

Strukturelle Interpretation metastabiler Zustände in Myoglobin-NO

Maksym Soloviov, Akshaya K. Das und Markus Meuwly*

Abstract: Die Bindung von Stickstoffmonoxid an Myoglobin (Mb) ist zentral für die Funktion des Proteins. Mit reaktiven Moleküldynamiksimulationen wird die Dynamik nach der NO-Dissoziation untersucht. Die NO-Rückbindung wird durch zwei Prozesse auf der 10-ps- und 100-ps-Zeitskala beschrieben, was mit Experimenten im optischen und Röntgenbereich übereinstimmt. Dabei ist die explizite Behandlung der Bewegung des Eisenatoms orthogonal zur Häm-Ebene (Fe-oop) essenziell. Die Existenz eines transienten „Fe-oop/NO-gebundenen“ Zustands, bei dem NO ca. 3 Å vom Eisenatom entfernt ist, wird bestätigt. Berechnete XANES-Spektren zeigen, dass zwischen ungebundenem NO nahe oder weiter vom Häm-Eisen entfernt nicht zu unterscheiden ist. Ein weiterer metastabiler Zustand (Fe-ON) kann experimentell nicht beobachtet werden, da er vom dissoziativen 4A -Zustand verdeckt wird. Dies macht Fe-ON zu einem lokalen Minimum, das im Wildtyp-Mb nicht beobachtet werden kann, in mutiertem Mb jedoch stabilisiert werden könnte.

Um die Funktion von Biomolekülen verstehen zu können, ist es essenziell, ihre Struktur, Bewegungen und funktionelle Dynamik zu charakterisieren. An den Endpunkten der Bewegungen finden sich üblicherweise stabile Zustände, die durch einen oder mehrere metastabile Zustände (Intermediate) getrennt sind.^[1,2] Experimentell können Zustände mit genügend langer Lebensdauer direkt strukturell charakterisiert werden.^[3,4] Wenn ein Zustand allerdings zu kurz existiert, um sich zu stabilisieren, kann nur indirekt auf seine Existenz geschlossen werden. Optische Spektroskopie kann die Existenz kurzlebiger Zustände über spektrale Verschiebungen aufdecken. Röntgenabsorptionsspektroskopie („X-ray absorption spectroscopy“, XAS)^[5] oder multidimensionale Spektroskopie^[6,7] sind direktere Methoden, um die chemische Umgebung des Eisenatoms zu untersuchen. Allerdings ist es im Allgemeinen schwierig, Zeitskalen direkt mit bestimmten geometrischen Anordnungen der Atome zu assoziieren.^[4] Unter diesen Umständen sind computergestützte Methoden eine wertvolle Ergänzung, um die Dynamik eines Systems zu untersuchen.

Die Bewegung von photodissocierten Liganden in globulären Proteinen wurde in der Vergangenheit intensiv untersucht. Kleine Moleküle, die reversibel an das aktive Zentrum eines Proteins binden, sind ideale Sonden für das Innere solcher komplexen Systeme. Stickstoffmonoxid (NO) ist ein physiologisch relevanter Ligand,^[8–10] der daran beteiligt ist,

den Blutfluss und die neuronale Aktivität zu regulieren, und bei der Entstehung von Thrombosen eine Rolle spielt. Experimentell wurde die Bindungskinetik von NO an die Häm-Gruppe von Myoglobin (Mb) ausführlich mit zeitauflösender Spektroskopie vom UV/Vis- bis hin zum mittleren Infrarotbereich^[11–17] sowie mit resonanten Raman-Methoden^[14] untersucht. In allen Fällen verhält sich die Rückbindungskinetik multiexponentiell, mit Zeitkonstanten im Sub-Pikosekunden-Bereich bis hin zu mehreren hundert Pikosekunden. Dabei gibt es zwei Klassen von Prozessen: solche auf der 10-ps-Zeitskala und solche auf der 100-ps-Zeitskala.^[12,14–16,18,19]

Kürzlich wurde durch zeitauflösende Experimente das Zusammenspiel zwischen der Bewegung des Eisenatoms orthogonal zur Häm-Ebene („Fe-out-of-plane“, Fe-oop) und der NO-Ligandbewegung untersucht.^[5,14,16] Die vorliegende Arbeit deutet auf eine direkte Kopplung dieser beiden Freiheitsgrade auf der 10- bis 100-ps-Zeitskala hin. Was nach wie vor ungeklärt bleibt, ist die geometrische Struktur dieses Zustands. Außerdem haben frühere Untersuchungen versucht, den metastabilen Fe-ON-Zustand zu charakterisieren.^[20] Es bleibt weiterhin unklar, weshalb dieses in Modellsystemen^[21] häufig beobachtbare Motiv in einer Proteinumgebung, trotz einer Stabilisierungsenergie von 5 kcal mol^{–1} oder mehr,^[22] nicht gefunden wurde.

