

Berichte aus dem Institut

Proteindynamik von Ligand/Rezeptor-Bindungen

Helmut Grubmüller und Berthold Heymann

Arbeitsgruppe Theoretische Molekulare Biophysik (071)

1. Einleitung

Praktisch alle Stoffwechselfvorgänge im Körper werden durch hochspezialisierte Proteine bewerkstelligt oder gesteuert – man kann sie mit gutem Recht als die biochemischen 'Nano-Maschinen' der Zelle bezeichnen. Dies nicht nur wegen ihrer komplexen und gleichzeitig hochgeordneten räumlichen Struktur – eindrucksvoll belegt durch inzwischen über 8700 gelöste Proteinstrukturen –, sondern insbesondere wegen der oft mit großer Präzision koordinierten atomaren Bewegungen, welche diese Vorgänge antreiben.

Schon bald nach der erstmaligen Aufklärung der räumlichen Struktur eines Proteins – des Sauerstofftransporters Myoglobin – durch Perutz und Kendrew [1] erkannte man, daß korrelierte atomare Bewegungen oft unverzichtbar für die Proteinfunktion sind: Wäre das Myoglobin-Molekül nämlich so starr wie die Abbildungen seiner Struktur in Lehrbüchern suggerieren, so könnte kein Sauerstoffmolekül die im Inneren des Proteins gelegene Bindungsstelle erreichen. Wie auch Molekulardynamikrechnungen zeigten [2], schafft erst die thermische Bewegung der Proteintome genügend Flexibilität.

Jüngste Fortschritte insbesondere im Bereich von Einzelmolekülexperimenten, Spektroskopie und zeitaufgelöster Strukturauflösung erlaubten es, einigen 'Nano-Maschinen' bei der Arbeit zuzusehen. Sie

offenbaren erstaunliche Mechanismen, etwa fein abgestimmte 'induced-fit'-Bewegungen bei spezifischer Ligandenbindung, die mechanische Energieübertragung in der F1-ATPase über eine elastische 'Kurbelwelle' oder das 'Krabbeln' von Myosin oder Kinesinen.

Gegenwärtig sind wir außerstande, solche Präzisionsfeinmechaniken de novo zu konstruieren – aber vielleicht können wir deren Mechanismen verstehen oder sogar Eigenschaften ihrer Funktion berechnen und vorhersagen. Diesem Ziel dient in unserer Arbeitsgruppe die Methode der Molekulardynamik-(MD-)Simulation. Im vorliegenden Text wollen wir, nach einer kurzen Skizze dieser Methode, beispielhaft unsere Untersuchung des Bindungsmechanismus eines Antikörpers beschreiben.

2. Molekulardynamiksimulation - Prinzip und Tricks

Wie in Abb. 2 veranschaulicht, wirken in einem Makromolekül interatomare Kräfte unterschiedlichen Typs. Chemische Bindungskräfte, hier dargestellt durch Federn, zwingen etwa gebundene Atome in ihren Gleichgewichtsabstand (grüne Pfeile) oder Gleichgewichtswinkel (magentafarbene Pfeile). Die Pauli-Abstoßung (graue Pfeile) verhindert, daß sich Atome durchdringen.

Langreichweitige Kräfte schließlich, insbesondere Coulomb-Kräfte (rot, blau) zwischen den (meist) partiell geladenen Atomen (d+, d-) tragen wesentlich zur Stabilität einer Proteinstruktur bei. All diese Kräfte (und noch einige weitere, die hier nicht beschrieben werden) bestimmen die Bewegung jedes einzelnen Atoms und werden in einer MD-Simulation entsprechend berücksichtigt. Da sich die Kräfte mit der Atombewegung rasch ändern, müssen alle Kräfte in kurzen Zeitschritten (typischerweise 10^{-15} sec.) wiederholt berechnet werden. Nach 10^6 Integrationsschritten erhält man so eine Beschreibung der Bewegung eines jeden Atoms innerhalb der kurzen Zeitspanne einer Nanosekunde. Dies ist gegenwärtig die Länge einer typischen MD-Simulation, begrenzt durch die jeweils verfügbare Computerleistung.

