

Molekulardynamiksimulationen der Flexibilität und
Fluoreszenzanisotropie eines an ein Protein
gebundenen Farbstoffs

Diplomarbeit

vorgelegt von
Gunnar Schröder
aus
Bremen

angefertigt
am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen
2000

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	3
2	Die Methode der Molekulardynamiksimulation	11
3	Das verwendete Kraftfeld	21
4	Konformationsflexibilität des Farbstoffs	27
4.1	Konstruktion des Simulationssystems	27
4.1.1	Minimierung und Equilibrierung	29
4.2	Hierarchische Konformationssuche	33
4.2.1	<i>Mean-field</i> -Beschreibung	34
4.2.2	Schritt 1: Vollständige Konformationssuche	36
4.2.3	Schritt 2: Verwendung zufälliger Ausgangskonformationen	39
4.2.4	Ergebnisse aus Schritt 1 und 2	39
4.2.5	Schritt 3: Verwendung der in Schritt 2 gefundenen Kon- formationen	41
5	Freie Energie	45
5.1	Thermodynamische Integration	45
5.2	Simulationen zur Bestimmung der freien Energie	47
5.3	Ergebnisse	49
5.4	Abschätzung der Differenz ΔU der inneren Energie	51
5.5	Abschätzung der Differenz ΔS der Entropie	53
5.5.1	Hauptkomponentenanalyse	54
5.5.2	Simplex-Verfahren	55
5.5.3	Vergleich von PCA und Simplexmethode	56

INHALTSVERZEICHNIS	2
5.5.4 Ergebnisse der Entropieberechnung	58
5.6 Diskussion der Ergebnisse	59
6 Berechnung der Anisotropie	64
6.1 Theorie	64
6.2 Das <i>wobbling-in-a-cone</i> -Modell	67
6.3 Simulationen zur Berechnung der Anisotropie	69
6.4 Ergebnisse	70
6.5 Fehlerbetrachtung	72
6.6 Diskussion	75
7 Ein einfaches Membranmodell	77
7.1 Beschreibung des Membranmodells	78
7.2 Ergebnisse	81
8 Zusammenfassung	83

Kapitel 1

Einleitung

Der Mensch besitzt ca. 100 Milliarden Nervenzellen (Neuronen). Jede dieser Zellen schickt Signale, die in Nervenfasern Leitungsgeschwindigkeiten von über 100 m/s erreichen können, an benachbarte Zellen. Eine zentrale Rolle spielt dabei die Signalübertragung von einem Neuron zum nächsten über sogenannte Synapsen mittels eines Aktionspotentials (vgl. Abb.1.1), das durch äußere Einflüsse in der Zelle ausgelöst werden kann. Dieses Signal läuft das Axon entlang und endet in der Synapse. Dort befindet sich ein Pool von Membranvesikeln, die mit Molekülen, den sogenannten Neurotransmittern, angefüllt sind. Ausgelöst durch das Aktionspotential fusionieren einige Vesikel mit der Membran der Synapse und setzen so die Neurotransmitter in den synaptischen Spalt frei (Exocytose). Diese Moleküle diffundieren zu Ionenkanälen in der Membran des nachgeschalteten Neurons, die mit Rezeptoren für den Neurotransmitter versehen sind. Bindet ein Neurotransmitter an so einen Rezeptor, so öffnet der Kanal; Ionen können in die Zelle einströmen und dort ein weiteres Aktionspotential auslösen. Einen guten Überblick über die Neurobiophysik geben Ref. [1, 2].

Um eine störungsfreie Signalübertragung zu gewährleisten, darf die Fusion der Vesikel mit der Plasmamembran offensichtlich nicht spontan, sondern erst infolge eines Aktionspotentials stattfinden. Daher sind die Bedingungen (pH-Wert, Lipidmischung) in der Synapse so eingestellt, daß die Membranen sich im Ruhezustand des Neurons aufgrund von elektrostatischen Wechselwirkungen hinreichend abstoßen.

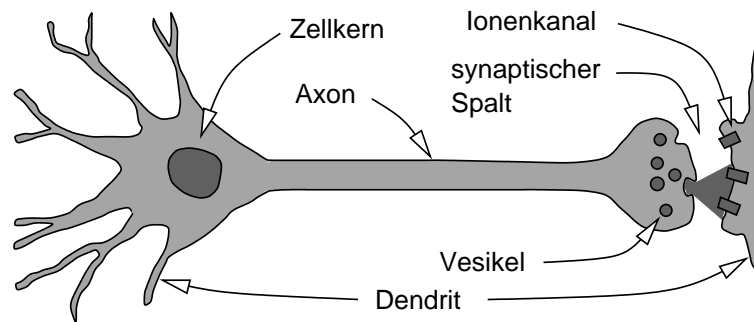


Abbildung 1.1: Der Aufbau von Neuronen.

Vor einigen Jahren wurde eine Familie von Proteinen entdeckt, die für die Membranfusion unverzichtbar sind [3, 4]. Diese Proteine werden als SNAREs (**S**oluble **N**SF **A**ttachment protein **R**Eceptors) bezeichnet. SNAREs findet man nicht nur in den Synapsen, sondern überall, wo Membranen fusionieren, z. B. beim vesikulären Transport von Stoffen durch die Zelle oder bei der Verschmelzung ganzer Zellen [5].

Häufig bildet ein Satz aus drei bis vier SNARE-Proteinen einen stabilen Komplex, im Fall der neuronalen Membranfusion aus den drei Proteinen Synaptobrevin, Syntaxin und SNAP-25. Die dreidimensionale Struktur dieses Komplexes wurde 1998 aufgeklärt [6]. Die Schlüsselrolle dieser Proteine zeigte sich erstmals bei der Beobachtung, daß sie von den Neurotoxinen Botulinum und Tetanus selektiv gespalten werden können, woraufhin keine Exocytose mehr stattfinden kann [7, 8]. Wickner und Kollegen haben erstmals bestätigt, daß die Existenz von komplementären SNARE-Proteinen in den Membranen notwendige Voraussetzung für die Fusion ist [9]. Das zeigt, wie wichtig die SNAREs für die Membranfusion sind.

Der Komplex kann von den Proteinen NSF und α -SNAP unter Verbrauch von ATP dissoziiert werden [10, 11], wobei allerdings NSF nicht direkt an der Fusion beteiligt ist [12, 13, 14, 15], sondern vorher durch die Dissoziation den Fusionsapparat aktiviert.

Syntaxin ist in der Plasmamembran und Synaptobrevin in der Vesikelmembran verankert, während SNAP-25 hingegen eine Transmembranregion fehlt. Es wird jedoch vermutet, daß Teile dieses Proteins palmitoyliert, al-

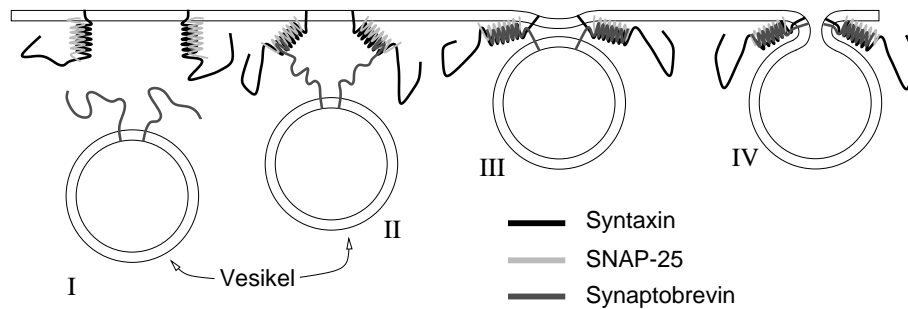


Abbildung 1.2: Modell der Membranfusion

so in die Plasmamembran eingelagert sind [16]. SNAP-25 bindet Syntaxin mit hoher Affinität [17], so daß die beiden Proteine möglicherweise in einem binären Komplex an der Plasmamembran vorliegen [18]. Darüber hinaus wurde herausgefunden, daß die Bildung des Komplexes mit einer deutlichen Zunahme an α -helikaler Struktur verbunden ist und Energie freisetzt [19]. Diese Ergebnisse legen das in Abbildung 1.2 dargestellte Modell der Membranfusion nahe [20, 18].

Nach diesem Modell werden die Membranen dadurch aneinandergezogen, daß sich die Proteine ineinander verdrehen und so den Komplex bilden. Es wird für wahrscheinlich gehalten, daß die dabei freiwerdende Energie direkt zur Fusion verwendet wird. In **Schritt I** bildet vermutlich SNAP-25 mit Syntaxin einen binären Komplex mit der Stöchiometrie 1:2, während Synaptobrevin ungefaltet an der Vesikelmembran vorliegt [19]. In **Schritt II** assoziiert Synaptobrevin an den binären Komplex, wobei ein Syntaxin durch Synaptobrevin ersetzt wird, so daß der Komplex jetzt eine Stöchiometrie von 1:1:1 hat. Das Vesikel wird dabei an die Plasmamembran gezogen. **Schritt III**: Der SNARE-Komplex ist gebildet, und das Vesikel liegt fest an der Plasmamembran [20]. In diesem Zustand kann sich noch keine Pore in der Membran bilden. Das System wartet auf das Signal, das die Membranfusion auslöst. **Schritt IV**: Ca^{2+} fließt durch spannungsabhängige Kalzium-Kanäle aufgrund eines Aktionspotentials in die Synapse. Der genaue Mechanismus der Triggerung der Bildung einer Pore in der Membran durch Ca^{2+} ist noch nicht bekannt, doch es ist wahrscheinlich, daß das Ca^{2+} -bindende Protein

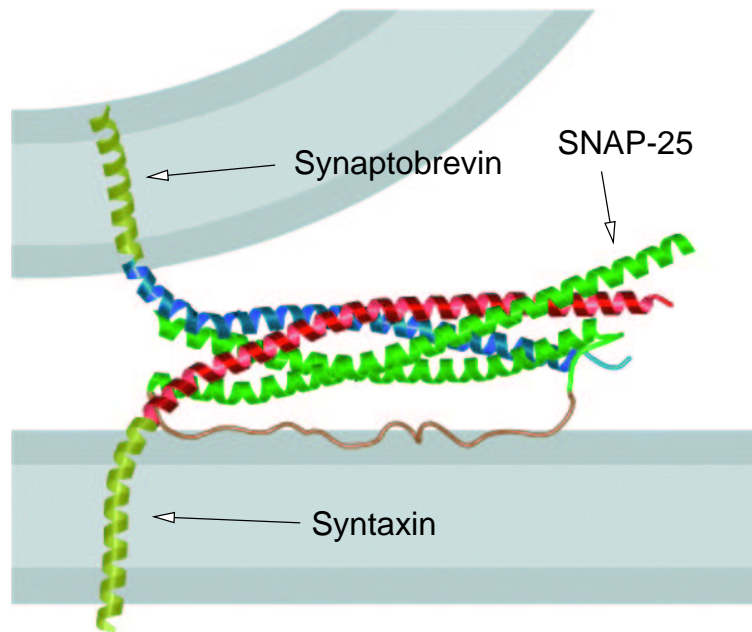


Abbildung 1.3: SNARE zwischen 2 Membranen

Synaptotagmin eine wesentliche Rolle dabei spielt [5]. Synaptotagmin bindet nämlich Ca^{2+} -abhängig sowohl an Syntaxin [21], als auch an Phospholipide [22, 23]. An dem gesamten Prozeß sind noch einige andere Proteine wie *sec1/munc18* und Rab Proteine beteiligt, deren genaue Funktionsweise sowie die Art ihrer Wechselwirkung mit dem SNARE-Komplex aber noch weitgehend unbekannt sind [5].