Die atomistische Dynamik ist wichtig für die Proteinfunktion und liefert die Basis für die Interpretation von Zeitskalen auf struktureller Ebene. Moleküldynamik(MD)-Simulationen sind ideal dafür geeignet, solche Fragen zu beantworten. Mit validierten Energiefunktionen können solche Simulationen das „fehlende Glied“ zwischen zeitauflösenden Experimenten und den zugrunde liegenden Atombewegungen sein.^[4,23,24] Für die Wechselwirkung von NO mit dem Häm in Mb sind solche Potentialflächen („potential energy surfaces“, PESs) für den gebundenen 2A - und den Ligand-ungebundenen 4A -Zustand verfügbar.^[25]

Eine statistisch relevante Zahl an QM/MM-Trajektorien zu generieren, von denen ausgehend man das Zusammenspiel der beteiligten Bewegungen analysieren und auflösen könnte, ist aktuell für Systeme wie MbNO nicht möglich. Für quantitative und aussagekräftige Ergebnisse werden geeignete Darstellungen, welche die Genauigkeit der interpolierten PES erhalten, in den Simulationen genutzt. Hier wird eine parameterfreie Methode für die Darstellung der PES verwendet, die auf einem Hilbert-Raum mit reproduzierendem Kern basiert („reproducing kernel Hilbert space“, RKHS).^[26,27] Die Methode reproduziert die quantenchemisch berechneten Referenzdaten exakt (für Details zu den PESs, siehe die Hintergrundinformationen). RKHS basiert auf einem Glattheitskriterium der Interpolanten und wurde erfolgreich bei der Untersuchung von Van-der-Waals-Komplexen eingesetzt.^[28,29]

[*] Dr. M. Soloviov, A. K. Das, Prof. M. Meuwly
Departement für Chemie, Universität Basel
Klingelbergstraße 80, 4056 Basel (Schweiz)
E-Mail: m.meuwly@unibas.ch

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind unter:
<http://dx.doi.org/10.1002/ange.201604552> zu finden.

Die vorliegende Arbeit verfolgt die reaktive Dynamik zwischen den ^4A - und ^2A -PESs, welche auf die Photodissociation des NO-Liganden vom Häm-Fe in Mb folgt. Aufgrund der energetischen Nähe der beiden Zustände und der Existenz von zwei Subzuständen auf der ^2A -PES ist eine interessante Dynamik zu erwarten. Durch Vergleich mit experimentell bestimmten Zeitskalen für die Rückbindung, sowie den Ergebnissen von spektroskopischen Untersuchungen, können strukturelle Fragen in Zusammenhang mit der Moleküldynamik beantwortet werden.

Um der reaktiven Dynamik zwischen den ^2A - und ^4A -Zuständen folgen zu können, wurden 300 unabhängige Simulationen gestartet. Die maximale Simulationszeit betrug 200 ps. Bildete sich der gebundene Fe-NO-Zustand bereits früher, wurde die Trajektorie vorzeitig angehalten. Photodissociation wurde durch instantanes Ändern des Kraftfelds zum ^4A -Zustand induziert.^[30] Dies führt dem System etwa 50 kcal mol⁻¹ an zusätzlicher Energie zu,^[25] was vergleichbar mit den experimentellen Photonenenergien (49 bis 81 kcal mol⁻¹) ist.^[31] Die Rückbindungskinetik ist in Abbildung 1 dargestellt. Sie zeigt den Anteil von gebundenem NO als Funktion der Zeit. Auf der Sub-Nanosekunden-Zeitskala folgt die Rückbindungskinetik einem multiexponentiellen Zerfall mit zwei Zeitkonstanten $\tau_1 \approx 10$ ps und $\tau_2 \approx 150$ ps, welche auch von der Wahl der asymptotischen Verschiebung Δ der beiden Zustände abhängig sind (siehe Tabelle S1). Die Verschiebung Δ bestimmt die relative Lage der asymptotischen Energien der ^2A - und ^4A -PESs für NO in unendlichem Abstand zum Häm-Fe (siehe die Hintergrundinformationen).

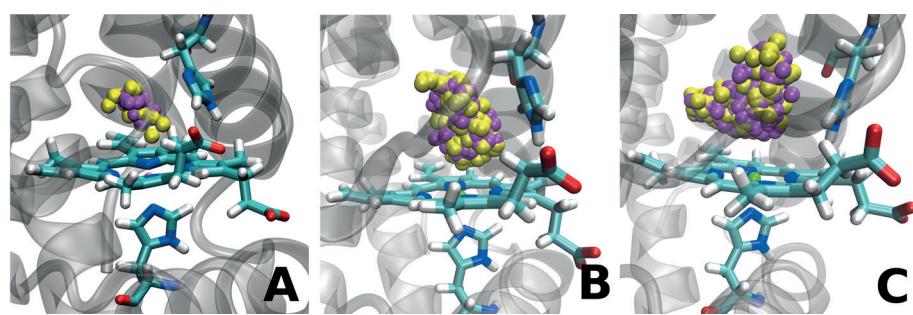


Abbildung 2. Typische Trajektorien für verschiedene Rückbindungszeitskalen. Die Positionen von NO werden in gelb (N) und magenta (O) gezeigt. A) Der Pikosekunden-Prozess ($\tau = 1.6$ ps); B) der 10-Pikosekunden-Prozess ($\tau = 42.1$ ps); C) der 100-Pikosekunden-Prozess ($\tau = 160.2$ ps).