Der größte Teil des Rechenaufwands entfällt dabei auf die Berechnung der langreichweitigen Coulombkräfte. So erfährt etwa das grün markierte Atom in Abb. 3(a) Kräfte von allen anderen Atomen (rote Linien). Aus Effizienzgründen wird daher in den meisten Fällen nur die unmittelbare Umgebung des Atoms berücksichtigt [Abb. 3(b)].

Fortsetzung auf S. 2

Inhalt

Theoretische Molekulare Biophysik	1-4
Neueinstellungen	5
Abgänge	6
Gäste	6
Sicherheitsdatenblätter	6
Impressum	6
Promotionen	7
GWDC informiert	7
Publikationen	7-8
Suzanne Jovin	8

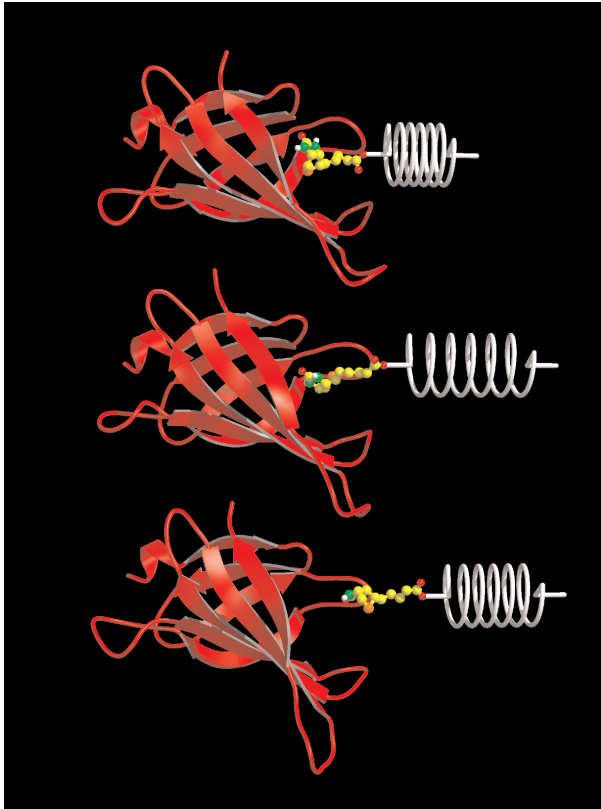


Abbildung 1: Untersuchung nichtkovalenter Ligand/Rezeptor-Bindungen durch Molekulardynamiksimulationen der erzwungenen Bindungstrennung. Zu Beginn der Simulation (oberes Bild) befindet sich ein Biotinmolekül (gelb) in der Bindungstasche eines Streptavidinmoleküls (rot). Ein Atom des Biotins wird an ein harmonisches Potential gekoppelt (im Bild symbolisch durch eine Feder dargestellt), das gleichförmig vom Streptavidin wegbewegt wird; der Schwerpunkt des Streptavidins wird dabei fixiert. Übersteigt die auf das Biotin so ausgeübte Zugkraft die Bindungskraft, die das Molekül zunächst in der Bindungstasche zurückhält (Bild mitte), löst sich das Biotin vom Streptavidin. Die Abreißkraft kann aus der Ausdehnung der 'Feder' abgelesen werden. Ist der Komplex getrennt (unteres Bild), kann das Biotin dem Zug folgen, und die Zugkraft nimmt wieder ab. Entsprechend ist die Abreißkraft das Maximum der während des Trennungsprozesses aufgewendeten Zugkraft.

Es zeigte sich jedoch, daß dadurch gerade die uns interessierende – weil funktionsrelevante – Dynamik konformativer Umlagerungen in Proteinen häufig drastisch verfälscht wird [3,4], weshalb wir einen anderen Weg eingeschlagen haben [5]. In unseren Simulationen werden die Proteinatome hierarchisch gruppiert [Abb. 3(c)] und die zugehörigen Partialladungen zu Multipolen [farbige Flächen in Abb. 3(d)] zusammengefaßt. Die Wechselwirkung dieser Multipole mit dem herausgegriffenen (grünen) Atom (farbige Linien) kann nun sehr viel effizienter berechnet werden [5]. Diese und weitere effizienzsteigernde Methoden [6,7] haben wir für Parallelrechner implementiert [8], so daß wir nun die Leistungsfähigkeit solcher Rechner für ausgedehnte Simulationen nutzen können.

