme berücksichtigt) hervorgerufen worden.

Diederwinkelanalyse

Für das RNA-Molekül wurden alle Diederwinkel analysiert. Die meisten Reste zeigen keine Häufung von Übergängen, weil die Molekülkonformation stabil ist. Der in der Abb. 4.27 dargestellte 3'-terminale Rest C18 zeigt dagegen sehr viele kleine Übergänge, die 50° nicht überschreiten. Dies ist in Übereinstimmung mit der Annahme, dass terminale Reste beweglicher

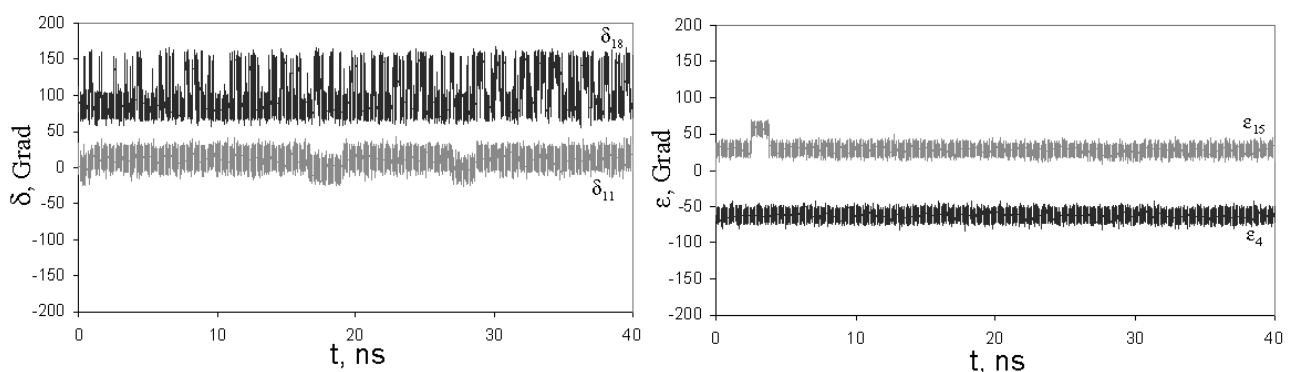


Abb. 4.27. Diederwinkeltrajektorien für den BEVSLD. Winkel δ_{11} ist um -90° und ϵ_{15} um $+90^\circ$ verschoben, um die Darstellung zu verbessern.

sind. Der Loop-Rest A11 hat zwei Bereiche mit etwas veränderten Winkeln, die aber im Bereich des normalen Zucker-Puckering liegen.

Die Analyse der Winkel in zwei gegenüberliegenden Resten G4 und C15 (Abb. 4.27) zeigt generell die perfekte Stabilität und Konstanz der Winkel. Der Übergang bei ~ 4 ns in ϵ_{15} ist höchstwahrscheinlich mit noch vorhandenen Relaxationsprozessen verbunden. Diese sollten spätestens nach 1 ns der MD-Simulation vollständig abgeschlossen sein, können aber in RNA-Systemen mit nichtkanonischen Strukturelementen („ungewöhnlicher“ D-Loop) etwas verzögert sein. Dies unterstreicht die Wichtigkeit, das Molekül möglichst gut zu equilibrieren und längere MD-Läufe durchzuführen.

Fourieranalyse

Eine Fourier-Analyse des Autokorrelationsfunktionsverlaufes zeigt keine signifikanten Frequenzbeiträge. Der RMSD- und Diederwinkelverlauf im Gegenteil zeigt neben sehr starken nicht-periodischen Beiträgen auch signifikante periodische Beiträge mit $t=6.4$ ns (was genau $2\tau_{rot}$ ist) und auch schwache periodische Bewegung mit $t=8.9$ ns.

IRED-Analyse

Um die Gültigkeit der Anwendung des Lipari & Szabo-Modells zu bestätigen, wurde eine IRED-Analyse für den BEVSLD durchgeführt. In Abb. 4.28 ist ein deutliches Gap zwischen Lokal- und Globalbewegungen zu erkennen. Der Abstand zwischen Lokal- und Globalmoden von $g=5.3$ erlaubt die Anwendung der modellfreien Näherung.

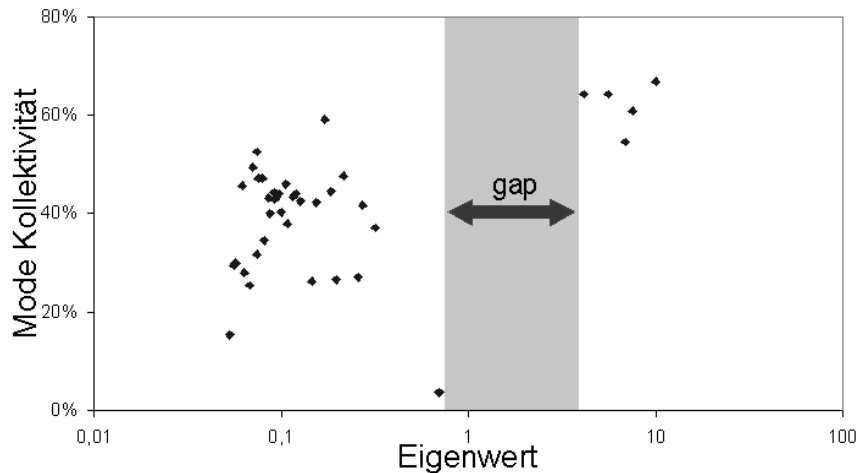


Abb. 4.28. IRED für den BEVSLD. Das Gap zwischen Global- und Lokalmoden ist gekennzeichnet.

Entsprechend der Beziehungen (39-40) wurden die δS^2 berechnet (Abb. 4.29). Es ist gut ersichtlich, dass Beiträge für Globalmoden relativ regelmäßig verteilt sind. Die Mode 7 (als Beispiel) charakterisiert lokale Bewegungsvorgänge, größere Beiträge für entsprechende ASn weisen auf eine Korrelation in Bewegungen hin. Auf solche Weise kann man einen Zusammenhang in den Bewegungen von Rest 2 und Rest 17, wie auch 5 und 14 beobachten (gegenüberliegende Reste).