Typische Ligandtrajektorien sind in Abbildung 2 zu sehen. Feld A zeigt die Rückbindung auf der 1-ps-Zeitskala, wogegen Felder B und C die Rückbindung für die Zeitskalen τ_1 und τ_2 zeigt. Für τ_1 bewegt sich der Ligand lediglich in der unmittelbaren Umgebung des Häm-Eisens bevor er erneut bindet. Auf der 100-ps-Zeitskala findet die Rückbindung von weiter entfernten Bereichen statt. Für $\Delta = -6.1$ kcal mol⁻¹ findet die Rückbindung bei 17 Trajektorien innerhalb von 2 ps statt, für 28 zwischen 2 und 10 ps, für 115 zwischen 10 und 200 ps und für 140 auf Zeitskalen länger als 200 ps. Demnach beträgt der Anteil von Rückbindungen innerhalb von 200 ps ca. 55 %. Das ist vergleichbar mit dem mittels XAS-Messungen bestimmten Anteil von 75 %.^[5]

Die PESs, welche für die bisher beschriebenen Simulationen verwendet wurden, wurden an DFT-Daten, einschließlich von Umgebungseffekten (siehe die Hintergrundinformationen), angepasst. Entsprechende Simulationen von 200 unabhängigen Trajektorien auf den PESs, die ausschließlich den DFT-Daten zugrunde liegen, ergaben die Rückbindung von 195 Trajektorien innerhalb von 200 ps, mit Rückbindungszeiten von 2 und 15 ps. Das ist um eine Größenordnung schneller als mit der genaueren PES, die den Fe-oop-Freiheitsgrad explizit und genauer behandelt. Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit zuvor durchgeföhrten Simulationen, die ebenfalls lediglich DFT-Daten zum Anpassen der PESs verwendeten.^[19,32] Daraus lässt sich schließen, dass es für quantitative Ergebnisse zwingend notwendig ist, die Fe-oop-Bewegung explizit zu beschreiben.

Zusätzliche Information über die verschiedenen Rückbindungszeitskalen kann durch die Analyse des maximalen Abstands von Eisen und Ligand während den Simulationen erhalten werden. Die 300 Trajektorien wurden in drei Gruppen unterteilt: Trajektorien, die auf sehr kurzen Zeitskalen zur Rückbindung führen ($\tau < 2$ ps), solche die innerhalb von 10 ps zur Rückbindung führen und solche die länger als 10 ps benötigen. Die individuell normierten Wahrscheinlichkeitsverteilungen sind in Abbildung S5 zu sehen. Auf einer 200-ps-Zeitskala wird keine Diffusion von NO in benachbarte Xenon-Bindungsstellen beobachtet. Zum Beispiel dauert es 1 bis 10 ns, bis der Ligand in die nächste Xe-Bindungsstelle (Xe4) wandert.^[33,34]

Frühere experimentelle und computergestützte Untersuchungen^[12,19,30,32,35-37] fanden, dass die Rückbindungskinetik von MbNO nicht exponentiell ist, sondern zwei bis drei

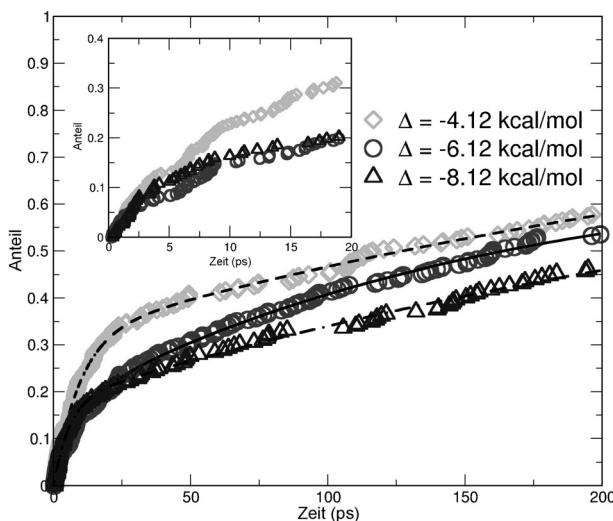


Abbildung 1. Die Kinetik und die entsprechenden exponentiellen Anpassungen für die Rückbindung von NO an Häm-Fe nach Photoanregung. Die Simulationen wurden für drei verschiedene Werte der asymptotischen Verschiebung Δ durchgeführt.