Das beschriebene Modell setzt voraus, daß der Komplex bei seiner Bildung eine mechanische Kraft auf die Membranen ausüben kann. Wie groß ist nun also die Kraft, die der Komplex erzeugen *kann*? Wieviel Freie Energie wird bei der Komplexbildung frei? Und wie viele SNARE-Komplexe sind für die Fusion notwendig, bzw. wie groß ist die Kraft, die der Komplex aufbringen *muß*? Die vorliegende Arbeit ist Teil eines Projektes (Schwerpunkt *Konformationelle Kontrolle biomolekularer Funktionen* der VW-Stiftung), in dem Antworten auf diese Fragen gefunden werden sollen.

So soll der Komplex mit der Methode der *Photonic Force Microscopy*

(*PFM*) [24, 25] in der Arbeitsgruppe Stelzer (EMBL, Heidelberg) auseinandergezogen werden, wobei die Kräfte, die der Komplex aufbringen kann, gemessen werden sollen. Diese Experimente sollen auch theoretisch durch computergestützte Simulation der atomaren Dynamik des Komplexes (einer sogenannten Molekulardynamiksimulation) beschrieben und mit dem Experiment verglichen werden, um eine Interpretation der Ergebnisse in atomarem Detail zu ermöglichen.

Fluoreszenzspektroskopische Methoden der Arbeitsgruppe Seidel (MPI biophysikalische Chemie, Göttingen) sollen dabei helfen, Übergangszustände des Proteins zu identifizieren und zu charakterisieren, die z. B. bei dem *PFM*-Experiment erwartet werden. Dabei soll ein Farbstoff, der in der Arbeitsgruppe Jahn (MPI biophysikalische Chemie, Göttingen) an eine genau definierte Stelle im Protein gebunden wird, als Sensor für konformationelle Übergänge im Protein dienen, da die Dynamik des gebundenen Farbstoffs an die des Proteins gekoppelt ist. Abbildung 1.4 zeigt, wie etwa die Beweglichkeit des Farbstoffs von seiner (Protein-)Umgebung beeinflusst werden kann.

Beiden Meßmethoden ist gemein, daß zwar die Observablen — Abbreißkräfte oder Anisotropie-Abklingkurven — durch die atomare Dynamik der beobachteten Proteine und Farbstoffe bestimmt werden, es aber umgekehrt sehr schwierig ist, direkt von der Messung auf die atomaren Funktionsmechanismen zu schließen. Daher soll hier der umgekehrte Weg beschrritten werden und Molekulardynamiksimulationen der vorgenommenen und geplanten Experimente durchgeführt werden. Durch Vergleich der berechneten mit den experimentellen Meßgrößen sollen so Rückschlüsse auf die Mechanismen gezogen werden. In der vorliegenden Arbeit wird die Simulation von Anisotropie-Abklingkurven des an das Protein gebundenen Farbstoffs dargestellt. Bisher wurden in der Literatur lediglich die Berechnungen von Anisotropien von Tryptophan-Residuen in Proteinen [26, 27, 28] sowie die Anisotropie von Farbstoffen in Lösung beschrieben [29].

Dabei wird die Methode der Molekulardynamiksimulation (MD) (Kapitel 2) benutzt, ein numerisches Verfahren zur theoretischen Beschreibung der Dynamik von Molekülen. Im wesentlichen werden die Newtonschen Bewegungsgleichungen aller Atome numerisch integriert. Hierbei werden alle Kräfte klassisch behandelt, z. B. werden chemische Bindungen durch ein

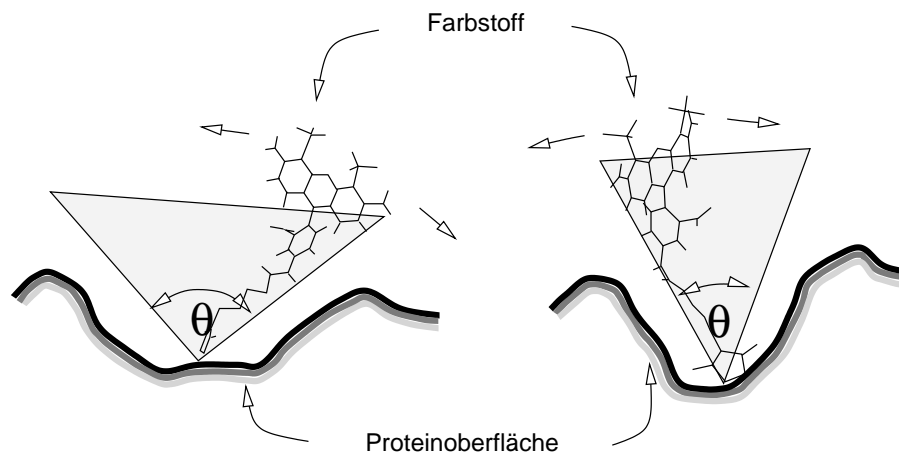


Abbildung 1.4: Die Beweglichkeit des Farbstoffs ist abhängig von der Konformation des Proteins.

harmonisches Potential angenähert, weshalb auch die Entstehung und das Brechen von Bindungen nicht beschrieben werden können. Ausgehend von der dreidimensionalen Struktur, die für den SNARE-Komplex vorliegt [6] und für den Farbstoff in Kapitel 3 erstellt wird, kann also eine Trajektorie der Bewegung berechnet werden.

Betrachtet man nun einen Farbstoff, der sich innerhalb eines in Abbildung 1.4 dargestellten Kegels bewegt, so ist der Öffnungswinkel θ des Kegels in diesem Modell ein Maß für seine Beweglichkeit. Dieses Modell heißt *wobbling-in-a-cone*-Modell [30]. Regt man nun den Farbstoff mit polarisiertem Licht an, so kann man aus der Drehung der Polarisationsrichtung der vom Farbstoff emittierten Photonen auf die Rotationsbeweglichkeit des Farbstoffs schließen. Eine experimentell zugängliche Größe als Maß für die Drehung der Polarisationsrichtung ist die Anisotropie, die im *wobbling-in-a-cone*-Modell mit dem Öffnungswinkel des Kegels verknüpft wird. Je größer die Anisotropie, desto kleiner ist der Öffnungswinkel. Die Anisotropie bzw. der Öffnungswinkel wird in dieser Arbeit eine wesentliche Rolle spielen.

Man erhält in der Ensemblemessung, bei der an vielen Farbstoffen gleichzeitig gemessen wird, nur Mittelwerte. Das ist dann ausreichend, wenn die Probe homogen ist, wenn also jeder Farbstoff die gleiche Bewegungsfreiheit und die gleiche Umgebung hat. Ist die Probe allerdings heterogen, kann sich

der Farbstoff z. B. in verschiedenen Konformationen befinden, in denen sich möglicherweise seine fluoreszenzspektroskopischen Eigenschaften voneinander unterscheiden, so lassen sich aus der Ensemblemessung keine Aussagen über die Verteilung der Messwerte gewinnen; das gelingt nur, wenn man an *einzelnen* Molekülen mißt. Einen Überblick über Fluoreszenzspektroskopie einzelner Biomoleküle gibt Ref. [31]. Mit Einzelmolekülexperimenten ist es möglich, verschiedene spektroskopische Eigenschaften, wie Fluoreszenzintensität, -lebensdauer und -anisotropie eines einzelnen Moleküls zu messen [32, 33], das sich während der Beobachtungszeit in einer bestimmten Konformation befindet. Vor kurzem durchgeführte Messungen der Fluoreszenzeigenschaften von an DNA gekoppelten Farbstoffen [33, 34] zeigen, daß sich so unterschiedliche Konformationen des Farbstoffs identifizieren lassen.

Aus der Simulation solcher fluoreszenzspektroskopischen Einzelmolekülexperimente lassen sich die Anisotropie und der Öffnungswinkel (Abb. 1.4) (Kapitel 6) bestimmen, und sie sollen direkt mit dem Experiment und mit dem *wobbling-in-a-cone*-Modell verglichen werden. Ziel ist eine mikroskopische Interpretation des Experiments in atomarem Detail, so daß die Meßergebnisse besser verstanden werden können.

Dazu soll zunächst herausgefunden werden, welche Konformationen der Farbstoff bevorzugt einnehmen wird (Kapitel 4). Dabei können zwischen verschiedenen Zuständen des Farbstoffs hohe Energiebarrieren liegen, deren Überquerung möglicherweise so unwahrscheinlich ist, also so lange dauert, daß sie während einer MD-Simulation von einigen Nanosekunden nicht beobachtet werden kann. Dieses Problem tritt bei MD-Simulationen häufig auf und wird *Sampling*-Problem genannt. Zur Lösung dieses Problems wird ein hierarchischer Ansatz gewählt, wobei in drei Schritten von einer vereinfachten, aber effizienten zu einer detaillierten, aber aufwendigen Beschreibung übergegangen wird. Es werden einige Vereinfachungen gemacht, die eine erste Idee von möglichen Zuständen liefern sollen. Zunächst wird der Konformationsraum des Farbstoffs auf wenige Freiheitsgrade projiziert, so daß dieser *vollständig* abgetastet werden kann. Dann werden mehrere MD-Simulationen mit zufällig gewählten Anfangskonformationen des Farbstoffs

durchgeführt, wobei ein einfaches Kontinuumsmodell für die Wasserumgebung benutzt wird, um den Rechenaufwand zu reduzieren. Anschließend werden die in diesen beiden ersten Schritten gefundenen Konformationen als Anfangskonformationen einer MD-Simulation mit expliziter Wasserumgebung benutzt. In Kapitel 5 sollen die Besetzungswahrscheinlichkeiten der so gefundenen Zustände bestimmt werden, indem die Differenz der freien Energie zwischen den Konformationen berechnet wird. Hier wird sowohl die Methode der *thermodynamischen Integration* [35] eingesetzt, als auch ein neues Verfahren zur Berechnung von Entropiedifferenzen entwickelt. Anschließend soll die Anisotropie des Farbstoffs in den unterschiedlichen Konformationen berechnet werden (Kapitel 6).