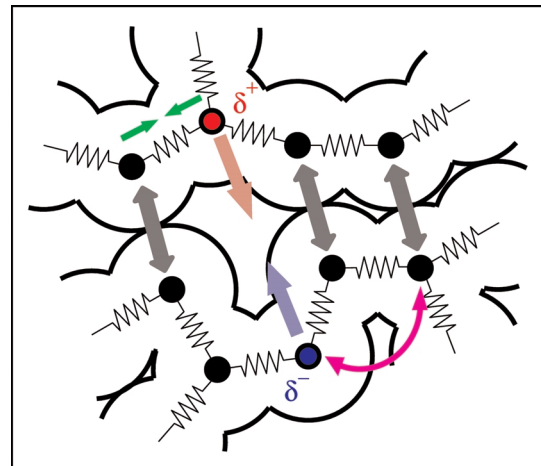


Abbildung 2: Interatomare Kräfte (Pfeile, 'Federn') in einem Makromolekül; Beschreibung siehe Text.

3. Beispiel Antikörper/Antigen-Bindung

Damit waren wir in der Lage, die nichtkovalente Bindung eines Antikörper/Antigen-Komplexes zu studieren; einige Ergebnisse sollen hier beispielhaft geschildert werden.

Der Komplex (Abb. 4, oben) besteht aus dem monoklonalen Antikörper AN02 (rot/blau), dessen hypervariable Regionen

Fortsetzung auf Seite 3

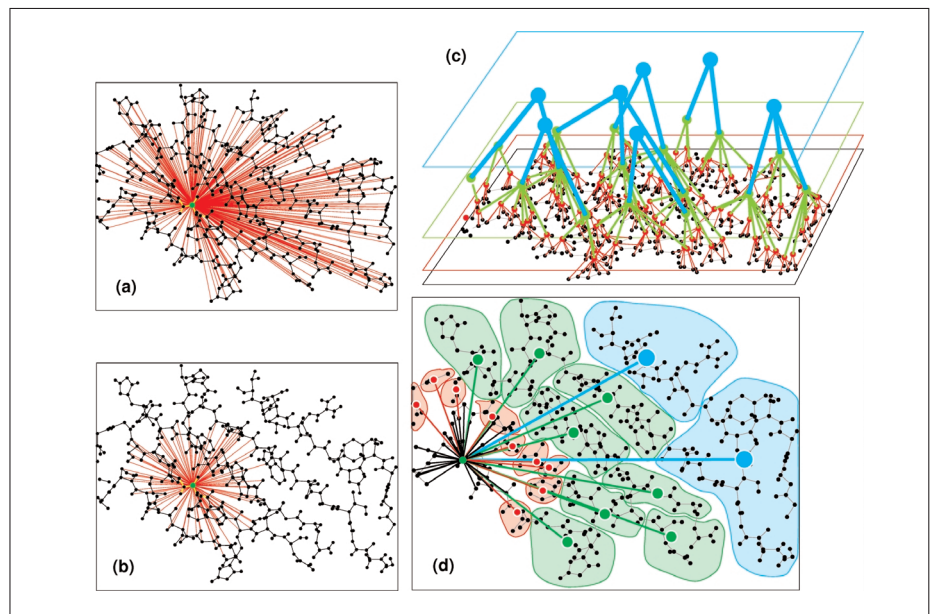


Abbildung 3: (a) Coulombkräfte (rot) wirken auf jedes geladene Atom eines Proteins (z.B. das grün markierte). Hierarchische Multipolmethoden vermeiden das üblicherweise notwendige Abschneiden (b) der langreichweitigen Wechselwirkungen. Dazu werden alle Atome des Proteins (schwarz) hierarchisch gruppiert (c) und deren Ladungen zu Multipolen [(d), farbige Flächen] zusammengefaßt, deren Wechselwirkungen sich sehr effizient berechnen lassen.