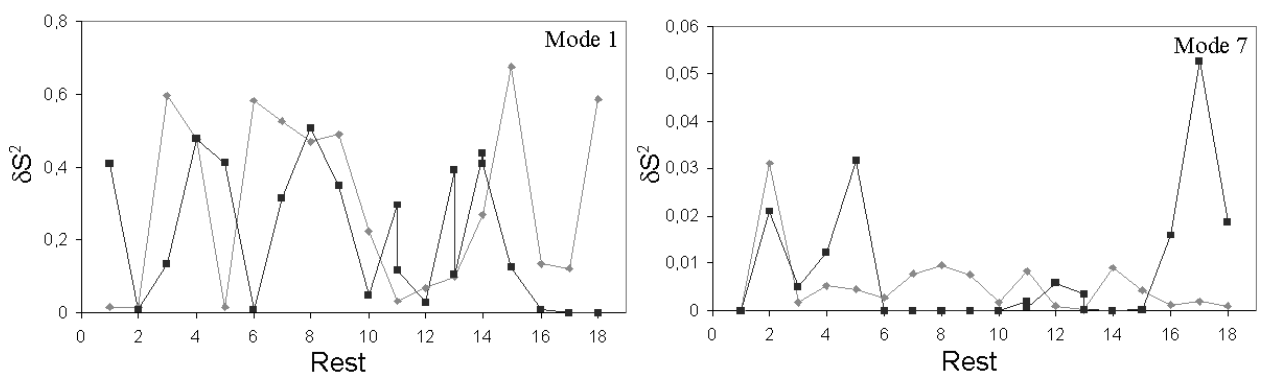


Abb. 4.29. δS^2 für globale und lokale Moden für den BEVSLD.

Links: Mode 1 (Globalbewegungen), rechts: Mode 7 (Lokalbewegungen).

Die δS^2 für alle Lokalmoden sind außer für Mode 6 niedrig und nicht höher als 0.1. Für Mode 6 liefert Rest 13 einen hohen Beitrag (Ribose).

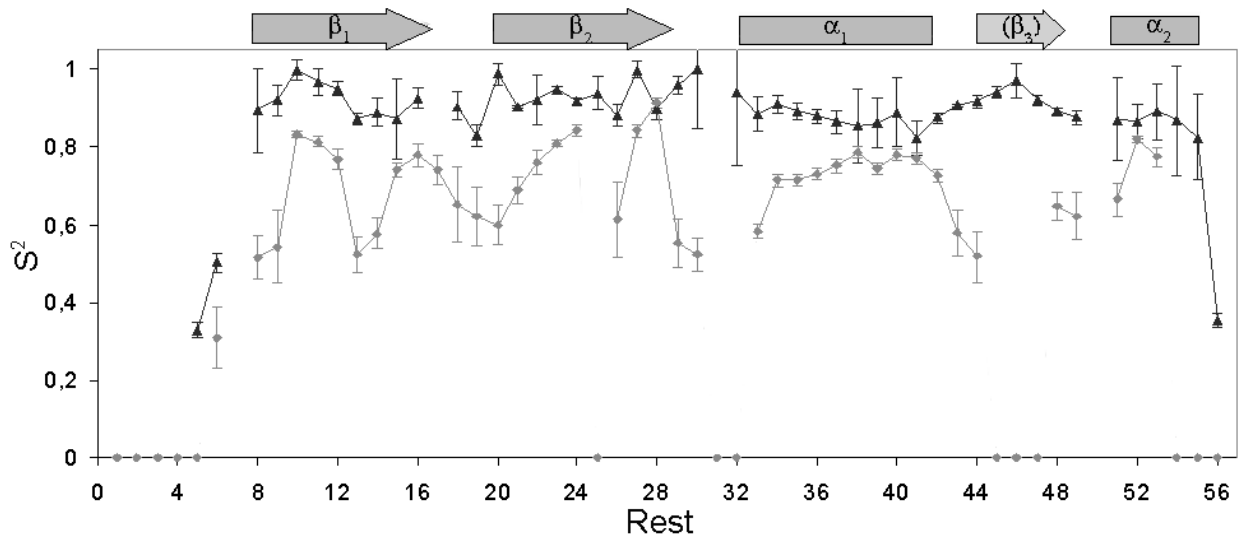
Wie für das Protein, wurde für alle Reste die Kreuzkorrelationsfunktionen berechnet, um mögliche Ähnlichkeiten in Bewegungscharakter von verschiedenen Resten aufzuklären. Die

Kreuzkorrelationsfunktionen für die benachbarten Reste haben hohe Werte, die nicht niedriger als 0.7 liegen, was die strukturelle Stabilität des Moleküls bestätigt und einen Zusammenhang der Bewegung der einzelnen Resten zeigt. Lediglich die Bewegung von Rest U9 ist mit der Bewegung der benachbarten Reste schlechter korreliert, die Kreuzkorrelationsfunktion liegt bei 0.5, was auf die höhere Beweglichkeit von U9 zurückzuführen ist.

5. DISKUSSION

5.1 Onkoprotein E7

Abb. 5.1. Ordnungsparameter für das Onkoprotein E7 aus NMR-Relaxation und MD-Simulation.



Die Sekundärstrukturelemente sind über dem S^2 -Plot dargestellt.

Schwarz: NMR-Daten; grau: Daten aus der MD-Simulation.

In Abb. 5.1 lässt sich der Ordnungsparameter für das Onkoprotein E7 aus NMR-Experimenten und aus der MD-Simulation vergleichen. Die Korrelation zwischen Ordnungsparametern, die mit den zwei unterschiedlichen Methoden bestimmt wurden, ist nicht besonders ausgeprägt. Der auffälligste Unterschied liegt in der großen Streuung des Ordnungsparameters aus der MD-Simulation im Vergleich zu NMR-Daten. Diese große Streuung kann durch folgendes erklärt werden: 1) MD-Simulation eines „theoretischen“ Monomers, wobei nicht alle WW berücksichtigt werden können (v.a. zwischen ASn, die zwei unterschiedlichen Monomeren angehören) und 2) Unvollkommenheit der MD-Simulations-Methoden (nicht präzise Kraftfelder, nicht alle WW-Terme werden berücksichtigt).