Der Vergleich der Simulation mit dem Experiment ist dabei sehr wichtig. Er zeigt zum einen, daß die Vereinfachungen der Simulation gerechtfertigt werden können. Er soll aber in diesem Fall auch gerade Hilfestellung bei der Interpretation der experimentellen Ergebnisse geben. Dabei wird es interessant sein herauszufinden, wie gut die Anisotropie aus der MD-Simulation bestimmt werden kann, da auf diesem Gebiet bisher nur wenig Erfahrungen gemacht wurden.

Die Kraft, die der SNARE-Komplex dem Modell in Abbildung 1.2 zufolge ausüben *kann*, kann also, wie oben dargestellt, experimentell (*PFM*) und mit Hilfe von MD-Simulationen bestimmt werden. Die Frage nach der Kraft, die der SNARE-Komplex im Rahmen des beschriebenen Modells aufbringen *muß*, um die Membranen aneinanderzuziehen, wird in Kapitel 7 behandelt. Hier soll ein stark vereinfachtes Modell der Wechselwirkung von Membranen mit dem SNARE-Komplex dargestellt werden. Dies soll eine Vorstellung davon vermitteln, in welcher Größenordnung die Kräfte liegen, die auf den SNARE-Komplex wirken.

Kapitel 2

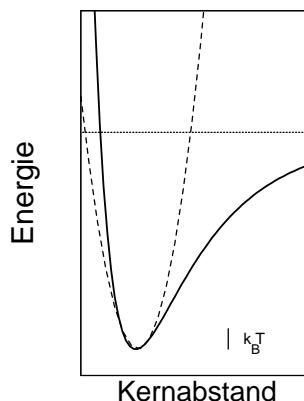
Die Methode der Molekulardynamiksimulation

Die Methode der Molekulardynamiksimulation (MD-Simulation) dient dazu, die Dynamik eines Systems, bestehend aus typischerweise 10^3 bis 10^5 miteinander wechselwirkenden Atomen, zu beschreiben. Im hier behandelten Fall besteht das System aus einem Protein in wässriger Lösung. Wollte man die Bewegung aller Atome exakt beschreiben, so müßte man die zugehörige zeitabhängige Schrödingergleichung lösen. Dies ist analytisch aber schon für ein einzelnes Heliumatom nicht möglich, und die numerische Lösung ist bereits bei mehr als zehn Atomen zu aufwendig. Daher ist eine solch vollständige Beschreibung von Proteinen in Lösung also bisher nicht möglich. Aus diesem Grund werden bei MD-Simulationen drei Näherungen eingeführt.

Zunächst werden, wie auch bei quantenchemischen Methoden, die schnellen elektronischen Freiheitsgrade von denen der Kerne separiert, was der Tatsache Rechnung trägt, daß Elektronen viel leichter sind als Atomkerne und letztere sich daher sehr viel langsamer bewegen. Entsprechend beschreibt die Born-Oppenheimer-Näherung eine Elektronendichte, die quasi instantan der sich verändernden Konformation der Kerne folgt. Damit läßt sich die Kernbewegung als durch ein effektives Potential verursacht auffassen, das durch die elektronische Dynamik bestimmt ist. Diese Energiefunktion hängt dann nur von den Kernkoordinaten ab.

KAPITEL 2. DIE METHODE DER MOLEKULARDYNAMIKSIMULATION 12

Die zweite Näherung besteht nun in der Annäherung dieser Energiefunktion durch eine semiempirisch entwickelte Energiefunktion. Zur Veranschaulichung dient der Fall eines zweiatomigen Moleküls, dessen Energiefunktion die nebenstehende Abbildung als Funktion des Abstands der beiden Kerne zeigt. Wie die gestrichelte Linie zeigt, läßt sich die Energiefunktion im Bereich thermischer Energien ($k_B T$) gut durch ein harmonisches Potential beschreiben.



In einem großen Simulationssystem wird jede chemische Bindung durch einen solchen Term beschrieben; die Gesamtheit aller dieser Terme heißt „Kraftfeld“. Die wichtigsten Terme für jede Molekulardynamiksimulation sind in Abbildung 2.1 abgebildet. Die Energiebeiträge tragen zum einen der chemischen Struktur des System Rechnung und beinhalten Bindungsstreck-, Bindungswinkel-, Torsions- und Extraplanarpotentiale, die näherungsweise die Eigenschaften kovalenter Bindungen beschreiben. Zum anderen werden die langreichweitigen nicht-kovalenten Wechselwirkungen berücksichtigt, zu denen die elektrostatischen und die Van der Waals-Wechselwirkungen gehören. Bindungsstreckungen und Bindungswinkel werden durch harmonische Potentiale beschrieben, deren Minimum dem Gleichgewichtsabstand zwischen zwei kovalent gebundenen Atomen bzw. dem Gleichgewichtsbindungswinkel von drei Atomen entspricht. Elektrostatischen Wechselwirkungen wird durch das Coulomb-Potential, Van der Waals-Wechselwirkungen und der Pauli-Abstoßung durch das Lennard-Jones-Potential [36] Rechnung getragen.

Es wurde eine Vielzahl von Kraftfeldern entwickelt (CHARMM [37], GROMOS [38], AMBER [39], MM3 [40], CFF [41], SPASIBA [42], etc.), die sich, je nach Art der zu beschreibenden Moleküle und der zu berechnenden Observablen in den verwendeten Energietermen unterscheiden.

Die Parameter eines Kraftfeldes, wie der Bindungsgleichgewichtsabstand b_0 oder die Van der Waals-Radien, werden in selbstkonsistenter Weise sowohl aus experimentellen Daten (Kristallstruktur, NMR-Daten, Infrarot-Spektroskopie etc.) als auch aus quantenchemischen Rechnungen gewonnen.

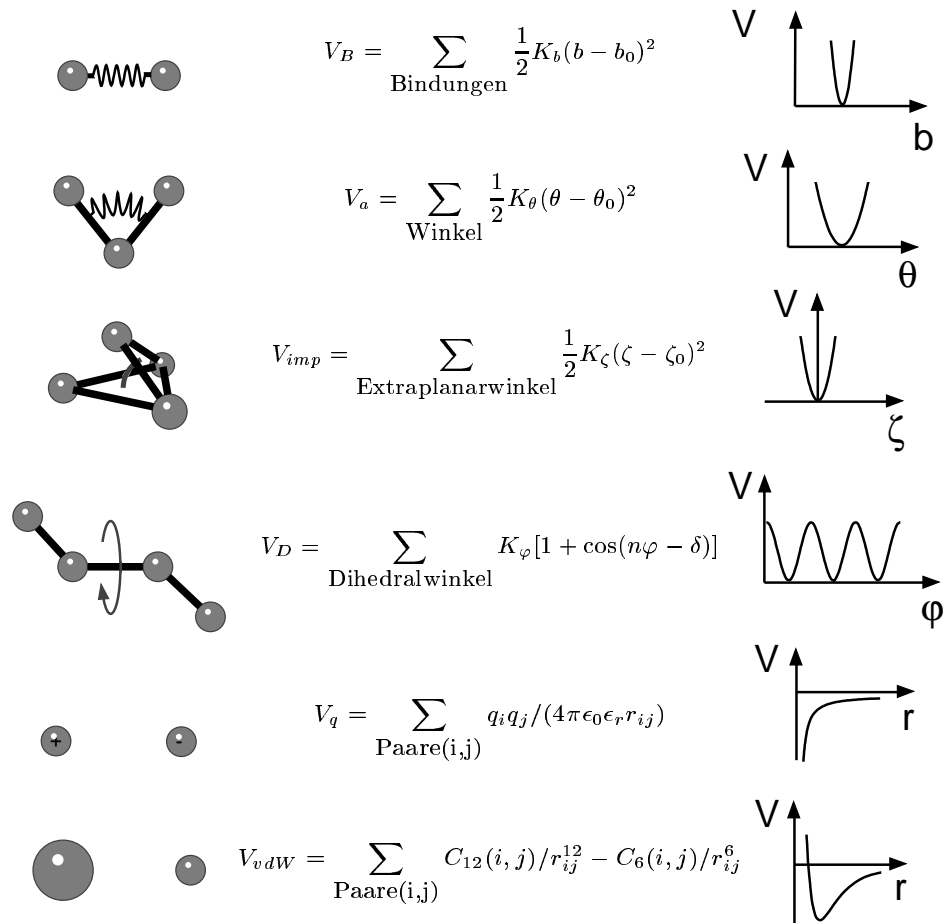


Abbildung 2.1: Energiebeiträge eines typischen Kraftfelds für MD-Simulationen. Auf der linken Seite sind die zu beschreibenden interatomaren Wechselwirkungen veranschaulicht. In der Mitte ist der verwendete Energieterm angegeben und auf der rechten Seite sein funktionaler Verlauf skizziert. Zur Erläuterung siehe Text.

Man optimiert die Parameter an kleinen einfachen Molekülen, aus denen man sich dann die größeren Moleküle zusammengesetzt denkt. Im Fall von Proteinen wurden die Parameter für die einzelnen Aminosäuren und sehr kurze Peptidketten optimiert.

Schließlich wird in einer dritten Näherung die Bewegung der Atomkerne klassisch beschrieben. Entsprechend werden die Atome als Punktmassen behandelt, die sich gemäß der Newton-Bewegungsgleichungen bewegen,

$$m_i \frac{d^2 \mathbf{r}_i(t)}{dt^2} = \mathbf{F}_i(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \dots, \mathbf{r}_N) = -\nabla_i V(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \dots, \mathbf{r}_N), \quad (2.1)$$

wobei m_i und \mathbf{r}_i die Masse und der Ort des i -ten Atomkerns ($i = 1, \dots, N$), \mathbf{F}_i die Kraft auf Atom i und N die Anzahl der Atome sind; $V(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \dots, \mathbf{r}_N)$ bezeichnet das verwendete Kraftfeld.