Dinitrophenyl-Moleküle (DNP, grün) binden. Wie Abb. 4 (unten) zeigt, haben wir, ausgehend von seiner Kristallstruktur, den relevanten Teil des Komplexes, das sog. Fab-Fragment, in nativer Lösungsumgebung [9] modelliert.

Die nachfolgenden MD-Simulationen dieses Systems zielten darauf ab, kraftmikroskopische Einzelmolekülexperimente, in denen die Bindungskräfte von AN02/DNP-Komplexen gemessen werden und die gegenwärtig im Labor von Hermann Gaub (Universität München) durchgeführt werden, auf atomarer Ebene zu beschreiben. In diesen Experimenten (Abb. 5) werden die Komplexe mit definierter Rate getrennt und die dafür benötigte Kraft gemessen. Wir wollten insbesondere verstehen, welche mikroskopischen Wechselwirkungen und Prozesse den beobachteten Trennkraften zugrunde liegen. Ferner wollten wir die Genauigkeit unserer Simulationen testen, indem wir aus unseren Simulationen berechnete Trennkraften mit den im Experiment beobachteten verglichen. Erstmals hatten wir einen solchen Vergleich bereits an dem etwas kleineren Streptavidin/Biotin-System [10] und an Dextranpolymeren [11] durchgeführt und damit die Vorhersagekraft unserer Simulationen demonstriert [12].

Abb. 1 zeigt und beschreibt, wie wir in solchen Simulationen vorgehen, um die Einzelmolekülexperimente möglichst genau nachzuvollziehen. Dabei muß berücksichtigt werden, daß die Abreißkraft um so kleiner wird, je langsamer die Trennung erzwungen wird; die Kraft ist also eine Funktion der Geschwindigkeit v_{cant} , mit welcher die Spitze des Kraftmikroskops (vgl. Abb. 1) zurückgezogen wird – im Experiment ebenso wie in der Simulation. Zwei Effekte tragen wesentlich zu dieser Abhängigkeit bei: Wird der Ligand sehr schnell – etwa innerhalb von 100 Piko-sekunden – aus der Bindungstasche gezogen, dominieren viskose Reibungseffekte. In bisherigen Simulationen überdeckten sie den zweiten Effekt, die thermische Aktivierung, die oberhalb des Nanosekundenbereichs bis hin zum experimentellen Zeitbereich von Millisekunden dominiert. Erst unsere jüngsten, recht ausgedehnten Simulationen ermöglichten es, diesen Bereich zu erschließen. Die längste davon erforderte etwa 20 Wochen Rechenzeit.