Trotz großer Abweichungen für einige Reste, kann man eine gute Koinzidenz im N- und C-Terminus beobachten (Ordnungsparameter mit niedrigen Werten). Weiterhin kann man eine gute qualitative Korrelation für viele Reste in der Kernregion des Moleküls beobachten (β -Faltblatt-Bereiche 9 – 12, 15 – 16, 22 – 24). Gut korreliert sind auch Bereiche der α_1 -Helix (32-42) und ein Teil der α_2 -Helix (51-53). Die Stabilität der α -Helices und β -Faltblätter wird durch Wasserstoffbrücken gewährleistet, wodurch diese Elemente sehr rigide sind.

Es konnten aber auch große Abweichungen zwischen NMR- und MD-Daten beobachtet werden. Wenn man aber im Betracht zieht, dass in der MD-Simulation ein Monomer modelliert wurde, lassen sich einige diese Abweichungen erklären. Höhere Beweglichkeit für ASn 13 – 15, 25

– 26, 45 – 48 im Monomer lässt sich auf eine Abwesenheit des im Dimer vorkommenden stabilisierenden β -Faltblatts (s. Abb. 1.2) zurückführen. Außerdem kann man große Abweichungen für ASn 29 – 32 beobachten. Diese Bereiche zeigen sich auch im NMR als Regionen mit großen Fehlern, AS 31 wurde anhand großer Beweglichkeit überhaupt nicht identifiziert (s. Kapitel 4.1). Kann man also behaupten, dass es auch für ASn 29 – 32 eine qualitative Korrelation zwischen NMR und MD gibt: Die AS in dieser Übergangsregion haben eine große Beweglichkeit.

Die vorhandenen NMR- und MD-Daten zusammen liefern das Bild der Proteindynamik, das in der Tabelle 5 dargestellt ist. Hierbei wird speziell eine verfeinerte Einteilung vorgenommen, um verschiedene dynamische Eigenschaften von ASn bezüglich nicht nur Ordnungsparameter, sondern auch τ_{loc} und Parametern aus der IRED-Analyse (v.a. Verteilung vom δS^2 -Wert) zu zeigen. Wie es schon früher erwähnt wurde, konnten ASn festgestellt werden, deren Beweglichkeit durch die Dimerbildung reduziert und stabilisiert wird. Die hohe Flexibilität der ASn 45-48 kann z.B. durch die damit verbundene gesteigerte Anpassungsfähigkeit der Monomereinheiten die Dimerbildung ermöglichen.

Tabelle 5: Resumee aus NMR- (S^2 , τ_{loc}) und MD-Daten (S^2 , τ_{loc} , IRED-Analyse) der mikrodynamischen Charakteristika des Onkoproteins E7.

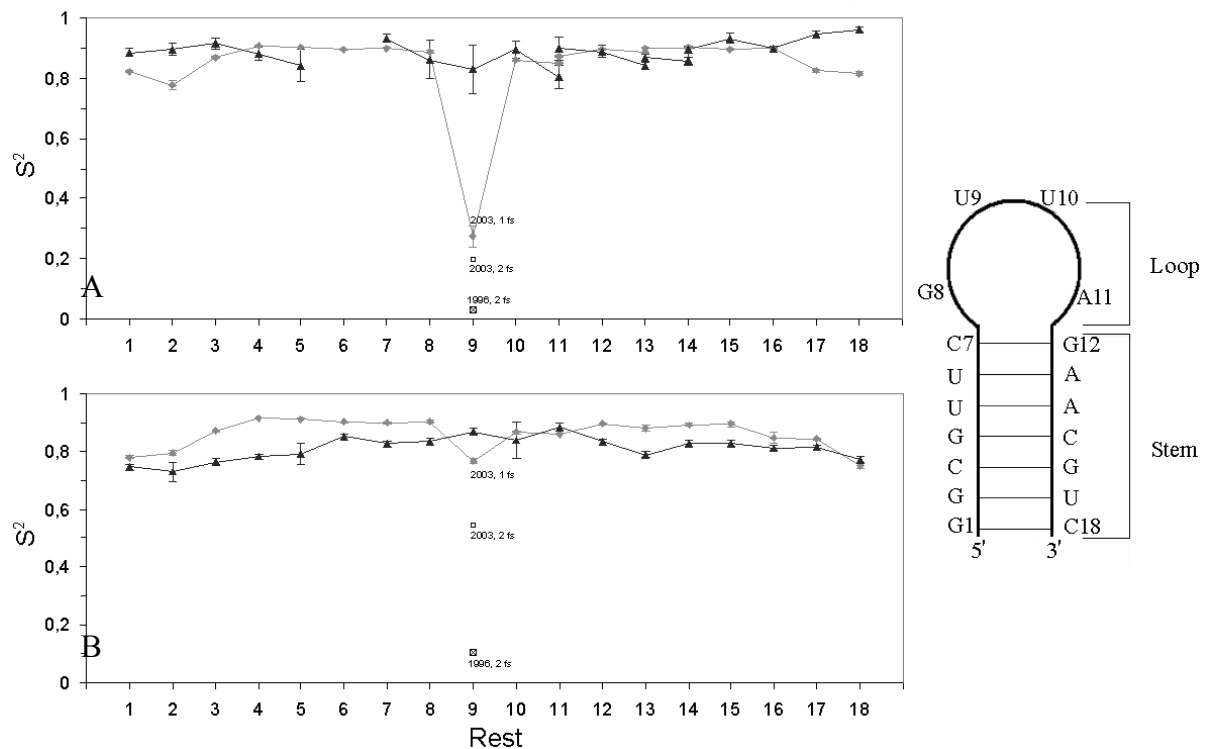
AS	$\langle S^2 \rangle$	Lokalbewegungen	Beweglichkeit	Strukturelement und Anmerkung
1-7	niedrig	starke	sehr hoch	N-Terminus, Global- und Lokalbewegungen nicht trennbar
8-12	hoch	-	niedrig	β_1 -Faltblatt
13-15	mittel	-	mittel	β_1 -Faltblatt, durch Dimerbildung stabilisiert (Abb. 1.2)
16	hoch	-	niedrig	β_1 -Faltblatt
17-20	mittel	-	mittel	Übergangszone (Loop)
21-24	hoch	-	niedrig	β_2 -Faltblatt
25-29	hoch	-	mittel/niedrig	β_2 -Faltblatt, stabil durch Dimerbildung (Abb. 1.2)
30-31	hoch	-	mittel	Übergangszone
32-43	hoch	-	niedrig	α_1 -Helix
44	mittel	-	mittel	Übergangszone
45-48	hoch	schwache, v.a. für Reste 47-48	mittel	β_3 -Faltblatt, nur im Dimer vorhanden, Passfähigkeit durch Flexibilität im Monomer
49	mittel	-	niedrig	Übergangszone
50-55	mittel	kleine/mittlere	niedrig/mittel	α_2 -Helix (für ASn 54-55 ist die Trennbarkeit von Global- und Lokalbewegungen durch End-Effekte gestört)
56	niedrig	starke	sehr hoch	C-Terminus, Global- und Lokalbewegungen nicht trennbar