Die klassische Beschreibung der Bewegung der Atome ist dann erlaubt, wenn die thermische Energie deutlich größer ist als die Energielücken benachbarter Zustände. Am Beispiel des harmonischen Oszillators bedeutet das, daß für $k_B T \gg \Delta E = hf$ (k_B : Boltzmann-Konstante; T : Temperatur; ΔE : Energiedifferenz benachbarter Zustände; h : Planck-Konstante; f : Schwingungsfrequenz) eine klassische Beschreibung ausreicht. Bei Zimmertemperatur ist $k_B T \approx 0.6$ kcal/mol. Setzt man $k_B T = \Delta E = hf$, so erhält man $f = 6.25 \text{ ps}^{-1}$ bei $T = 300$ K. Für Bewegungen mit einer charakteristischen Zeit von einigen ps und länger ist eine klassische Beschreibung also möglich. Die Abschätzung zeigt allerdings auch, daß die schnellen Bewegungen eines Systems, die Bindungsstrettschwingungen mit $f \approx 30\text{--}60 \text{ ps}^{-1}$, nicht gut beschrieben werden können. Außerdem werden Bewegungen bei niedrigen Temperaturen nicht richtig wiedergegeben. Da funktionelle Konformationsänderungen von Proteinen in der Regel nicht schneller als einige ps sind, können dynamische Eigenschaften von Proteinen klassisch beschrieben werden.

Integrationsalgorithmen

Gleichung 2.1 ist eine Differentialgleichung 2. Ordnung, die auch durch zwei Differentialgleichungen 1. Ordnung ausgedrückt werden kann:

$$\frac{d\mathbf{v}_i(t)}{dt} = \frac{\mathbf{F}_i(t)}{m_i} \quad (2.2)$$

$$\frac{d\mathbf{r}_i(t)}{dt} = \mathbf{v}_i(t) \quad (2.3)$$

Zur numerischen Integration der Gleichung 2.1 werden die Gleichungen 2.2 und 2.3 bis zur 3. Ordnung nach Taylor entwickelt, woraus man den sogenannten *leap-frog*-Algorithmus [43] erhält:

$$\mathbf{v}_i(t + \Delta t/2) = \mathbf{v}_i(t - \Delta t/2) + \frac{\mathbf{F}_i(t)}{m_i} \Delta t + O(\Delta t^3) \quad (2.4)$$

$$\mathbf{r}_i(t + \Delta t) = \mathbf{r}_i(t) + \mathbf{v}_i(t + \Delta t/2) \Delta t + O(\Delta t^3) \quad (2.5)$$

Dies ist ein sehr stabiler und schneller Algorithmus, der die Gesamtenergie eines konservativen Systems in guter Näherung konstant hält [36], weshalb er in dieser Arbeit zur Simulation einer Modellmembran verwendet wird (Kapitel 7). Ein weiteres für Molekulardynamiksimulationen bewährtes Verfahren ist der Verlet-Algorithmus [43]:

$$\mathbf{r}_i(t + \Delta t) = 2\mathbf{r}_i(t) - \mathbf{r}_i(t - \Delta t) + \frac{\mathbf{F}_i(t)}{m_i} (\Delta t)^2. \quad (2.6)$$

Diesen erhält man durch Eliminierung der Geschwindigkeiten aus den Gleichungen 2.4 und 2.5. Er erzeugt exakt die gleiche Trajektorie wie der *leap-frog*-Algorithmus. Der Verlet-Algorithmus wird von dem hier verwendeten MD-Programm EGO [44] benutzt, da dieser die Implementierung des unten beschriebenen Mehrschrittverfahrens deutlich vereinfacht. Daher wurde dieser Algorithmus bei der MD-Simulation des SNARE-Komplexes und des Farbstoffs verwendet (Kapitel 4).

Die Integrationsschrittweite Δt muß bei beiden Verfahren so gewählt werden, daß sie die schnellsten Bewegungen, in dem hier simulierten System die Bindungsstrettschwingungen der Wasserstoffatome mit einer Periodendauer von etwa 20 Femtosekunden, stabil beschreiben kann. Daher wurde die Schrittweite zu $\Delta t = 1$ fs gewählt.

Die Lösungsumgebung

Bei vielen Molekülen, wie auch bei Proteinen, hat das Lösungsmittel einen entscheidenden Einfluß auf Dynamik und Struktur. Es gibt zwei Möglichkeiten, in MD-Simulationen Lösungsmittelleffekte zu beschreiben: Zum einen kann das Lösungsmittel explizit, also z. B. durch Berücksichtigung einzelner Wassermoleküle in die Simulation miteinbezogen werden; zum anderen

kann es auch implizit durch die Verwendung eines geeigneten Modells — üblicherweise eines Kontinuumsmodells — berücksichtigt werden. Dabei bedeutet eine explizite Beschreibung einen erheblich höheren Rechenaufwand, sie kann die Lösungsmittelleffekte aber am besten wiedergeben.

Es gibt einige Ansätze [45], das Lösungsmittel implizit mit einem Kontinuumsmodell zu beschreiben. Eine sehr einfache Methode, die gegenüber einer Vakuumsimulation keinen höheren Rechenaufwand bedeutet, ist die Berechnung aller elektrostatischen Wechselwirkungen mit der statischen Dielektrizitätskonstanten des Wassers $\epsilon_r \approx 80$. Dabei werden allerdings die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen geladenen Gruppen eines Proteins unterschätzt, da hier die lokale Dielektrizitätskonstante deutlich kleiner ist. Im Innern eines Proteins sind größtenteils hydrophobe, also unpolare und ungeladene Residuen, so daß der größte Effekt bei den polaren und geladenen Seitengruppen an der Oberfläche des Proteins auftreten wird. Noch genauere Kontinuumsmethoden können mit Hilfe der Poisson-Boltzmann-Theorie [46] auch Elektrolyte beschreiben, und auch der hydrophobe Effekt wird in einigen Modellen mitberücksichtigt [45].

Um zusätzlich den Einfluß der Stöße von Wassermolekülen auf die Proteinoberfläche zu beschreiben, können Rausch- und Reibungskräfte eingeführt werden. Dabei sind die beiden Kräfte über das Fluktuations-Dissipations-Theorem miteinander verknüpft, so daß die kinetische Energie erhalten bleibt.

Ein grundsätzlicher Nachteil von Kontinuumsmodellen ist das Fehlen einer Beschreibung von Wasserstoffbrücken mit der Proteinoberfläche, welche die Protein-nahen Wassermoleküle weniger beweglich machen. Daher wird in der vorliegenden Arbeit sowohl ein Kontinuumsmodell als auch eine explizite Beschreibung des Wassers benutzt.

Randbedingungen

Die Wasserumgebung eines Proteins ist in Wirklichkeit so groß, daß es aus Rechenzeitgründen nicht sinnvoll ist, sie vollständig zu beschreiben. Daher müssen Methoden eingeführt werden, die in einem System von etwa 10^3 – 10^4 Wassermolekülen den Einfluß von nicht mehr explizit betrachteten Wassermolekülen außerhalb des Systems beschreiben. Dies wird durch Einführung geeigneter Randbedingungen erreicht.

Abbildung 4.1 zeigt ein Protein in einer expliziten Wasserumgebung. In MD-Simulationen wird üblicherweise eine der beiden folgenden Möglichkeiten zur Beschreibung von Randbedingungen verwendet:

- periodische Randbedingungen
- Einführung eines Randpotentials

Die periodische Randbedingung ist eine elegante Lösung dieses Problems. Das Simulationssystem wird als in alle Richtungen periodisch fortgesetzt betrachtet. Ein Wassermolekül, das das System auf der einen Seite verläßt, wird auf der gegenüberliegenden Seite wieder in das System eingeführt. Der Nachteil besteht darin, daß nur solche Formen der Wasserumgebung zulässig sind, die bei periodischer Fortsetzung den ganzen Raum lückenlos und überlappungsfrei ausfüllen, wie z. B. ein Quader oder ein abgeschnittener Oktaeder.

Wählt man nun eine beliebige, besser an das System angepaßte Wasserumgebung (wie in Abb. 4.1), so können daher keine periodischen Randbedingungen benutzt werden. Werden keine weiteren Maßnahmen ergriffen, treten Artefakte auf. Insbesondere erzeugt die Oberflächenspannung in dem System einen unrealistisch hohen Druck, im Fall eines Wassertropfens mit einem Radius von 50 \AA etwa 300 at. Außerdem können bei 300 K einzelne Wassermoleküle verdampfen, was nicht gewollt ist. Um diesen beiden Effekten entgegenzuwirken, wurde ein Randpotential, wie es in Abbildung 2.2 dargestellt ist, verwendet. Dieses Potential soll einerseits den von der Oberflächenspannung erzeugten Druck neutralisieren (Bereich I), andererseits die Wassermoleküle durch ein am Rand stark ansteigendes Potential am Verdampfen hindern (Bereich II) [47]. Zusätzlich wurden in den Simulationen auf die äußeren Wasserschichten die oben bereits erwähnten Rausch- und Reibungskräfte ausgeübt, die den Einfluß von Stößen des nicht mehr explizit simulierten Wassers außerhalb des Wassertropfens wiedergeben sollen. In Ref. [47] wurde ein Potential mit einer Breite von 7 \AA und einer Tiefe von 1 kcal/mol als geeignet befunden. Der Vorteil eines Randpotentials liegt darin, daß die Wasserumgebung deutlich kleiner gewählt werden kann als bei den periodischen Randbedingungen; deshalb wird in dieser Arbeit das in Abbildung 2.2 dargestellte und in EGO [44] implementierte Randpotential verwendet.

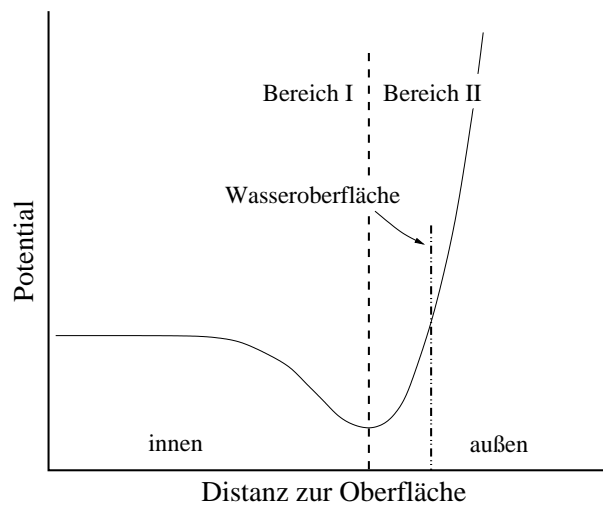


Abbildung 2.2: Hier verwendetes Randpotential.