Zeitskalen beinhaltet, dies abhängig vom zugrundeliegenden Modell. Die frühesten Arbeiten sprechen von Zeitskalen von 27.6 ps und 279.3 ps für eine doppel exponentielle Anpassung.^[12] Später wurden in optischen und Infrarot-Experimenten kurze Zeitskalen zwischen 5 und 30 ps und längere Zeitskalen zwischen 100 und 200 ps gefunden.^[35–37] Alle Experimente stimmen dahingehend überein, dass zwei Sub-Nanosekunden-Zeitskalen existieren, die sich in etwa einer Größenordnung unterscheiden. Vorhergehende Rechnungen mit reaktiven Kraftfeldern fanden typischerweise etwas kürzere Rückbindungszeiten zwischen 5 ps und 20 ps,^[19,32] je nachdem, welche asymptotische Verschiebung Δ verwendet wurde.^[38] Die vorliegenden Simulationen finden mehrere Zeitskalen zwischen 10 und 100 ps, die in Übereinstimmung mit optischen und Infrarot-Experimenten sind. Außerdem ist eine schnellere Komponente auf der 1- bis 2-ps-Zeitskala vorhanden. Der Einfluss der Fe-oop-Bewegung ist in der Rückbindungskinetik deutlich sichtbar (Abbildung 1). Dies spricht für die Qualität des verwendeten Kraftfelds und erlaubt es, einige kürzlich postulierte Hypothesen zu untersuchen.

Es ist möglich eine direkte Verbindung zu einer kürzlich vorgeschlagenen, transienten Struktur im ²A-Zustand herzustellen. Studien mit Pikosekundenauflösung^[14] und XAS-Experimente^[5] legen den Schluss nahe, dass die Fe-oop- und die NO-Ligandbewegung eng verknüpft sind. Die Interpretation der Experimente deutet auf die Existenz einer ligandgebundenen Fe-oop-Struktur mit einer Lebensdauer von 30 ± 10 ps hin. Die vorliegenden Simulationen auf der ²A-PES alleine zeigen tatsächlich die Stabilisierung eines solchen flüchtigen Zustands. Die maximale Lebensdauer dieses Zustands beträgt 27 ps, und 41.7 % der Trajektorien zeigen einen solchen Zustand (siehe Abbildung S3). Obwohl die experimentell beobachtete Lebensdauer von 30 ± 10 leicht unterschätzt wird, sprechen die vorliegenden Simulationen für die Existenz eines solchen Zustands.

Ein anderer transienter Zustand, der für Häm-Modellverbindungen gefunden wurde, ist das Fe-ON-Isomer.^[21,39,40] Solch eine Struktur ist in NO-gebundenem Mb ausreichend stabilisiert (einige kcal mol⁻¹), sodass man den Zustand in Infrarot-Experimenten beobachten können sollte.^[22] Allerdings wurde ein solcher Zustand experimentell nicht gefunden.^[20] Simulationen im ²A-Zustand alleine zeigen, dass der Ligand für mehr als 10 ps im Fe-ON-Zustand stabilisiert ist. Wenn allerdings die reaktive ²A+⁴A-PES mit einer Verschiebung von $\Delta = -6.1$ kcal mol⁻¹ (die am besten die DFT-Energien reproduziert) verwendet wird, dann kann die Fe-ON-Konfiguration nicht stabilisiert werden, da in der Gegend des Fe-ON-Minimums der repulsive ⁴A-Zustand eine niedrigere Energie hat als der ²A-Zustand. Folglich wird das ²A-Minimum des Fe-ON-Zustands vom ⁴A überdeckt und kann im Wildtyp-Mb nicht stabilisiert werden.

Die asymptotische Verschiebung Δ hängt von der chemischen Umgebung der Häm-Gruppe ab. Folglich verändert sich Δ , wenn die Umgebung modifiziert wird, z. B. durch Mutation von Aminosäuren oder wenn die Häm-Gruppe sich innerhalb eines anderen Proteins befindet. Dieser Effekt kann mit Simulationen auf der reaktiven ²A+⁴A-PES mit verschiedenen Werten von Δ quantifiziert werden. Mit einer

um 5 kcal mol⁻¹ verringerten asymptotischen Verschiebung ($\Delta = -11.1$ kcal mol⁻¹), wird der Fe-ON-Zustand weiter destabilisiert (Abbildung S6A). Für $\Delta = -6.1$ kcal mol⁻¹ (Abbildung S6B) wird der Fe-ON-Zustand selten eingenommen, und die Rückbindung in den Fe-NO-Zustand ist effizient. Wenn dagegen die asymptotische Verschiebung auf $\Delta = -1.1$ kcal mol⁻¹ verringert wird (Abbildung SI6C), dann wird der Fe-ON-Zustand für längere Zeitspannen bevölkert, während derer die spektroskopische Charakterisierung des Zustands möglich sein sollte. Zum Vergleich fand eine kürzlich veröffentlichte Arbeit eine 2.5 mal langsamere Rückbindung für NO in Mb im Vergleich zu NO in Cytochrom C aufgrund des unterschiedlichen Aufbaus des aktiven Zentrums.^[41] Der Eyring-Theorie zufolge entspricht ein Faktor von 2.5 in der Rate einem Energieunterschied von ca. 0.5 kcal mol⁻¹. Die thermodynamische Stabilität von Mb aufgrund von Mutationen variiert zwischen -2 und $+6$ kcal mol⁻¹.^[42] Dies legt den Schluss nahe, dass Veränderungen am aktiven Zentrum die Fe-ON-Konformation durch unterschiedliche Stabilisierung des gebundenen und ungebundenen Zustands stabilisieren können.