N- und C-Termini des Moleküls haben also hohe Beweglichkeit mit einem hohen Anteil von Lokalbewegungen. Die Kernregion des Moleküls ist stabil und zeigt keine signifikanten Lokalbewegungen. Die nur im Dimer stabilen Elemente sind: einige Bereiche der β_1 - und β_2 -Faltblätter (13-15, 25-26), Übergangsregion 30-31 und β -Faltblatt 3 (45-48). Alle diese Befunde werden auch durch die NMR-Experimente, die das Dimer erfassen, bestätigt. Die Ergebnisse unserer Experimente sind in Übereinstimmung mit früheren Arbeiten, besonders mit [26], wo auch gezeigt wurde, dass die N- und C-Termini eines Proteins höhere Beweglichkeit und die Kernregion signifikant niedrige Beweglichkeit aufweisen, da kanonische Strukturelemente höhere Stabilität haben. Man muss betonen, dass in unseren Experimenten eine bessere Koinzidenz zwischen NMR- und MD-Daten für kanonische Sekundärstrukturelementen beobachtet wurde, was durch niedrigere Messfehler und durch eine neue Version des Programms DYNAMICS (Version 2004 vs. 2000) erklärt werden kann. Die Analyse der Dynamik von Proteinen mittels der Lipari & Szabo-Näherung wird schon seit Jahren verwendet und kann zusammen mit der präzisen MD-Simulation eine gute Beschreibung der Bewegungsvorgängen in Proteinen liefern.

Eine über diese Arbeit hinausgehende, detailliertere Untersuchung der Proteindynamik würde CSA-Messungen für jeden einzelnen Rest des Onkoproteins E7 entsprechend der Methoden von Fushman und Tjandra benötigen, mit denen die vorhandenen lokalen Bewegungsvorgänge genauer charakterisiert werden können.

5.2 BEVSLD

Abb. 5.2. Ordnungsparameter für den BEVSLD, NMR-Relaxation und MD-Simulation.



A: Basen, B: Ribosen. Schwarz: NMR; grau: MD.

Daneben ist die Struktur des BEVSLD schematisch dargestellt.

Es sind auch S^2 -Werte für andere MD-Simulationen für Rest U9 gekennzeichnet.

„1996, 2 fs“: Krafffeld Cornell et al., 1996, Schrittweite=2 fs;

„2003, 2 fs“: Krafffeld Duan et al., 2003; Schrittweite=2 fs;

„2003, 1 fs“: Krafffeld Duan et al., 2003, Schrittweite=1 fs.

In Abb. 5.2 sind die Ordnungsparameter für den BEVSLD dargestellt, hierbei sind Daten sowohl aus den NMR-Experimenten als auch aus der MD-Simulation gezeigt. Es ist leicht zu ersehen, dass zwischen beiden S^2 -Werten eine sehr gute Korrelation existiert. Einzige und auffallendste Ausnahme ist der große Unterschied im Rest U9, der anhand verschiedener Simulationen auf den Einfluss des MD-Kraftfelds zurückgeführt werden konnte (vgl. S^2 -Werte aus der verschiedenen MD-Läufen in der Abb. 5.2). Wie man aus der Abb. 5.2 sehen kann, zeigen die Basen-Daten für U9 einen viel höheren Unterschied als die Ribose-Daten. Für ein älteres Kraftfeld und eine höhere Schrittweite (2 fs) war der Ribose- S^2 -Wert für U9 viel niedriger und betrug ~ 0.1 . Der entsprechende Wert für Basen lag ebenfalls bei 0.1. Das bestätigt, dass der Rest U9 bei größeren Schrittweiten nicht erfolgreich modelliert wird (Abb. 5.2). Für die Reste G8 und U10 kommt eine s.g. „stacking“-Wechselwirkung vor [10], die mittels vorhandener Kraftfelder nicht vollständig berücksichtigt werden kann. Vielleicht hat das einen Einfluss auf die Modellierung des

Restes U9, der nach außen in die kleine Furche zeigt, damit Lösungsmittel-zugänglicher ist, keine stabilen Wechselwirkung aufweist und somit mehr Flexibilität zeigen kann (s. Abb. 1.2).