Effiziente Simulationenmethoden

Gerade durch die explizite Beschreibung der Wassermoleküle werden die Simulationssysteme oft sehr groß; in der Regel gehören etwa 90 % aller Atome zur Wasserumgebung, so daß der Einsatz von effizienten Simulationenmethoden einen enormen Geschwindigkeitsvorteil bringen kann. Die im folgenden beschriebenen, in dem Programm EGO implementierten Methoden beschleunigen die Berechnung einer Trajektorie von ca. 50.000 Atomen etwa um einen Faktor 500.

- *SHAKE*-Algorithmus: Wie oben beschrieben, bestimmen die schnellsten Freiheitsgrade die Wahl der Integrations-schrittweite. Fixiert man nun die Bindungsabstände der Wasserstoffatome zu den schwereren Atomen mit dem sogenannten *SHAKE*-Algorithmus [48], so läßt sich die Integrations-schrittweite größer wählen. Dies reduziert die Rechenzeit etwa um den Faktor zwei.
- „*Compound*-Atome“: Es hat sich gezeigt, daß die Dynamik der unpolaren Wasserstoffatome keinen großen Einfluß auf die Struktur und Dynamik eines Proteins haben [37], daher faßt man z. B. die Atomgruppen C-H oder H-C-H zu einem *Compound*-Atom mit der Gesamtmasse, angepaßter Partialladung und Van der Waals-Radius, zusammen.

- Mehrschrittverfahren (MTS): Die verschiedenen Kräfte, die auf ein Atom wirken, ändern sich unterschiedlich schnell. Bindungsstreckkräfte ändern sich zum Beispiel sehr schnell, während sich Coulombwechselwirkungen zwischen weit entfernten Atomen nur langsam ändern, d. h. die Änderungen sind auf der gleichen Zeitskala kleiner als bei den lokalen Wechselwirkungen. Daher werden die langsam veränderlichen Kräfte nur alle k Integrationsschritte neu berechnet und zwischendurch aus den zuvor berechneten extrapoliert. Darüber hinaus lassen sich nun die Kräfte in bestimmte Entfernungsklassen einteilen, so daß die näheren Wechselwirkungskräfte in fast jedem Schritt und die weit entfernten nur in jedem 2., 4., 8., 16., etc. Schritt neu berechnet werden [49].
- Multipolmethode: Der Rechenaufwand für die langreichweitigen Coulombkräfte, bei denen jedes Atom mit jedem anderen Atom wechselwirkt, skaliert quadratisch mit der Anzahl N der Atome ($O(N^2)$). Die Berechnung der elektrostatischen Energien und Kräfte ist also der rechenintensivste Teil bei einer MD-Simulation. Häufig werden daher die Wechselwirkungen mit Atomen, die weiter entfernt sind als ein sogenannter *cut-off-Radius*, einfach vernachlässigt. Dann skaliert die Rechenzeit für diese Kräfte linear mit N ($O(N)$). Das führt allerdings zu teilweise erheblichen Ungenauigkeiten und Artefakten [50]. Bei den Van der Waals-Wechselwirkungen ist das Verfahren jedoch deutlich besser, da deren Reichweite sehr viel kürzer ist. Eine andere Möglichkeit wurde von Greengard und Rokhlin vorgeschlagen [51]. Dabei werden Gruppen von Atomen gebildet, und anschließend wird die Multipolentwicklung dieser Gruppen berechnet. Diese Gruppen werden wieder zu Gruppen zusammengefaßt, und es wird ebenfalls eine Multipolentwicklung durchgeführt, bei der man jetzt die Multipolmomente der untergeordneten Gruppen benutzt. Diese sogenannte *fast multipole method (FMM)* skaliert dann für große Systeme ebenfalls linear mit N ($O(N)$). In dem Programm EGO wurde diese Methode erweitert, indem Atome strukturabhängig so zu Gruppen zusammengefaßt werden [*structure adapted multipole method (SAMM)*], daß

die Multipolentwicklung bereits nach dem ersten nichtverschwindenden Glied abgebrochen werden kann [52]. Schließlich wurde diese so modifizierte Multipolmethode mit dem Mehrschrittverfahren kombiniert, so daß Regelmäßigkeiten sowohl in der Zeit (MTS), als auch im Ort (SMM) berücksichtigt werden können [50].

- Parallelisierung: Dabei wird die Rechnung auf mehrere Prozessoren aufgeteilt, so daß viele Berechnungen gleichzeitig durchgeführt werden können [53].

Kapitel 3

Das verwendete Kraftfeld

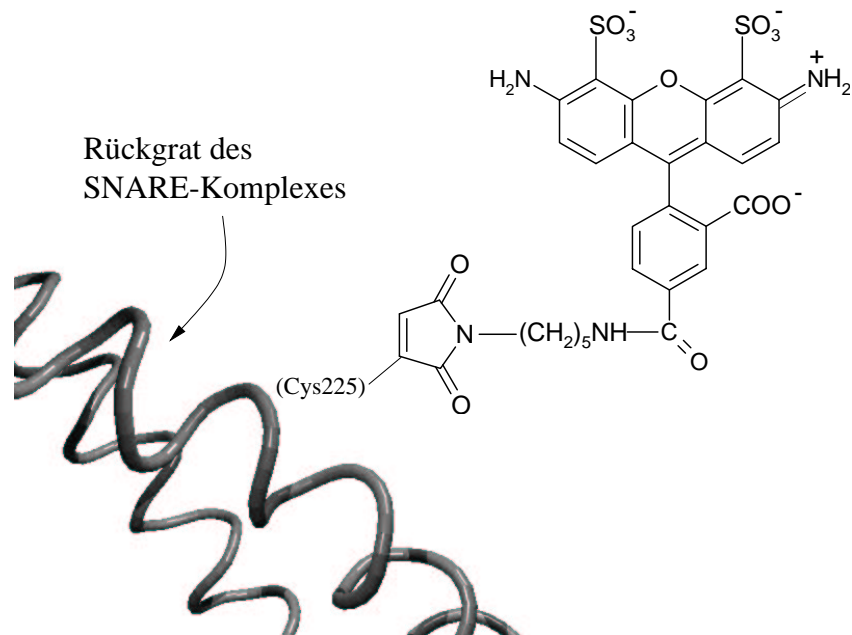


Abbildung 3.1: Der Farbstoff Alexa488 ist kovalent an ein Cystein des Proteins gebunden.

In der vorliegenden Arbeit soll ein an ein Protein gebundener Farbstoff (Alexa488 C₅ maleimid, *Molecular Probes*, vgl. Abb. 3.1) in einer Wasserumgebung simuliert werden. Zur Beschreibung von Proteinen sind bereits, wie in Kapitel 2 beschrieben, viele Kraftfelder entwickelt worden. Für die

vorliegende Arbeit wurde das CHARMM-Kraftfeld [37] benutzt, da es bereits effizient in das hier verwendete Programm EGO implementiert ist. Die für die MD-Simulation benötigten, in Kapitel 2 beschriebenen Parameter — wie etwa Partiaalladungen oder Van der Waals-Radien — wurden für die Proteinatome der auf CHARMM basierenden Parameterbibliothek von XPLORE [54] entnommen. In dieser Parametrisierung werden die polaren Wasserstoffatome explizit behandelt, während alle nicht-polaren Wasserstoffe über *Compound*-Atome implizit berücksichtigt werden (vgl. Kapitel 2). Wassermoleküle werden hier durch das TIP3P-Modell [55] beschrieben, das für die hier wichtigen Protein-Wasser-Wechselwirkungen optimiert wurde. Für den Farbstoff war kein Kraftfeld verfügbar, so daß dieses neu entwickelt werden musste. Dabei ist zu unterscheiden zwischen der Beschreibung chemischer Bindungen wie der kovalenten Bindung, Bindungs-, Dihedral- und Extraplanarwinkel einerseits und der nicht-kovalenten elektrostatischen und Van der Waals-Wechselwirkungen andererseits.

Beschreibung der chemischen Bindungen

Die chemischen Bindungen bestimmen im wesentlichen die internen Schwingungen des Farbstoffs und die Flexibilität des Linkers. Erstere sind für die Untersuchung der Beweglichkeit des Farbstoffmoleküls in der Proteinumgebung nicht wichtig, die Flexibilität des Linkers allerdings schon. Bei Kraftfeldern (vgl. Abb. 2.1) wird die grundlegende Annahme gemacht, daß die Eigenschaften von kovalenten Bindungen lokal sind, also nur wenig von den angrenzenden Bindungen und Atomen beeinflußt werden. Das ist im allgemeinen eine gute Näherung. Daher wurde das Kraftfeld des Linkers aus chemisch ähnlichen Fragmenten in Aminosäuren des CHARMM-Kraftfeldes entnommen. Die Lokalisierungsannahme gilt jedoch nicht für das konjugierte Elektronensystem des Farbstoffs. Da eine sehr genaue Beschreibung der chemischen Bindungen hier allerdings auch nicht notwendig ist, wurde sie ebenfalls aus dem CHARMM-Kraftfeld abgeleitet. Diese sollte die Steifigkeit des Farbstoffs hinreichend gut wiedergeben, wobei hochfrequente Schwingungen jedoch sicherlich nicht zuverlässig beschrieben werden.

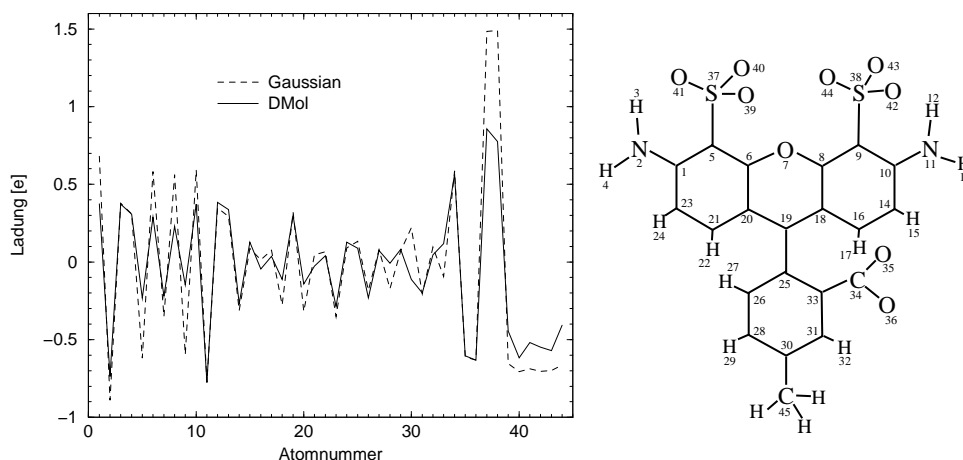


Abbildung 3.2: Links die Ladungsverteilung im Grundzustand aus den Berechnungen mit *DMol* und *Gaussian* und rechts der in den quantenchemischen Rechnungen verwendete Teil des Farbstoffs.