Mit den Koordinaten der reaktiven MD-Simulationen ist es möglich, die in den Rückbindungssimulationen gefundenen Zeitskalen von ca. 10 ps und 100 ps strukturell zu interpretieren. Es ist von besonderem Interesse zu untersuchen, in welcher Art sich die Dynamik dieser beiden Zustände unterscheidet. Wahrscheinlichkeitsverteilungen der Projektion auf die Häm-Ebene von a) NO-Ligand, b) allen Seitenketten des aktiven Zentrums und c) allen His64-Seitenkettenatomen sind in Abbildung 3 dargestellt.

Die Wahrscheinlichkeitsverteilungen zeigen, dass dem NO-Ligand für lange Rückbindungszeiten ein viel größerer Raum offen steht als für kurze Rückbindungszeiten (Abbildung 3, obere Reihe). Außerdem nimmt das NE2-Atom von His64 zwei deutlich unterscheidbare Zustände (A und B) in Trajektorien mit langer Rückbindungszeit an, die in Trajektorien mit $\tau_1 = 10$ ps nicht vorhanden sind (Abbildung 3, mittlere Reihe). Die mittlere Reihe zeigt deutlich, dass für die Zeitskala τ_1 das NE2-Atom von His64 einen Raum beansprucht, der deutlich weiter entfernt vom Eisen liegt (dieses befindet sich im Ursprung des Koordinatensystems), während das Atom auf längeren Zeitskalen bis fast 2 Å zum Häm-Fe drückt, was den Liganden an der Rückbindung hindert. Der geschätzte Wert der Barriere $\Delta G^{\text{NE2}} \rightarrow = 2.5$ kcal mol⁻¹ für die Vorwärtsreaktion und $\Delta G^{\text{NE2}} \rightarrow = 4.0$ kcal mol⁻¹ für die Rückreaktion lässt vermuten, dass auf der 100-ps-Zeitskala Zustand A gegenüber Zustand B destabilisiert ist. Entsprechende Barrieren für andere His64-Seitenkettenatome schwanken zwischen 0.5 und 1.5 kcal mol⁻¹. Folglich ist Zustand B im Mittel durch eine Barriere von ca. 2 kcal mol⁻¹ von Zustand A getrennt, wobei Zustand B eine niedrigere Energie als Zustand A hat.

Die beiden Zustände (A: grün, B: rot) sind in Abbildung 4 zusammen mit der Röntgenstruktur 1HJT^[43] (gold) gezeigt. Zustand A („His64 out“) gehört zur kurzen Rückbindungszeitskala (10 ps), während Zustand B („His64 in“) zur langsamen (100 ps) Komponente gehört. Die Höhe der Barriere entspricht einer Umwandlungszeit A \rightleftharpoons B auf der Sub-Nanosekunden-Zeitskala. Dies ist in Übereinstimmung