Abb. 6 zeigt die aus einer Reihe solcher Simulationen gewonnenen Abreißkräfte

Fortsetzung auf Seite 4

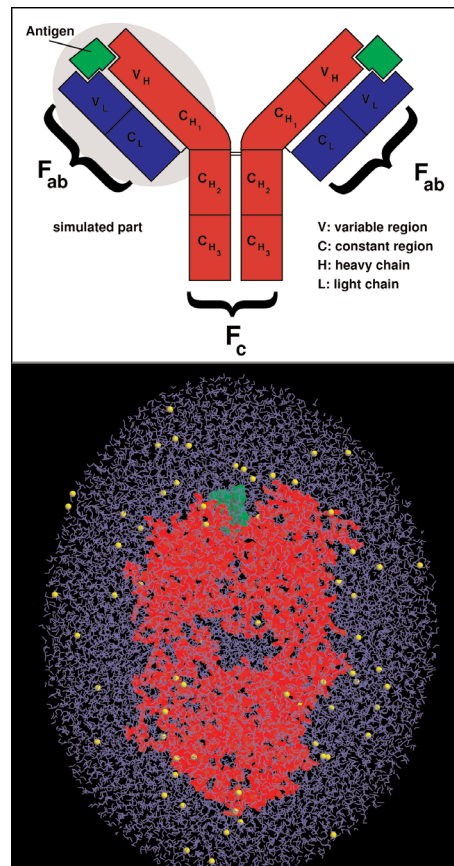


Abbildung 4: AN02/Dinitrophenyl-Komplex (oben): Das Dinitrophenyl-Hapten des Antigens (grün) bindet an die hypervariablen Region des AN02-Antikörpers, wobei sowohl Kontakte zur leichten Kette (blau) als auch zur schweren Kette (rot) ausgebildet werden. Grau unterlegt ist das F_{ab} -Fragment, das wir in MD-Simulationen untersucht haben. Dazu wurde ein Simulationssystem erstellt (unten), bestehend aus dem F_{ab} -Fragment (rot), dem daran gebundenen Hapten (grün) sowie einer physiologischen Lösungsumgebung (Wassermoleküle: blau, Ionen: gelb).

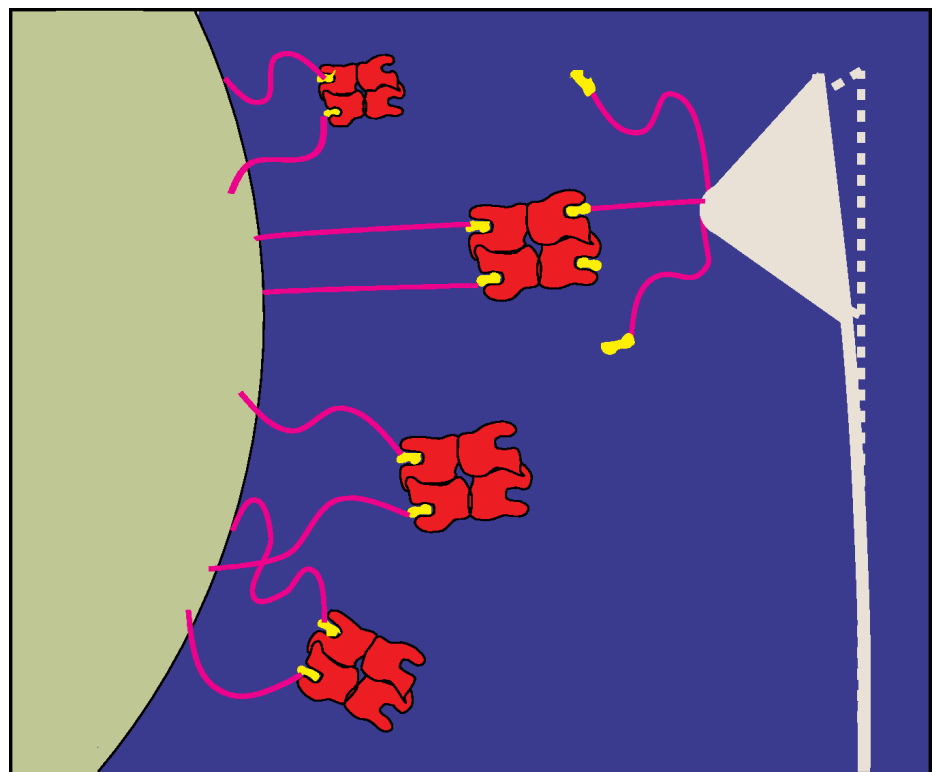


Abbildung 5: In kraftmikroskopischen Einzelmolekülexperimenten werden einzelne Ligand/Rezeptor-Komplexe (rot/gelb) getrennt. Sie werden dazu zwischen einer Unterlage (grün) und dem Cantilever eines Kraftmikroskops (grau) 'eingespannt'. Der Cantilever wird dann zurück bewegt; seine elastische Verbiegung mißt die Kraft, die auf den Komplex ausgeübt wird.