Van-der-Waals-Radien

Die Van der Waals-Radien der Atome hängen nur wenig von der chemischen Umgebung ab und wurden daher direkt dem CHARMM-Kraftfeld entnommen.

Partialladungen

Die Elektrostatik ist als langreichweitige Wechselwirkung hauptverantwortlich für die Wechselwirkung des Farbstoffs mit dem Protein. Die Dynamik des Farbstoffs hängt somit empfindlich von der Elektrostatik ab, so daß der Berechnung der Partielladungen besondere Beachtung geschenkt wurde. Der Linker besitzt keine konjugierten Elektronensysteme, und seine chemische Struktur ist Fragmenten von Aminosäuren sehr ähnlich. Daher konnte man hier wieder auf das CHARMM-Kraftfeld zurückgreifen und die dort verwendeten Partielladungen für den Linker benutzen.

Der Farbstoff selbst besitzt demgegenüber ein ausgedehntes π -Elektronensystem, daher war eine Berechnung mit Hilfe quantenchemischer Rechnungen notwendig. Dazu wurden hier *ab-initio*-, Dichtefunktional (DFT)- und semiempirische Methoden benutzt. In Abbildung 3.2 ist der Teil des Farbstoffs dargestellt, der in der Partielladungsberechnung verwendet wurde. Als zusätzliche Komplikation muß berücksichtigt werden, daß bei Fluor-

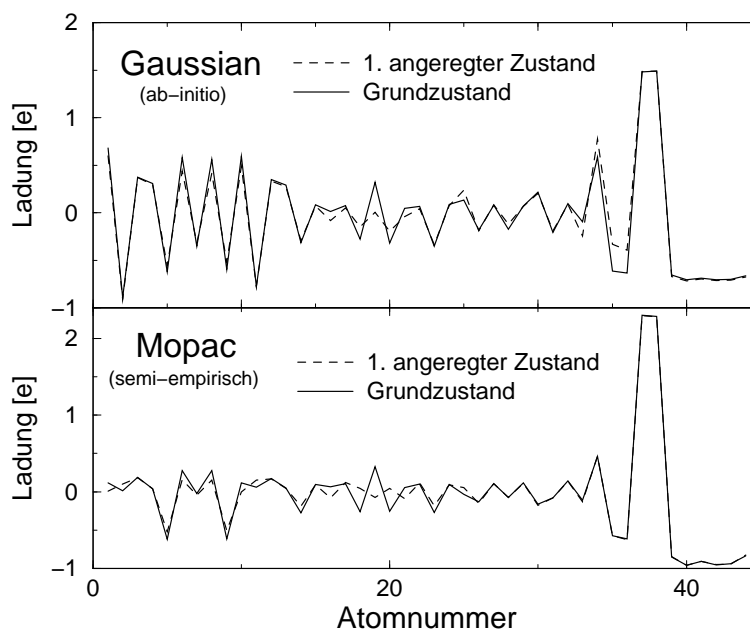


Abbildung 3.3: Ladungsverteilung im angeregten Zustand.

reszenzanisotropiemessungen die Dynamik des *angeregten* Farbstoffs beobachtet wird. Angeregte Zustände können prinzipiell am genauesten mit *ab-initio*-Methoden berechnet werden.

Das Problem dabei ist, daß der Farbstoff recht groß ist und daher nur einfache Basissätze (wie hier der STO-3G Basissatz) verwendet werden können. DFT-Methoden können zwar größere Systeme besser beschreiben, allerdings keine angeregten Zustände berechnen. Nun beschreiben *ab-initio*- und semiempirische Methoden Differenzen zwischen Grund- und angeregtem Zustand wesentlich genauer als die absoluten Ladungen. Daher wurde der Grundzustand mit einem DFT-Programm berechnet und dazu die mit *ab-initio*- und semiempirischen Methoden berechneten Differenzen zwischen Grund- und angeregtem Zustand addiert. Entsprechend wurde wie folgt vorgegangen:

1. Zunächst wurde mit dem Programm *DMol* (DFT) [56] die Ladungsverteilung im Grundzustand mit der DNP-Basis und dem BLYP-Funktional berechnet (vgl. Abb. 3.2)

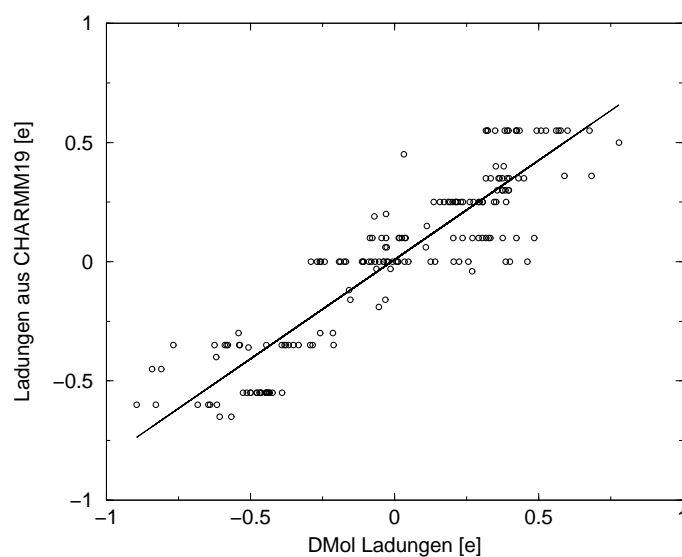


Abbildung 3.4: Die Partialladungen der Atome der 20 Aminosäuren sind über die hier mit *DMol* berechneten Ladungen aufgetragen.

2. Mit *Gaussian (ab-initio)* [57] (Basissatz STO-3G) und *Mopac* (semiempirisch) [58] (PM3 Hamiltonoperator) wurden dann der Grundzustand sowie der angeregte Zustand berechnet (vgl. Abb. 3.3).
3. Die Mittelwerte der Differenzen zwischen Grund- und angeregtem Zustand aus 2 wurden zu der Ladungsverteilung in 1 addiert.
4. Da die so erhaltene Ladungsverteilung nicht symmetrisch ist, die zeitlich gemittelte Ladungsverteilung eines symmetrischen Moleküls es aber sicherlich ist, wurden die Ladungen symmetrisiert, so daß z. B. die Atome 1 und 10 die gleiche Ladung tragen.

Aus der von diesen Programmen berechneten Elektronendichte wurden die benötigten Partialladungen so bestimmt, daß sie das elektrostatische Potential der Elektronendichte möglichst gut wiedergeben (ESP, [59]). Diese ESP-Ladungen sind für die Verwendung in klassischen Kraftfeldern daher besonders gut geeignet [56].

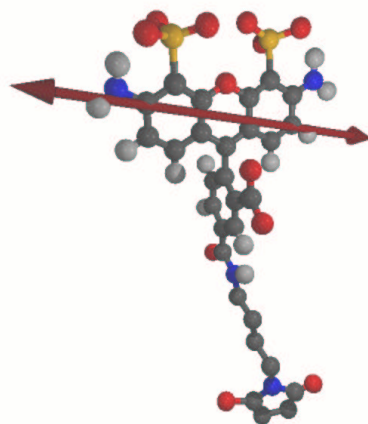


Abbildung 3.5: Übergangsdipolmoment des Farbstoffs Alexa488.

Ladungsskalierung

Berechnet man nun die Ladungen aller 20 Aminosäuren mit *DMol* (ebenfalls mit DNP-Basis und BLYP-Funktional) und vergleicht diese mit den in CHARMM verwendeten, so zeigt sich eine deutliche Abweichung (vgl. Abb.3.4). Der Grund dafür ist, daß die elektrische Polarisierbarkeit im CHARMM-Kraftfeld lediglich implizit durch geeignete Skalierung der Ladungen beschrieben wird. Das ist notwendig, da sich gezeigt hat, daß bei direkter Verwendung der so bestimmten Ladungen einige Observablen, wie z. B. die freie Energie, nicht richtig wiedergegeben werden und daß bereits durch eine Skalierung der Ladungen eine Verbesserung erzielt werden kann [60, 61]. Um eine mit den CHARMM-Ladungen konsistente Ladungsverteilung des Farbstoffs zu erhalten, wurden daher auch die Partialladungen des Farbstoffs mit diesem Faktor skaliert. Der Skalierungsfaktor wurde aus der Auftragung zu 0.83 bestimmt.

Aus der *Gaussian*-Berechnung des angeregten Zustands erhält man auch das Übergangsdipolmoment zwischen dem Grund- und dem ersten angeregten Zustand, dessen Richtung in Abbildung 3.5 in die Struktur des gesamten Farbstoffs eingezeichnet ist und in Kapitel 6 eine wichtige Rolle spielen wird.

Kapitel 4

Konformationsflexibilität des Farbstoffs

Bei der Messung der Anisotropie im Experiment liegt das Protein/Farbstoff-System in einem Gleichgewichtszustand bei etwa 300 K vor. Um die Anisotropie analog zum Experiment aus MD-Simulationen zu bestimmen, muß also zunächst dieser Gleichgewichtszustand bestimmt werden. Für den SNARE-Komplex liegt eine Kristallstruktur vor, von der wir hier annehmen, daß sie bereits nahe der Gleichgewichtskonformation ist, so daß diese durch eine MD-Simulation gefunden werden kann. Für den Farbstoff existiert diese Information nicht, daher müssen die möglichen Konformationen des Farbstoffs erst noch bestimmt werden. Dazu wird hier zunächst von einer willkürlich gewählten Konformation ausgegangen, um dann durch eine MD-Simulation eine nahegelegene, energetisch günstige Konformation zu finden. Es werden dann Methoden vorgestellt, um darüber hinaus weitere Konformationen zu finden, die aufgrund von hohen Energiebarrieren nicht durch eine MD-Simulation von einigen Nanosekunden gefunden werden können.