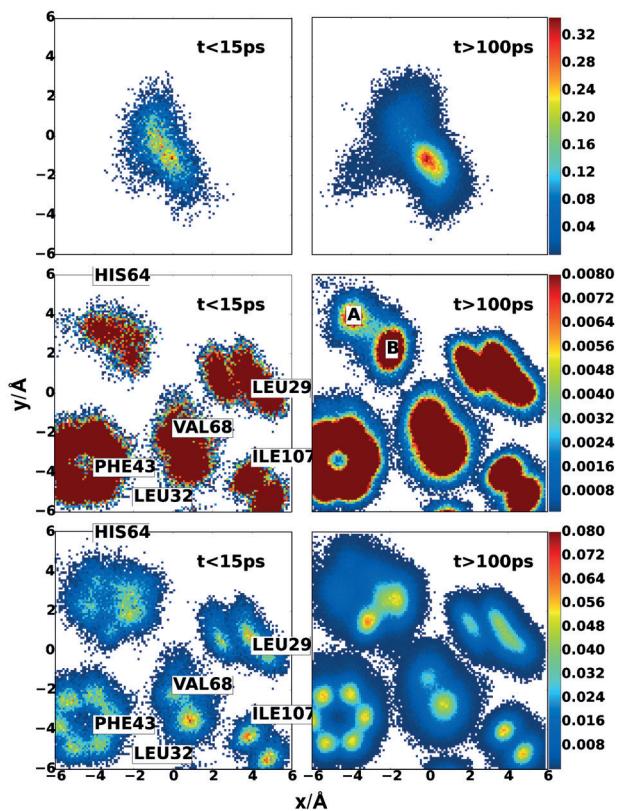


Abbildung 3. Oberes Feld: (x,y) -Wahrscheinlichkeitsverteilung für die Rückbindung des freien NO-Liganden auf den Zeitskalen $t < 15$ ps (links) und $t > 100$ ps (rechts). Mittleres Feld: (x,y) -Wahrscheinlichkeitsverteilung für das NE2-Atom von His64 auf den beiden Zeitskalen. Die beiden Zustände für NE2 sind mit (A,B) gekennzeichnet und deutlich unterscheidbar. Außerdem werden Wahrscheinlichkeitsdichtefunktionen für alle Seitenkettenatome von Phe43, Val68, Leu29 und Ile107 gezeigt. Für Phe43 befindet sich der Phenyl-Ring immer parallel zur Häm-Ebene, und alle 6 Kohlenstoffatome sind deutlich unterscheidbar. Unteres Feld: Wie im mittleren Feld, aber für die gesamte Seitenkette von His64 und mit verschiedenen Höhen der Verteilungsfunktionen.

mit expliziten Simulationen und passt gut zu früheren Ergebnissen für CO-gebundenes Mb mit Umwandlungszeiten von einigen hundert Pikosekunden.^[6,44]

Um direkt mit den XAS-Experimenten zu vergleichen, wurden XANES-Spektren für zufällig gewählte Strukturen

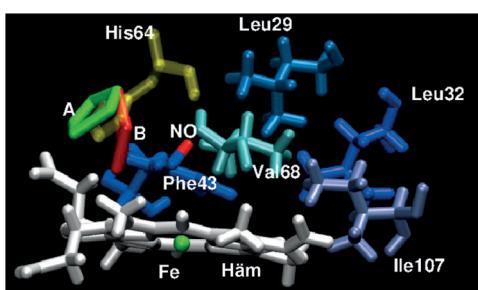


Abbildung 4. Zustände A (grün) und B (rot), abgeleitet von den Wahrscheinlichkeitsverteilungen für die His64-Seitenkettenatome. In gold die Röntgenstruktur als Referenz.

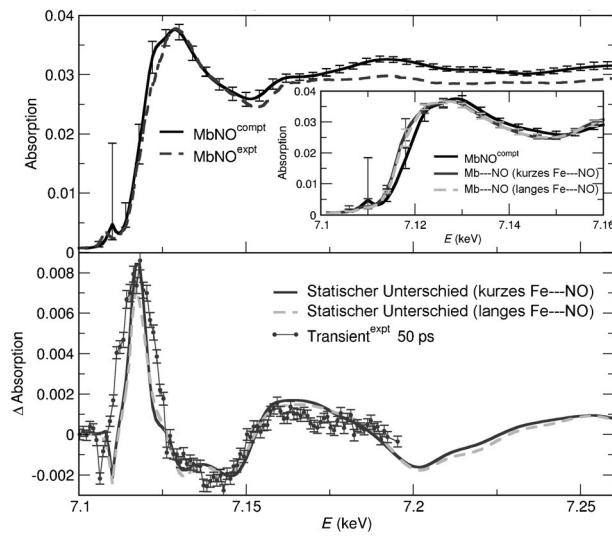


Abbildung 5. Oberes Feld: Berechnetes XANES-Spektrum für MbNO (schwarz) im Vergleich zum Experiment (gestrichelt). Vertikale Balken zeigen Minimum und Maximum der Absorption aller Momentaufnahmen (die Unterschiede werden durch das zufällige Erkunden des Konformationsraums verursacht). Der Einsatz vergleicht die berechneten Spektren für MbNO und zwei Sätze von photodissozierten Systemen (durchgezogen und grau gestrichelt, siehe Text). Unteres Feld: Statische Differenzspektren (durchgezogen und grau gestrichelt) im Vergleich zum experimentellen Übergang bei 50 ps (rot).

aus der MD mit NO im gebundenen Zustand (40 Strukturen), NO im ungebundenen Zustand innerhalb 3.5 Å Entfernung zum Häm-Fe (20 Strukturen) und NO im ungebundenen Zustand innerhalb 5.0 Å Entfernung zum Häm-Fe (10 Strukturen) berechnet. Für den gebundenen Zustand stimmt das berechnete Spektrum ($I_b(E)$) bis hin zu Energien von 7.15 keV gut mit dem experimentellen Spektrum überein. Für höhere Energien ist das Absorptionssignal zwar richtig beschrieben, aber die berechnete Intensität ist zu groß (siehe Abbildung 5, oberes Feld). Die ungebundenen Strukturen ergeben $I_{ub,s}$ respektive $I_{ub,l}$ für die kleinen und großen Fe-NO-Abstände und sind trotz der verschiedenen NO-Abstände beinahe deckungsgleich (Abbildung 5, Einschub). Nach Photodissoziation des Liganden verschiebt sich das Maximum bei 7.12 keV zu niedrigeren Energien, und die Intensität nimmt im Vergleich zum Spektrum des gebundenen Zustands zwischen 7.12 und 7.15 keV ab, während es zwischen 7.15 und 7.18 keV zunimmt. All diese Merkmale sind in Übereinstimmung mit früheren Experimenten an MbNO und Deoxy-Mb.^[5,14]