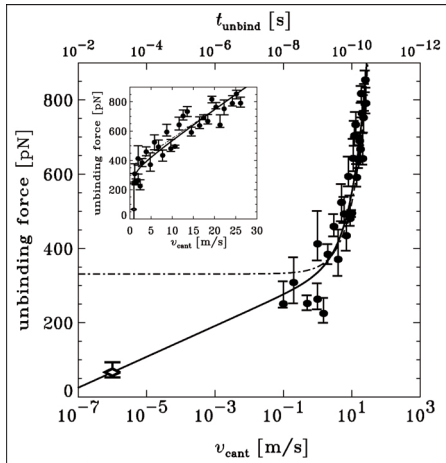


Abbildung 6: Berechnete Abreißkräfte (Punkte) für unterschiedliche Ziehgeschwindigkeiten v_{cant} (in logarithmischer Darstellung), entsprechend unterschiedlichen Zeitintervallen t_{unbind} , innerhalb derer die Bindungstrennung erzwungen wurde. Die durchgezogene Linie zeigt eine Anpassung unter Berücksichtigung von Reibung und von thermisch aktivierten Prozessen; die gestrichelte Linie berücksichtigt lediglich Reibungseffekte. Eine Abschätzung der im Experiment zu erwartenden Abreißkraft ist als Raute dargestellt. Der Inset zeigt dieselben Daten in linearer Auftragung.

(Punkte) als Funktion der Ziehgeschwindigkeit. Im Vergleich zwischen der logarithmischen und der linearen (Inset) Auftragung sind die beiden Regimes deutlich zu erkennen. Ebenfalls dargestellt ist eine Abschätzung der experimentell zu erwartenden Abreißkraft (weiße Raute), die auf einer Interpolation zwischen der spontanen Trennrates (Kraft null) und den aus den Simulationen gewonnenen Kräften beruht. Vorläufige Ergebnisse der kraftmikroskopischen Messungen in München deuten darauf hin, daß unsere Vorhersage zutrifft.

Wie erhofft, konnten wir aus unseren Simulationen ein mikroskopisches Modell (Abb. 7) des Abreißvorgangs gewinnen, welches im Detail das Trennen und auch ein transientes Bilden von Wasserstoffbrücken (gestrichelte Linien) und van der Waals-Kontakten (nicht dargestellt) zwischen dem Liganden und dem Rezeptor zeigt. Dieses Modell, das hier nicht genauer diskutiert werden kann, gestattet es etwa, Punktmutanten vorzuschlagen, welche die Spezifität und die Bindungskräfte der Antigenbindung erniedrigen oder auch sogar erhöhen sollten.

Bemerkenswert und in ihrem Umfang überraschend erscheint uns die breite

strukturelle Vielfalt möglicher Bindungsreaktionswege (besser: Trennreaktionswege), die von unseren Simulationen nahegelegt wird. Dies um so mehr, als eine vergleichbare Heterogenität in früheren Abreiß-Simulationen, etwa des Streptavidin/Biotin-Systems, nicht aufgetreten war. Entsprechend untersuchen wir gegenwärtig die funktionelle Bedeutung dieser Heterogenität, etwa im Licht des dadurch bedingten entropischen Beitrags zur freien Energie entlang des Reaktionswegs.

Literatur

- [1] J. C. Kendrew, R. E. Dickerson, B. E. Strandberg, R. G. Hart, D. R. Davies, D. C. Phillips, and V. C. Shore. Structure of myoglobin: A three-dimensional fourier synthesis at 2Å resolution. *Nature (London)* 185, 422-427, 1960.
- [2] R. M. Levy, R. P. Sheridan, J. W. Keepers, G. S. Dubey, S. Swaminathan, and M. Karplus. Molecular dynamics of myoglobin at 298°K. *Biophys. J.* 48, 509-518, 1985.
- [3] Helmut Grubmüller and Paul Tavan. Molecular dynamics of conformational substates for a simplified protein model. *J. Chem. Phys.* 101, 5047-5057, 1994.
- [4] Helmut Grubmüller and Paul Tavan. Multiple time step algorithms for molecular dynamics simulations of proteins: How good are they? *J. Comp. Chem.* 19, 1534-1552, 1998.
- [5] M. Eichinger, H. Grubmüller, H. Heller, and P. Tavan. FAMUSAMM: A new algorithm for rapid evaluation of electrostatic interactions in molecular dynamics simulations. *J. Comp Chem.* 18, 1729-1749, 1997.
- [6] Helmut Grubmüller, Helmut Heller, Andreas Windemuth, and Klaus Schulten. Generalized Verlet algorithm for efficient molecular