4.1 Konstruktion des Simulationssystems

Zunächst soll das Simulationssystem beschrieben werden, mit dem sowohl der Gleichgewichtszustand des Proteins als auch eine erste günstige Konformation des Farbstoffs gefunden werden soll. Dieses Simulationssystem ist

in Abbildung 4.1 dargestellt. Ausgangspunkt für die Modellierung dieses Systems ist die Kristallstruktur des SNARE-Komplexes [6], die in der *Protein Data Bank* [62] veröffentlicht und hier in grün dargestellt ist. Dieser Komplex besteht aus den Residuen Gly180–Arg262 (Sx) von Syntaxin 1A, Met1–Met96 (Sb) von Synaptobrevin-II und die N- und C-terminalen Teile des Proteins SNAP-25B mit den Residuen Met1–Lys83 (Sn1) und Val120–Gly206 (Sn2). Die Residuen zwischen den beiden Teilen Sn1 und Sn2 sind flexibel und deshalb vor der Kristallisation des Komplexes abgeschnitten worden, also in der Röntgenstruktur nicht vorhanden. Die in Abbildung 1.3 schematisch gezeigten Transmembranregionen der Proteine Syntaxin und Synaptobrevin sind ebenfalls strukturell nicht charakterisiert. Die Fluoreszenzexperimente sollen aber ohnehin nur mit diesem Teil des Komplexes durchgeführt werden, so daß die Struktur der fehlenden Abschnitte nicht benötigt wird.

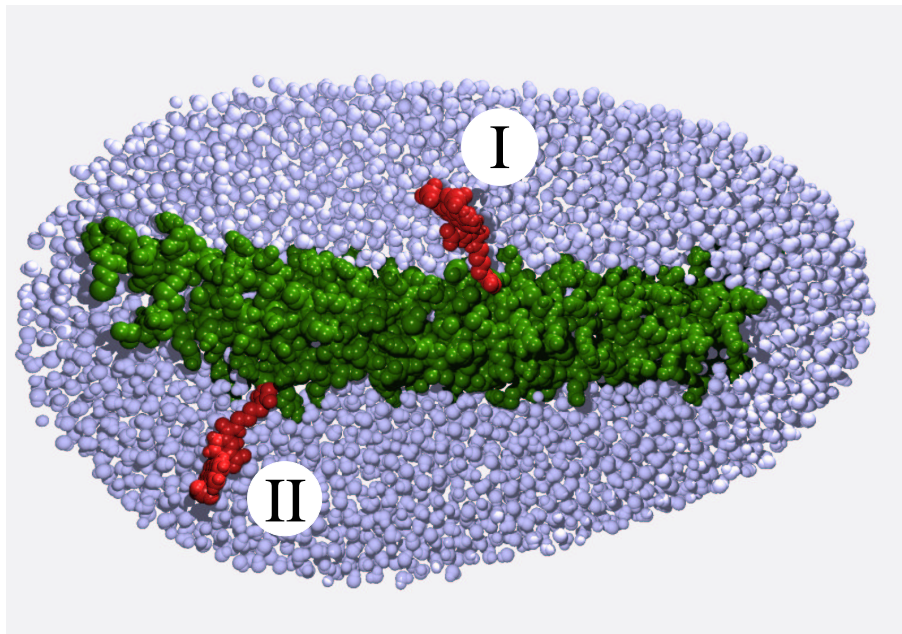


Abbildung 4.1: Das hier verwendete Simulationssystem: Die Kristallstruktur des SNARE-Komplexes (grün) und zwei an das Protein gebundene Farbstoffe (rot) sind von Wassermolekülen (blau) umgeben. Diese Arbeit konzentriert sich auf die Untersuchung des Farbstoffs I.

An den Komplex sind zwei Farbstoffe an im Protein mutierte Cysteine kovalent gebunden: Farbstoff I an Syntaxin, Position 225 und Farbstoff II an Synaptobrevin, Position 28. Dabei wurden zwei Farbstoffe modelliert, um auch FRET (*fluorescence resonance energy transfer*)-Experimente simulieren zu können, die in dieser Arbeit allerdings nicht beschrieben werden. Im weiteren Verlauf werden daher nur die Dynamik und Konformationen des Farbstoffs I betrachtet. *In vivo* und *in vitro* befindet sich der SNARE-Komplex in wässriger Lösung mit physiologischer Salzkonzentration. Entsprechend wurde im Simulationssystem das Protein und der Farbstoff mit expliziten Wassermolekülen und Ionen (Na^+ und Cl^-) umgeben. Diese wurden mit dem Programm SOLVATE [63] plaziert, welches eine lokale Energieminimierung der Wassermoleküle durchführt und anschließend die Ionen in physiologischer Konzentration gemäß der Debye-Hückel-Verteilung [64] hinzufügt, die von der Ladungsverteilung des Proteins und des Farbstoffs abhängt. Die Form der Wasserhülle wurde dabei so gewählt, daß sowohl Proteine als auch Farbstoffe stets einen Mindestabstand von etwa 10 Å vom Rand der Wasserhülle haben, um Oberflächenartefakte zu vermeiden. In allen MD-Simulationen wurde das in Kapitel 3 beschriebene Kraftfeld benutzt.

4.1.1 Minimierung und Equilibrierung

Eine Energieminimierung dient dazu, Verspannungen im System, wie deformierte Bindungs- oder Dihedralwinkel, die oft bei Röntgenstrukturen und auch bei der Platzierung der Wassermoleküle auftreten, vorsichtig zu lösen. Dadurch wird vermieden, daß das System aus einer anfänglich höchst instabilen, energetisch ungünstigen Konformation in eine sehr unrealistische, weit von der Ausgangsstruktur entfernte Konformation getrieben wird. Selbst eine geringfügige Überlappung von Atomen kann zu hohen Van der Waals-Kräften führen und so das System destabilisieren. Diese Minimierung wurde so durchgeführt, daß die Bewegung der einzelnen Atome über einen Reibungsfaktor sehr stark gedämpft und die maximale Bewegung pro Integrationsschritt begrenzt wurde. Auf diese Weise wurde ein Gradientenabstieg realisiert. Das System wurde dann als minimiert betrachtet, als sich der Gradient unter einem Wert von 1 kcal/(mol·Å) stabilisierte.

Da das System bei der gleichen Temperatur wie im Experiment simuliert werden soll, wird es nun equilibriert, d. h. durch Kopplung an ein Wärmebad auf eine Temperatur von 300 K gebracht. Diese Kopplung wird dadurch erreicht, daß die Geschwindigkeiten der Atome in jedem Integrationsschritt so reskaliert werden, daß die Zieltemperatur mit einer bestimmten Zeitkonstante erreicht wird. Diese Zeitkonstante, die durch die Wärmeleitfähigkeit des Wassers bestimmt ist, wurde hier zu 10 ps^{-1} gewählt. Ziel der Equilibrierung ist es, die Gesamtenergie des Systems gleichmäßig auf alle Freiheitsgrade zu verteilen.

Wie oben schon erwähnt, sollen in dieser ersten Simulation die Gleichgewichtskonformationen des Proteins und des Farbstoffs gefunden werden. Zuerst betrachten wir die Konformation des Proteins.

Equilibrierung des Proteins

Zunächst muß angemerkt werden, daß es in Proteinen Relaxationsprozesse gibt, die weit langsamer sind als die Simulationszeitskala einiger Nanosekunden, so daß man nicht erwarten kann, den Gleichgewichtszustand des Proteins mit allen seinen Konformationen vollständig beschreiben zu können. Wir fassen also das Protein dann als lokal equilibriert auf, wenn es sich auf der Simulationszeitskala als stabil (ggf. metastabil) erweist. Wir müssen dann annehmen, daß das vom Protein erzeugte Potential, in dem sich der Farbstoff bewegt, hinreichend gut durch die so gefundene equilibrierte Struktur des Proteins beschrieben wird. Diese Annahme wird dadurch gestützt, daß eine wohldefinierte Kristallstruktur vermessen werden konnte. Um die während der Equilibrierung auftretenden Konformationsänderungen des Proteins quantitativ erfassen und bewerten zu können, wurde hier die mittlere quadratische Abweichung (rmsd¹) der durch die MD-Simulation gelieferten Strukturen von der Kristallstruktur berechnet. Diese ist definiert als

$$\text{rmsd} = \min_{\{\mathbf{T}, \mathbf{R}\}} \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (\mathbf{T} \cdot \mathbf{R} \cdot \mathbf{x}_i - \mathbf{x}_i^0)^2} \quad . \quad (4.1)$$

Dabei sind \mathbf{x}_i bzw. \mathbf{x}_i^0 die kartesischen Koordinaten der N Atome der gegebenen Struktur bzw. der Kristallstruktur, die in die rmsd-Berechnung mit

¹rmsd steht für root mean square deviation.

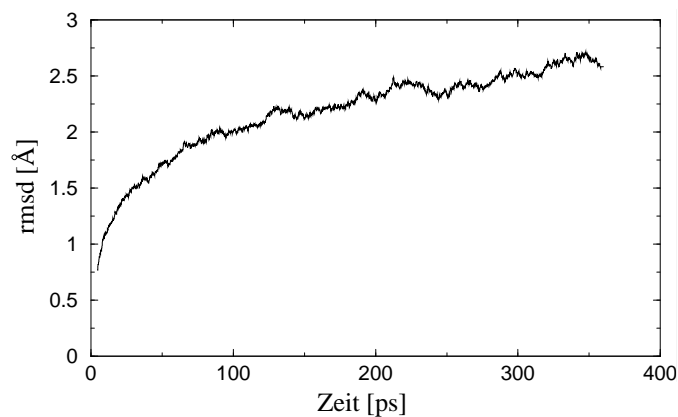


Abbildung 4.2: Verlauf der mittleren quadratischen Abweichung der Proteinstrukturen von der Kristallstruktur während der Equilibrierung.

einbezogen wurde, $\{\mathbf{T}, \mathbf{R}\}$ bezeichnet die Menge aller Translations- und Rotationsmatrizen. Die rmsd-Werte der Equilibrierungstrajektorie des Proteins in bezug auf die Kristallstruktur sind in Abbildung 4.2 dargestellt.

Der Verlauf des rmsd von der Kristallstruktur zeigt in den ersten 100 ps einen steilen Anstieg, der dann immer flacher wird. Dieser Verlauf zeigt die Relaxation des Proteins in einen oben definierten metastabilen Zustand. Bei weiterer Equilibrierung zeigte sich allerdings, daß der SNARE-Komplex in dem Bereich des Farbstoffs II (siehe Abb. 4.1) instabil wurde, was an einem Anstieg des rmsd-Wertes zu erkennen war. Da bei von Kollegen durchgeführten Simulationen von einigen Nanosekunden dieses Proteins ohne die Farbstoffe diese Instabilität nicht beobachtet wurde [citeGroot00](#), vermuten wir, daß der Einfluß des Farbstoffs II destabilisierend auf die Proteinstruktur wirkt. Da wir aber eine equilibrierte Struktur finden wollen, die nahe der Kristallstruktur liegt, betrachten wir diese nach 400 ps erhaltene Struktur als eine metastabile Konformation des Proteins. Das Potential, in dem sich der Farbstoff im Experiment bewegt, sollte nun durch diese Proteinstruktur hinreichend gut wiedergegeben werden.