Das experimentell beobachtete Signal bei 50 ps wird mit der gemittelten Absorptionsdifferenz $\Delta I_{ub,s} = I_b - I_{ub,s}$ und $\Delta I_{ub,l} = I_b - I_{ub,l}$ in Abbildung 5 verglichen. Die beiden berechneten Spektren sind trotz der sehr unterschiedlichen Ligandenpositionen relativ ähnlich – abgesehen von einer leicht reduzierten Amplitude um 7.13 keV und 7.15 keV und einer Erhöhung um 7.16 keV für $\Delta I_{ub,s}$ im Vergleich zu $\Delta I_{ub,l}$. In beiden Fällen befindet sich die Fe-oop-Position zwischen 0.3 und 0.15 Å unter der Ebene, obwohl für $\Delta I_{ub,s}$ Positionen näher an der Ebene ebenfalls vorkommen. Im Vergleich zum experimentellen Übergang zeichnen $\Delta I_{ub,s}$ und $\Delta I_{ub,l}$ die Hauptmerkmale zwar nach, unterscheiden sich aber in der

Breite des Maximums bei 7.12 keV und dem Verhalten zwischen 7.13 und 7.15 keV. Abbildung S7 lässt vermuten, dass Vorhandensein oder Abwesenheit des photodissocierten NO das XANES-Spektrum über den gesamten Energiebereich zwischen 7.1 und 7.15 keV beeinflusst und nicht etwa lediglich im Bereich von 7.15 keV wie zuvor angenommen,^[5] weil das Signal auch von der Bewegung des Fe-Atoms relativ zur Häm-Ebene abhängt. Innerhalb des experimentellen Rauschens kann nicht unterschieden werden, ob der Ligand nahe am Häm-Fe ist oder weiter davon entfernt. Man sollte sich hier in Erinnerung rufen, dass experimentell eine Mischung zwischen NO-gebundenen und NO-ungebundenen Strukturen gemessen wird, da die Ausbeute der Photolyse nicht 100% beträgt.

Reaktive MD-Simulationen mit MS-ARMD ergeben eine nichtexponentielle Kinetik für die Ligandenrückbindung. Die ermittelten Zeitskalen (10 und 100 ps) stimmen mit experimentell bestimmten Zeitskalen überein. Der Einfluss des Fe-oop-Freiheitsgrads auf die Rückbindungsreaktion konnte direkt nachgewiesen werden. Die zwei Zeitskalen sind mit zwei strukturell verschiedenen relativen Orientierungen der His64-Seitenkette – „out“ (Zustand A) und „in“ (Zustand B) – assoziiert, welche die Rückbindungsreaktion kontrollieren. Obwohl er energetisch zugänglich ist, ist es sehr unwahrscheinlich, dass der metastabile ²A-Fe-ON-Zustand im Wildtyp-Mb beobachtbar ist, da in diesem Bereich des Konfigurationsraums der repulsive ⁴A-Zustand energetisch niedriger liegt und eine Stabilisierung verhindert. Die vorliegende Arbeit stützt die kürzlich vorgeschlagene, transiente Fe-oop/NO-gebundene Struktur mit Lebensdauern bis 30 ps. Die berechneten XAS-Spektren sind mit experimentell gemessenen Spektren kompatibel, können aber nicht zwischen Strukturen unterscheiden, bei denen das photodissociierte NO „nahe zum“ oder „weit weg vom“ Häm-Fe im aktiven Zentrum liegt. Die vorliegende Arbeit liefert ein auf atomarer Ebene verfeinertes Bild und strukturelle Erklärungen für eine Reihe experimenteller Beobachtungen, die alle empfindlich gegenüber der Fe-oop-Dynamik von NO nach Photodissociation in natürlichem Mb sind.

Danksagung

Wir danken Chris Milne für aufschlussreiche Diskussionen sowie Peter Hamm und Majed Chergui für hilfreiche Kommentare. Die vorliegende Arbeit wurde durch den Schweizerischen Nationalfonds, Projekt 200021-117810, sowie durch das NCCR MUST unterstützt. Wir danken Oliver T. Unke für die deutsche Übersetzung des Manuskripts.

Stichwörter: Metastabile Zustände · Myoglobin · Reaktive Moleküldynamik · Stickstoffmonoxid

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 10126–10130
Angew. Chem. **2016**, *128*, 10280–10285

[1] S. Fischer, K. W. Olsen, K. Nam, M. Karplus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 5608–5613.