Zwei der unzähligen möglichen Reaktionswege sind in Abb. 7 dargestellt; sie unterscheiden sich sowohl in der Art und Abfolge intermediärer Bindungen zur Antikörper-Bindungstasche als auch in der jeweiligen Abreißkraft. Letzterer Befund legt nahe, daß die genaue Analyse der in Einzelmolekülexperimenten gemessenen Abreißkraftverteilungen einen kraftmikroskopischen Zugang zur strukturellen Heterogenität erlauben sollte. □

dynamics simulations with long-range interactions. *Molec. Sim.* 6, 121-142, 1991.

[7] Helmut Grubmüller. Predicting slow structural transitions in macromolecular systems: Conformational Flooding. *Phys. Rev. E* 52, 2893, 1995.

[8] Markus Eichinger, Helmut Grubmüller, and Helmut Heller. User Manual for EGO_VIII, Release 2.0 (electronic access: <http://www.mpibpc.gwdg.de/abteilungen/071/ego.html>).

[9] Helmut Grubmüller. Solvate: A program to create atomic solvent models, 1996. (electronic publication: <http://www.mpibpc.gwdg.de/abteilungen/071/solvate.html>).

[10] Helmut Grubmüller, Berthold Heymann, and Paul Tavan. Ligand binding: Molecular mechanics calculation of the streptavidin-biotin rupture force. *Science* 271 (5251), 997-999, 1996.

[11] M. Rief, F. Oesterhelt, B. Heymann, and H. E. Gaub. Single molecule force spectroscopy reveals conformational change in polysaccharides. *Science* 275, 1295-1297, 1997.

[12] H. J. C. Berendsen. Bio-molecular dynamics comes of age. *Science* 271, 954-955, 1996.

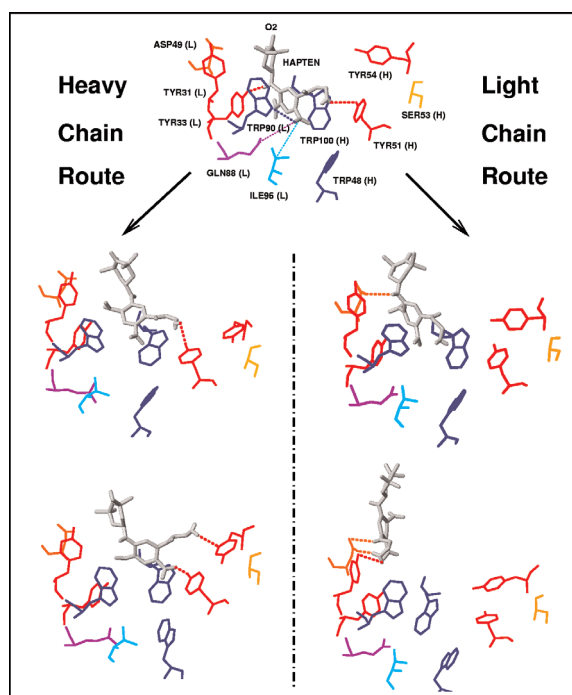


Abb. 7: Strukturelle Heterogenität der Trennung des AN02/DNP-Komplexes: Ausgehend vom gebundenen Zustand (oben, Mitte), kann das Dinitrophenyl-Hapten (grau) ein ganzes Spektrum unterschiedlicher Trennungsreaktionswege aus der Antikörper-Bindungstasche durchlaufen, wovon die Abbildung je zwei Momentaufnahmen zweier möglicher Reaktionswege ('Heavy chain route', links; 'Light chain route', rechts) zeigt. Die einzelnen Reaktionswege unterscheiden sich in der Bewegung des Haptens, in der transienten Bildung kurzreichweitiger Wechselwirkungen zwischen Hapten und Bindungstasche (etwa Wasserstoffbrücken, gestrichelt; van der Waals-Kontakte, nicht gezeigt) sowie in den Konformationsbewegungen der Bindungstasche.