Die experimentellen Befunde und Ergebnisse aus der MD-Simulation für die Basen der 5'- und 3'-terminalen Resten 1 – 2 und 17 – 18 zeigen geringe Abweichungen, die damit verbunden sind, dass für Basen bei 600 MHz schon ein signifikanter Beitrag von CSA vorhanden ist, der sich besonders für die terminalen Reste, die eine etwas höhere Beweglichkeit aufweisen sollen, auswirkt. Dies bedeutet, dass die kleine Steigerung des S^2 -Wertes in den terminalen Bereichen für Basen nur den erhöhten CSA-Beitrag widerspiegelt und keine sinkende Beweglichkeit anzeigt. Durch diesen Effekt wurde die Datenanalyse für Basen bei 750 MHz besonders kompliziert. Selbst die Berechnung des Rotationsdiffusionstensors hat große Fehler geliefert, so dass vorhandene Relaxationsdaten nicht erfolgreich gefittet werden konnten. Analoge Probleme wurden bei vorhergehenden Arbeiten nachgewiesen, besonders bei [20]. Hier wurde auch gezeigt, dass bei höheren Feldstärken (bei 750 MHz) der CSA-Beitrag sehr groß wird und Daten nur mit großen Fehlern gefittet werden können. Wegen des großen anisotropen CSA-Beitrages ist eine genauere Analyse der Dynamikvorgänge für RNAs nur mit bekannten (vorher bestimmten) CSA-Werten für das entsprechende Molekül möglich. Diese CSA-Werte können entweder aus Festkörper-NMR- oder Kreuzkorrelationsmessungen in Lösung bestimmt werden.

Im Gegensatz hierzu stimmen die S^2 -Werte für die Ribose aus NMR und MD perfekt miteinander überein. Die größten Differenzen finden sich für die Reste 3 – 5, die aber 0.13 nicht übersteigen. Die Analyse der 750 MHz-Daten ergibt gleiche Ergebnisse jedoch mit etwas höheren Fehlern. Die bessere Übereinstimmung für die Ribose-Daten kann damit erklärt werden, dass die CSA für Riboseatome homogener und nicht so stark konformationsabhängig wie für Basenatome sind (35 – 50 vs. 110 – 160) [20,21]. NMR-Relaxation bei 500 MHz wird fast vollständig durch dipolare Relaxation bestimmt und kann daher mittels des Lipari & Szabo-Ansatzes unter Verwendung standardisierter CSA-Werte sehr erfolgreich analysiert werden. Experimente bei 500 MHz werden z.Z. noch durchgeführt und sollen in die weitere Analyse einfließen.

Wenn also NMR- und MD-Daten zusammen betrachtet werden, kann folgendes Bild der RNA-Dynamik erhalten werden: Das RNA-Molekül hat nicht sphärische Form, so dass der Rotationsdiffusionstensor, der die Globalbewegungen charakterisiert, mindestens als axialsymmetrisch approximiert werden muss. Das RNA-Molekül zeigt relativ homogene, aber eingeschränkte, geringe Beweglichkeit von einzelnen Resten sowohl im Stem als auch im D-Loop. Das widerspricht früheren Erwartungen, bei denen vermutet wurde, dass der D-Loop beweglicher als der Stem-Bereich sein sollte. Diese relativ homogene Beweglichkeit wurde sowohl durch NMR-Experimente, als auch durch die MD-Simulation bestätigt. Der Ordnungsparameter für das RNA-Molekül beträgt ~ 0.8 . 5'- und 3'-terminale Bereiche zeigen eine nur geringfügig höhere

Beweglichkeit bzw. niedrigere Stabilität. Erstaunlicherweise zeigt 3'-Strang in der MD-Simulation etwas größere Beweglichkeit als 5'-Strang. Diese Asymmetrie der Bewegung von zwei verschiedenen Strängen kann durch eine physikalische Instabilität verursacht werden, die auch zu einem Aufschmelzen der RNA vom 3'-Ende her bei höheren Temperaturen führen sollte. Etwas höhere Beweglichkeit von 3'-Strängen bei RNA wird auch von anderen Gruppen berichtet (AG Schwalbe, Universität Frankfurt/Main, Experimente an der Coxsackie SLD 30mer RNA). Die aber bei uns in der MD-Simulation beobachteten großen Unterschiede haben höchstwahrscheinlich keinen realen Hintergrund und sind zum großen Teil auf die Unvollkommenheit der verwendeten Kraftfelder zurückzuführen.

Die lokalen Bewegungen finden in der Zeitskala ≤ 0.2 ns statt. Die perfekte Trennbarkeit der Global- und Lokalbewegungen wird auch durch IRED-Analyse bestätigt. Obwohl bei einzelnen Resten (U9, A11, G12) konformationelle Übergänge auftreten, ist das Molekül perfekt stabil, da Übergänge einzelner Diederwinkel durch Änderungen von Nachbarwinkeln kompensiert werden.

5.3 Onkoprotein E7 vs. BEVSLD

Modelle, Globalbewegungen und Wechselwirkungen

In dieser Arbeit werden mittels NMR-Spektroskopie und MD-Simulation mikrodynamische Parameter des Onkoproteins E7 und BEVSLD bestimmt. Diese zwei Moleküle sind Biopolymere, gehören aber zu zwei unterschiedlichen Klassen: Proteine und RNA. Trotzdem erlaubt die Lipari & Szabo-Näherung die Mikrodynamik jeweils des Proteins und der RNA erfolgreich zu analysieren. MD-Simulation und NMR-Experimente sind somit ein erfolgreiches Instrument zur Dynamikanalyse.

Der Rotationsdiffusionstensor für das Onkoprotein E7 hat eine kleine Anisotropie von 1.17, so dass das Molekül weitgehend als kugelförmig rotierendes Objekt approximiert werden kann. Eine bessere Näherung ist aber das axialsymmetrische Modell, die in dieser Arbeit verwendet wurde. Für Proteine spielt die dipolare Wechselwirkung eine bedeutende Rolle, wobei der CSA nur eine geringe Rolle spielt und für alle Proteine durch einen identischen CSA-Tensor ($\sigma_{\parallel} - \sigma_{\perp} \sim -160$ ppm, $\theta \sim 15-20^\circ$) angenähert werden kann. Die Tatsache, dass das Onkoprotein in der Natur als Dimer vorkommt, stellte für die Auswertung mittels Lipari & Szabo-Ansatzes keine Schwierigkeit dar.

Im Gegenteil dazu zeigt der Rotationsdiffusionstensor für den BEVSLD eine höhere Anisotropie von 1.6 bis zu 1.8, so dass das Molekül mindestens als axialsymmetrisch approximiert werden muss. Für RNA spielen dipolare Wechselwirkung und CSA eine gleich große Rolle und zudem ist der CSA-Beitrag stark konformationsabhängig. Im Idealfall braucht man daher eigentlich einen für jeden Rest vorher bestimmten CSA-Wert. Die hohe Anisotropie des Rotationsdiffusionstensors und der hohe CSA-Beitrag haben die Dynamikanalyse wesentlich erschwert. So konnten Daten für die Basen 750 MHz mit den vorhandenen CSA-Werten nicht gefittet werden.