- [2] J. G. Menting, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2014**, *111*, E3395–E3404.
- [3] I. Schlichting, J. Berendzen, G. Phillips, R. Sweet, *Nature* **1994**, *371*, 808–812.
- [4] F. Schotte, M. Lim, T. A. Jackson, A. V. Smirnov, J. Soman, J. S. Olson, G. N. Phillips, M. Wulff, P. A. Anfinrud, *Science* **2003**, *300*, 1944.
- [5] M. Silatani, F. A. Lima, T. J. Penfold, J. Rittman, M. Reinhard, H. Rittmann-Frank, C. Borca, D. Grolimund, C. J. Milne, M. Chergui, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 12922–12927.
- [6] K. A. Merchant, W. G. Noid, D. E. Thompson, R. Akiyama, R. F. Loring, M. D. Fayer, *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 4–7.
- [7] J. Bredenbeck, J. Helbing, K. Nienhaus, G. U. Nienhaus, P. Hamm, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 14243–14248.
- [8] P. Pacher, J. S. Beckman, L. Liaudet, *Physiol. Rev.* **2007**, *87*, 315–424.
- [9] J. O. Lundberg, et al., *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 865–869.
- [10] T. Traylor, V. Sharma, *Biochemistry* **1992**, *31*, 2847–2849.
- [11] P. Cornelius, R. Hochstrasser, A. Steele, *J. Mol. Biol.* **1983**, *163*, 119–128.
- [12] J. W. Petrich, J. C. Lambry, K. Kuczera, M. Karplus, C. Poyart, J. L. Martin, *Biochemistry* **1991**, *30*, 3975.
- [13] D. Ionascu, F. Gruia, X. Ye, A. Yu, F. Rosca, C. B. A. Demidov, J. S. Olson, P. M. Champion, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 16921–16934.
- [14] S. G. Kruglik, B.-K. Yoo, S. Franzen, M. H. Vos, J.-L. Martin, M. Negrerie, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 13678.
- [15] J. Kim, J. Park, T. Lee, M. Lim, *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116*, 13663–13671.
- [16] B.-K. Yoo, S. G. Kruglik, I. Lamarre, J.-L. Martin, M. Negrerie, *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116*, 4106–4114.
- [17] S. Kim, G. Jin, M. Lim, *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 20366.
- [18] D. R. Nutt, M. Meuwly, *Biophys. J.* **2006**, *90*, 1191.
- [19] J. Danielsson, M. Meuwly, *J. Chem. Theory Comput.* **2008**, *4*, 1083.
- [20] K. Nienhaus, P. Palladino, G. U. Nienhaus, *Biochemistry* **2008**, *47*, 935.
- [21] N. Xu, J. Yi, G. B. Richter-Addo, *Inorg. Chem.* **2010**, *49*, 6253–6266.
- [22] D. R. Nutt, M. Karplus, M. Meuwly, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 21118.
- [23] D. R. Nutt, M. Meuwly, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 5998.
- [24] M. W. Lee, J. K. Carr, M. Göllner, P. Hamm, M. Meuwly, *J. Chem. Phys.* **2013**, *139*, 054506.
- [25] M. Soloviov, M. Meuwly, *J. Chem. Phys.* **2015**, *143*, 105103.
- [26] N. Aronszajn, *Trans. Am. Math. Soc.* **1950**, *68*, 337.
- [27] T. Hollebeek, T. S. Ho, H. Rabitz, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1999**, *50*, 537.
- [28] T. S. Ho, H. Rabitz, *J. Chem. Phys.* **1996**, *104*, 2584.
- [29] M. Meuwly, J. M. Hutson, *J. Chem. Phys.* **1999**, *110*, 8338.
- [30] M. Meuwly, O. M. Becker, R. Stote, M. Karplus, *Biophys. Chem.* **2002**, *98*, 183–207.
- [31] M. Lim, T. A. Jackson, P. A. Anfinrud, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 5801.
- [32] Siehe Lit. [18].
- [33] C. Bossa, M. Anselmi, D. Roccatano, A. Amadei, B. Vallone, M. Brunori, A. Di Nola, *Biophys. J.* **2004**, *86*, 3855.
- [34] N. Plattner, M. Meuwly, *Biophys. J.* **2012**, *102*, 333.
- [35] Y. Kholodenko, E. Gooding, Y. Dou, M. Ikeda-Saito, R. Hochstrasser, *Biochemistry* **1999**, *38*, 5918–5924.
- [36] X. Ye, A. Demidov, P. Champion, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 5914–5924.
- [37] Siehe Lit. [17].
- [38] P. Banushkina, M. Meuwly, *J. Chem. Phys.* **2007**, *127*, 135101.
- [39] M. Carducci, M. Pressprich, P. Coppens, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 2669–2678.

[40] L. Cheng, I. Novozhilova, C. Kim, A. Kovalevsky, K. A. Bagley, P. Coppens, G. B. Richter-Addo, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 7142.

[41] N. T. Hunt, G. M. Greetham, M. Towrie, A. W. Parker, N. P. Tucker, *Biochem. J.* **2011**, *433*, 459–468.

[42] K. P. Kepp, *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteomics* **2015**, *1854*, 1239–1248.

[43] E. A. Brucker, J. S. Olson, M. Ikeda-Saito, G. N. Phillips, *Prot. Struct. Funct. Genet.* **1998**, *30*, 352.

[44] J. Ma, S. Huo, J. Straub, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 2541–2551.

Eingegangen am 11. Mai 2016
Online veröffentlicht am 13. Juli 2016