Wegen Mangels an Rechnerleistung und Zeit wurde ein „theoretisches“ Monomer des E7 mittels MD modelliert. Schon in dieser Approximation konnten wichtige Information über die Beweglichkeit geliefert und Ergebnisse der NMR-Experimente bestätigt werden. Die MD-Simulation des BEVSLD wurde mit verschiedenen Kraftfeldern erfolgreich durchgeführt, so dass mit Ausnahme des ausgeloopten Restes U9 eine perfekte Korrelation zwischen NMR und MD beobachtet werden kann.

Mikrodynamische Eigenschaften

Es wurde festgestellt, dass das Onkoprotein E7 und der BEVSLD etwas unterschiedliche mikrodynamische Eigenschaften besitzen. Das Onkoprotein weist eine inhomogene Stabilität auf:

starke unbeschränkte Beweglichkeit im N- und C-Termini, schwache und beschränkte Beweglichkeit in der Kernregion des Moleküls. In den Termini ist die Trennbarkeit zwischen Global- und Lokalbewegungen gestört, Lokalbewegungen kommen in der Zeitskala bis zu 1 ns vor. Die Stabilität und Beweglichkeit variiert „entlang der Sequenz“, so dass Sekundärstrukturelemente problemlos anhand des Ordnungsparameter und Korrelationszeit der Lokalbewegungen nachgewiesen werden können.

Im Gegenteil dazu weist BEVSLD homogene Stabilität und Beweglichkeit auf. Nur die 5'- und 3'-Enden haben etwas höhere Beweglichkeit. Global- und Lokalbewegungen sind perfekt getrennt. Besonders interessant bei BEVSLD ist aber die signifikant homogene Beweglichkeit aus, die den neuen D-Loop einschliesst.

Man kann vermuten, dass die untersuchten Bewegungsvorgänge für die Annahme der biologisch aktiven Konformation und die Erfüllung der spezifischen Funktionen wichtig sind. Aber nur eine vergleichende Analyse dieser vorgelegten Daten mit analogen Auswertungen an Komplexen mit den Komplexpartnern (Liganden) kann das volle Bild des Dynamikbeitrages zur Funktionserfüllung eines Biomoleküls liefern.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Gegenstand dieser Arbeit waren Untersuchungen der Dynamik eines Onkoproteins und einer viralen RNA. Hierzu wurden die Methoden der NMR-Spektroskopie und MD-Simulationen eingesetzt.

Für das Onkoprotein E7 wurden mittels NMR die wichtigsten mikrodynamischen Parameter festgestellt. Der Rotationsdiffusionstensor hat eine niedrige Anisotropie, was davon zeugt, dass das Molekül in guter Näherung als kugelförmig angenommen werden kann. Es wurde eine gute Korrelation zwischen Sekundärstruktur und mikrodynamischen Parametern nachgewiesen: N- und C-Termini des Moleküls unterscheiden sich durch hohe Beweglichkeit und die vorhandenen starken lokalen Bewegungen. Die Kernregion des Moleküls hat eine niedrige Beweglichkeit und hohe Stabilität. Aus der Ordnungsparameteranalyse kann man die entsprechenden Strukturelemente sicher nachweisen. Die MD-Simulation hat die Ergebnisse der NMR-Experimente bestätigt. Man kann eine annehmbar gute Korrelation im Ordnungsparameter beobachten obwohl nur ein Monomer mittels MD-Simulation untersucht werden konnte. Unter Heranziehung der IRED-Analyse wurde festgestellt, dass einige Reste aus den β -Faltblattsträngen 1, 2 und dem β -Faltblatt 3 nur im Dimer stabil sein können. Die Dynamikanalyse von Proteinen mittels NMR-Relaxation und MD-Simulation kann also wichtige Kenntnisse über die vielfältigen Bewegungsvorgänge in Proteinmolekülen in Zeitskalen von 10 Pikosekunden bis zu mehreren von Nanosekunden liefern.

Für den BEVSLD wurde das gesamte Mikrodynamik-Bild aufgeklärt. Für die Dynamikanalyse mittels des Lipari & Szabo-Modells an RNAs existieren nur wenig vergleichbare Arbeiten. Die Dynamikanalyse einer RNA mittels des Programms DYNAMICS wurde zum ersten Mal erfolgreich durchgeführt. Der Rotationsdiffusionstensor hat eine hohe Anisotropie, so dass das Molekül als axialsymmetrisch approximiert werden muss. Es wurde eine gute Korrelation zwischen Struktur und mikrodynamischen Parametern nachgewiesen: das Molekül weist homogene Beweglichkeit für Reste sowohl im Stem als auch im D-Loop auf. Nur 5'- und 3'-terminale Bereiche des Stems haben eine etwas höhere Beweglichkeit. Der D-Loop zeigt niedrige Beweglichkeit und hohe Stabilität und ist somit bewegungsähnlich zum Stem-Bereich. Die MD-Simulation hat die Ergebnisse der NMR-Experimente bestätigt. Es existiert eine perfekte Korrelation im Ordnungsparameter, die nur für den Rest U9 gestört ist, was aber durch MD-Unvollkommenheiten erklärt wird. Es wurde nachgewiesen, dass die Relaxation bei höheren Feldstärken auch teilweise durch den CSA-Betrag bestimmt wurde. Für 750 MHz ist dieser Beitrag besonders hoch und inhomogen, so dass die Basen-Daten mit einem angenommenen homogenen

CSA-Beitrag nicht erfolgreich gefittet werden können. Z.Z. werden NMR-Experimente auf einen 500 MHz-Spektrometer durchgeführt. Die Ergebnisse und auch CSA-Messungen für jeden Rest bei verschiedenen Frequenzen können Bestandteil eines anderen Projektes sein und können im Prinzip helfen, das mikrodynamische Verhalten von RNA-Molekülen besser zu charakterisieren.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten durch Kombination von NMR-Relaxationsmessungen und MD-Simulationsverfahren mikrodynamische Charakteristika eines Onkoproteins und einer viralen RNA erfolgreich untersucht werden. Trotz einiger Unterschiede im dynamischen Verhalten von Proteinen und RNA können sie beide mittels identischer NMR- und MD-Verfahren charakterisiert werden, was große Möglichkeiten der gleichzeitigen Anwendung der experimentalen Messungen und der theoretischen Rechnungen zeigt.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Yasumoto S., Burkhardt A.L., Doniger J., Dipaolo J. Human papillomavirus type-16 DNA-induced malignant transformation of Nih 3t3 cells. *J. Virol.* (1986) 57: 572-57;
2. Munger K., Baldwin A., Edwards K.M., Hayakawa H., Nguyen C.L., Owens M., Grace M., Huh K. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J. Virol.* (2004) 78: 11451-60;
3. Mantovani F., Banks L. The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene* (2001) 20: 7874-87;
4. Mcintyre M.C., Frattini M.G., Grossman S.R., Laimins L.A. Human papillomavirus type-18 E7 protein requires intact Cys-X-X-Cys motifs for zinc-binding, dimerization, and transformation but not for RB binding. *J. Virol.* (1993) 67: 3142-50;
5. Barbosa M.S., Schlegel R. The E6 and E7 genes of HPV-18 are sufficient for inducing two-stage in vitro transformation of human keratinocytes. *Oncogene* (1989) 4: 1529-32;
6. Ohlenschläger O. et al. Partially folded dimeric structure of the high-risk HPV type 45 oncoprotein E7 in solution. Manuscript in preparation;
7. Koradi R., Billeter M., Wüthrich K. MOLMOL: A program for display and analysis of macromolecular structures. *J. Mol. Graphics* (1996) 14: 51-70;
8. Zell R., Sidigi K., Henke A., Schmidt-Brauns J., Hoey E., Martin S., Stelzner A. Functional features of the bovine enterovirus 5'-non-translated region. *J. Gen. Virol.* (1999) 80: 2299-2309;
9. Allain F.H., Varani G. Structure of the P1 helix from group I self-splicing introns. *J. Mol. Biol.* (1995) 250: 333-53;
10. Ihle Y., Ohlenschläger O., Häfner S., Duchardt E., Zacharias M., Seitz S., Zell R., Ramachandran R., Görlach M. A novel cGUUAg tetraloop structure with a conserved yYNMGg-type backbone conformation from cloverleaf 1 of bovine enterovirus 1 RNA. *Nucleic Acids Res.* (2005) 33: 2003-11;
11. Heus H.A., Pardi A. Structural features that give rise to the unusual stability of RNA hairpins containing GNRA loops. *Science* (1991) 253: 191-4;
12. Correll C.C., Swinger K. Common and distinctive features of GNRA tetraloops based on a GUAA tetraloop structure at 1.4 Å resolution. *RNA* (2003) 3: 355-63;
13. Kessler H. Skriptum zur Vorlesung NMR-Spektroskopie. TU München, WS 2004/2005;
14. Ohlenschläger O. Dissertation. Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt/Main, 1993;
15. Hausser K.H., Kalbitzer H.R. NMR für Mediziner und Biologen: Strukturbestimmung, Bildgebung, in-vivo-Spektroskopie, Springer Verlag Berlin, 1989;

16. Evans J.N.S. *Biomolecular NMR Spectroscopy*. Oxford University Press, 1995;
17. Keeler J. *Understanding NMR Spectroscopy*. University of Cambridge, 2002;
18. Fushman D., Tjandra N., Cowburn D. Direct Measurement of ^{15}N chemical shift anisotropy in solution. *J. Am. Chem. Soc.* (1998) 120: 10947-52;
19. Fushman D., Cowburn D. Model-independent analysis of ^{15}N chemical shift anisotropy from NMR relaxation data. *J. Am. Chem. Soc.* (1998) 120: 7109-10;
20. Shajani Z., Varani G. ^{13}C NMR Relaxation studies of RNA base and ribose nuclei reveal a complex pattern of motions in the RNA binding site for Human U1A protein. *J. Mol. Biol.* (2005) 120: 1-17;
21. Hall K.B., Tang C. ^{13}C relaxation and dynamics of the purine bases in the iron responsive element RNA hairpin. *Biochemistry* (1998) 37: 9323-32;
22. Lipari G., Szabo A. Model-Free Approach to the interpretation of nuclear magnetic resonance relaxation in macromolecules. *J. Am. Chem. Soc.* (1982) 104: 4546-59;
23. Lipari G., Szabo A. Model-Free Approach to the interpretation of nuclear magnetic resonance relaxation in macromolecules. *J. Am. Chem. Soc.* (1982) 104: 4559-70;
24. Fushman D., Cahill S., Cowburn D. The main-chain dynamics of the dynamin pleckstrin homology (PH) domain in solution: Analysis of ^{15}N relaxation with monomer/dimer equilibration. *J. Mol. Biol.* (1997) 266: 173-94;
25. Fushman D., Ohlenschläger O., Rüterjans H. Determination of the backbone mobility of ribonuclease T1 and its 2'GMP complex using Molecular Dynamics simulation and NMR relaxation data. *J. Biomol. Struct. & Dyn.* (1994) 11: 1377-402;
26. Fushman D. Determination of protein dynamics using ^{15}N relaxation measurements. *BioNMR techniques in drug research*, 1998;
27. Tjandra N., Szabo A., Bax A. Protein backbone dynamics and ^{15}N chemical shift anisotropy from quantitative measurement of relaxation interference effects. *J. Am. Chem. Soc.* (1996) 118: 6986-91;
28. Clore G.M., Szabo A., Bax A., Kay L.E., Driscoll P.C., Gronenborn A.M. Deviations from the simple two-parameter model-free approach to the interpretation of ^{15}N nuclear magnetic resonance of proteins. *J. Am. Chem. Soc.* (1990) 112: 4989-91;
29. Walker O., Varadan R., Fushman D. Efficient and accurate determination of the overall rotational diffusion tensor of a molecule from ^{15}N relaxation data using the computer program RotDif. *J. Magn. Reson.* (2004) 168: 336-45;
30. García de la Torre J., Huertas M.L., Carrasco B. HYDRONMR: Prediction of NMR relaxation of globular proteins from atomic-level structures and hydrodynamic calculations. *J. Magn. Reson.* (2000) 160: 138-46;

31. Hall J.B., Fushman D. Characterization of the overall and local dynamics of a protein with intermediate rotational anisotropy: Differentiating between conformational exchange and anisotropic diffusion in the B3 domain of protein G. *J. Biomol. NMR* (2003) 27: 261-75;
32. Fushman D. DYNAMICS 2.0. A Very Brief User's Manual. University of Maryland, 2004;
33. Skelton N., Palmer A., Akke M., Kördel J., Rance M., Charin W. Practical aspects of two dimensional proton-detected ¹⁵N spin relaxation measurements. *J. Magn. Reson.* (1993) 102: 253-64;
34. Mandel A.M., Akke M., Palmer A.G. Backbone dynamics of Escherichia coli ribonuclease HI: correlations with structure and function in an active enzyme. *J. Mol. Biol.* (1995) 246: 144-63;
35. Palmer A.G. Modelfree Manual, 1998;
36. Peter C., Daura X., van Gunsteren W.F. Calculation of NMR-relaxation parameters for flexible molecules from molecular dynamics simulations. *J. Biomol. NMR* (2001) 20: 297-310;
37. Meiler J., Prompers J.J., Peti W., Griesinger C., Brüschweiler R. Model-free approach to the dynamics interpretation of residual dipolar couplings in globular proteins. *J. Am. Chem. Soc.* (2001) 123: 6098-107;
38. Lanig, H. Molecular Modelling für Biochemiker, Vorlesungsskript. Universität Erlangen-Nürnberg, 2004;
39. Pearlman D.A., Case D.A, Caldwell J.W., Ross W.S., Cheatham III T.E., DeBolt S., Ferguson D., Seibel G., Kollman P. AMBER, a package of computer programs for applying molecular mechanics, normal mode analysis, molecular dynamics and free energy calculations to simulate the structural and energetic properties of molecules. *Comp. Phys. Commun.* (1995) 91: 1-41;
40. Kerrigan J.E. AMBER 8.0 Tutorial. The University of Medicine and Dentistry of New Jersey, 2004;
41. Lee M. Loop dynamics of the HIV-1 integrase core domain. University of Delaware, 2004;
42. Kerrigan J.E.. AMBER 8.0 Drug/DNA Complex Tutorial. The University of Medicine and Dentistry of New Jersey, 2004;
43. Prompers J.J., Brüschweiler R. General framework for studying the dynamics of folded and nonfolded proteins by NMR Relaxation Spectroscopy and MD simulation. *J. Am. Chem. Soc.* (2002) 124: 4522-34;
44. Showalter, S.A., Hall, K.B. Isotropic Reorientational Eigenmode Dynamics complements NMR relaxation measurements for RNA. *Methods in Enzymology* (2005) 394: 465-80;
45. Ihle Y. Diplomarbeit. Friedrich-Schiller-Universität Jena, 2004;
46. Farrow N.A., Muhandiram R., Singer A.U., Pascal S.M., Kay C.M., Gish G. Backbone dynamics of a free and a phosphopeptide complexed Src homology 2 domain studied by ¹⁵N NMR relaxation. *Biochemistry* (1994) 33: 5984-6003;

47. Damberg P., Jarvet J., Allard P., Gräslund A. Quantitative estimation of magnitude and orientation of the CSA tensor from field dependence of longitudinal NMR relaxation rates. *J. Biomol. NMR* (1999) 15: 27-37;
48. Massi F., Johnson E., Wang C., Rance M., Palmer A.G. NMR $R_{1\rho}$ rotating-frame relaxation with weak radio frequency fields. *J. Am. Chem. Soc.* (2004) 126: 2247-2256;
49. Beeser S.A., Goldenberg D.P., Oas T.G. Enhanced protein flexibility caused by a destabilizing amino acid replacement in BPTI. *J. Mol. Biol.* (1997) 269(1): 154-64;
50. Bartels C., Xia T.H., Billeter M., Güntert P., Wüthrich K. The program XEASY for computer-supported NMR spectral analysis of biological macromolecules. *J. Biomol. NMR* (1995) 5: 1-10;
51. Keller R. *The Computer Aided Resonance Assignment Tutorial*, CANTINA Verlag, 2004;
52. Carrasca B., García de la Torre J. Hydrodynamic properties of rigid particles: comparison of different modelling and computational procedures. *Biophys. J.* (1999) 75: 3044-57;
53. *Matlab 6.5 Manual*. Mathworks Inc. USA, 2002;
54. Case D.A., Darden T.A., Cheatham III T.E., Simmerling C.L., Wang J., Duke R.E., Luo R., Merz K.M., Wang B., Pearlman D.A., Crowley M., Brozell S., Tsui V., Gohlke H., Mongan J., Hornak V., Cui G., Beroza P., Schafmeister C., Caldwell J.W., Ross W.S., Kollman P.A. *AMBER 8*, University of California, San Francisco, 2004;
55. Humphrey W., Dalke A., Schulten K., VMD - Visual Molecular Dynamics. *J. Mol. Graphics* (1996) 14: 33-38;
56. *Amber 8.0 User's Manual*. University of California, San Francisco, 2004;
57. Ryde, U. Molecular dynamics simulations of alcohol dehydrogenase with a four- or five-coordinate catalytic zinc ion. *Proteins: structure, function and genetics* (1995) 21: 40-56;
58. Stote R.H., Karplus M. Zinc binding in proteins and solution: a simple but accurate nonbonded representation. *Proteins: structure, function and genetics* (1995) 23: 12-31.

Erklärung

Ich erkläre hiermit ausdrücklich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig, ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Jena, den 13. Dezember 2005

Aliaksandr Marchanka