Equilibrierung des Farbstoffs

Da beim Farbstoff im Gegensatz zum Protein keine Konformation vorgegeben ist, soll nun untersucht werden, wie sich der Farbstoff auf der Oberfläche

des SNARE-Komplexes bewegen kann, d. h. welche Konformationen er vorzugsweise einnehmen wird. Der Farbstoff ist in einer willkürlichen Konformation modelliert worden, ist also möglicherweise noch weit vom Gleichgewicht entfernt.

Nach 3 ns Equilibrierung läßt sich folgende Beobachtung machen: Durch Überlagerung der Strukturen des Farbstoffs aus der Simulation erhält man einen Cluster von Konformationen, wie er in Abbildung 4.3 abgebildet ist. Diese zeigt die Strukturen des Farbstoffs (rot) zwischen der zweiten und dritten Nanosekunde. In der Abbildung ist in grau ein Schnappschuß der Proteinstruktur zu sehen, wobei die Wassermoleküle aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht abgebildet sind; sie wurden aber in der Simulation explizit mitberechnet. Vergleicht man diesen Cluster mit dem aus der vorhergehenden 1ns-Trajektorie (erste bis zweite Nanosekunde), so stellt man fest, daß diese beiden Cluster sich nicht wesentlich unterscheiden. Das bedeutet also, daß der von der zweiten bis zur dritten Nanosekunde besuchte Konformationsraum sich nicht von dem bisher besuchten unterscheidet. Der Farbstoff hat also eine für ihn günstige Konformation, ein lokales Energieminimum gefunden.

In Abbildung 4.3 fällt auf, daß der Cluster, den der Farbstoff bildet, recht lokalisiert ist. Es stellt sich nun die Frage, warum der Farbstoff nicht weitere Gebiete seines Konformationsraumes besucht. Es liegt daher die Vermutung nahe, daß Energiebarrieren ihn daran hindern. Über die Höhe und Breite der Barrieren und die Energielandschaft hinter diesen Barrieren läßt sich hier jedoch keine Aussage machen. Es läßt sich deshalb nicht abschätzen, wieviel Zeit gebraucht wird, um die Energiebarrieren zu überqueren. Ein Übergang könnte auch so lange dauern, daß er auf einer durch MD-Simulationen zugänglichen Zeitskala von einigen Nanosekunden nicht zu beobachten ist. Dieses Problem wird *Sampling*-Problem genannt und tritt sehr häufig bei MD-Simulationen auf.

Für die später beschriebene Anisotropiebestimmung analog zum Experiment muß von einem Ensemble der Konformationen des Farbstoffs im Gleichgewicht ausgegangen werden. Um dieses Gleichgewicht zu beschreiben, müssen aber alle dem Farbstoff — auf welchen Zeitskalen auch immer — zugänglichen Konformationen gefunden werden. Diesem Zweck soll der

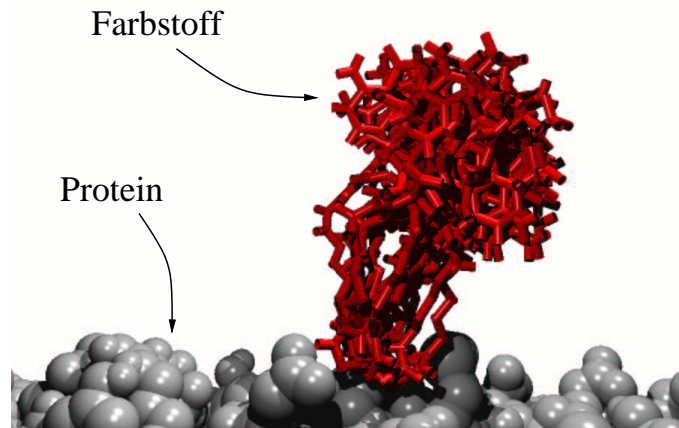


Abbildung 4.3: Strukturenssemble des Farbstoffs aus einer 3.5ns-Trajektorie. Verschiedene Konformationen des Farbstoffs sind hier übereinandergelegt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden keine Wassermoleküle eingezeichnet, die in der Simulation aber explizit mitgerechnet wurden.

folgende hierarchische Ansatz dienen.

4.2 Hierarchische Konformationssuche

Wir gehen in drei Schritten vor. Die Idee dabei ist, schrittweise von einer groben, aber effizienten zu einer genaueren, aber aufwendigeren Beschreibung überzugehen und dabei die zuvor gewonnenen Informationen zu nutzen. Dazu wird im ersten Schritt der Farbstoff nur durch wenige Freiheitsgrade in einem mittleren, durch das Protein verursachten Potential beschrieben. Diese drastische Reduzierung der Freiheitsgrade macht ein systematisches Abtasten des Konformationsraumes mit vertretbarem Rechenaufwand möglich und vermeidet so das *sampling*-Problem. Im zweiten Schritt werden *alle* Freiheitsgrade des Farbstoffs berücksichtigt, die Wechselwirkung zwischen Protein und Farbstoff jedoch in einer *Mean-field*-Näherung beschrieben. Diese Vereinfachung gestattet es, viele MD-Simulationen mit zufällig gewählten Ausgangskonformationen durchzuführen, so daß auch hier verschiedene Energieminima gefunden werden sollten. Die in den beiden ersten Schritten gefundenen Konformationen sollen dann als Ausgangskonformationen für

detaillierte Simulationen mit expliziter Wasserumgebung dienen, um alle gefundenen Konformationen genau zu charakterisieren. Es wird dabei angenommen, daß die gröberen Beschreibungen die Lage der Energieminima nur so weit verschieben, daß sie noch im Einzugsbereich der nachfolgenden detaillierten Simulationen liegen.

Dieser hierarchische Ansatz in drei Schritten sieht also wie folgt aus:

1. vollständige Konformationssuche (Abschnitt 4.2.2)
2. MD-Simulationen mit Kontinuumsmodell aus verschiedenen Anfangskonformationen (Abschnitt 4.2.3)
3. MD-Simulationen mit explizitem Lösungsmittel, mit den in 1. und 2. gefundenen Clustern als Anfangskonformationen (Abschnitt 4.2.5)

Schritt 1 und Schritt 2 verwenden zwei Näherungen, die in der Verwendung eines *Mean-field*-Ansatzes und in der teilweisen Vereinfachung der Elektrostatik bestehen, um die Rechenzeit gegenüber dem Simulationssystem aus Abbildung 4.1 um etwa einen Faktor 100 zu verkürzen. Diese werden in dem folgenden Abschnitt beschrieben.

4.2.1 *Mean-field*-Beschreibung

Am Ort des Farbstoffs erzeugen die fluktuierenden Ladungen des Proteins ein elektrisches Feld. Hier soll nun dieses Feld, das der Farbstoff spürt, durch eine *Mean-field*-Näherung ersetzt werden. Der Farbstoff soll also in einem mittleren Potential beschrieben werden. Das mittlere vom Protein erzeugte Feld haben wir durch die Verwendung einer mittleren Struktur des Proteins beschrieben, die durch Mittelung über ein 160 ps langes Teilstück der Equilibrierungssimulation berechnet wurde. Das Wasser beeinflusst die elektrostatische Wechselwirkung zwischen Ladungen des Farbstoffs und des Proteins durch eine Abschirmung der Ladungen. Der mittlere Einfluß des Wassers soll nun durch die Einführung eines Kontinuumsmodells beschrieben werden. Dieses besteht in der Verwendung der Dielektrizitätskonstanten des Wassers $\epsilon \approx 80$ in der Coulombwechselwirkung. Da sich zwischen Farbstoff und Protein meist Lösungsmittel befindet und dadurch eine effektive Abschirmung der Partiaalladungen von Protein und Farbstoff untereinander

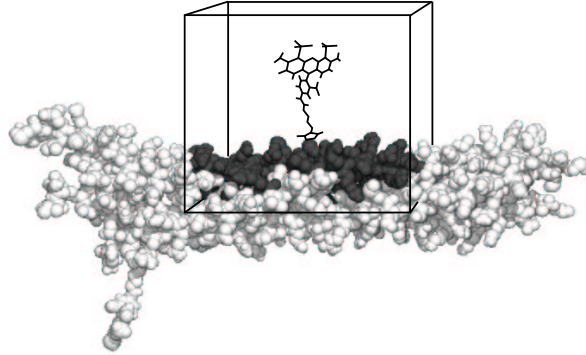


Abbildung 4.4: Die elektrostatische Wechselwirkung der hellgrau dargestellten Atome mit dem Farbstoff wird mit Hilfe eines Gitters beschrieben, das hier durch den Quader angedeutet ist. Die Elektrostatik der dunkelgrauen Atome wird jedoch explizit berechnet.

gegeben ist, sollte dieses einfache Modell bereits eine hinreichend gute Beschreibung der mittleren elektrostatischen Wechselwirkung liefern. Durch diese implizite Beschreibung des Wassers wurde das System von 56302 auf 3145 Atome reduziert.

Die räumlichen Schwankungen des durch weit entfernte Ladungen verursachten Potentials sind schwächer als die Schwankungen des Potentials, durch nahe Ladungen verursacht wird. Diese Tatsache erlaubt es, das von den in Abbildung 4.4 hellgrau dargestellten, weiter als ca. 20 Å vom Farbstoff entfernten Proteinatomen erzeugte Potential auf einem Gitter zu diskretisieren. Um nun die elektrostatische Energie einer Ladung an einem beliebigen Punkt berechnen zu können, muß zwischen den Gitterpunkten geeignet interpoliert werden. Dafür wird ein in Abbildung 4.5 für den eindimensionalen Fall dargestelltes Verfahren verwendet. Die Abbildung zeigt, daß die Summe von äquidistanten Gaußfunktionen eine von ihrer Höhe abhängige glatte Kurve erzeugt, die zur Interpolation zwischen den Gitterpunkten benutzt werden kann. Das bedeutet, daß das durch die Ladungen des Proteins vorgegebene exakte Potential $V(\mathbf{x})$ durch die Summe von Gaußfunktionen auf Gitterpunkten approximiert wird:

$$V(\mathbf{x}) = \sum_i \frac{q_i}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r|\mathbf{x} - \mathbf{x}_i|} \approx \tilde{V}(\mathbf{x}) := \sum_{\text{Gitterpunkte } j} A_j e^{-\frac{|\mathbf{x}_j - \mathbf{x}|^2}{2\sigma^2}} \quad . \quad (4.2)$$

Dabei ist q_i die Partialladung und \mathbf{x}_i der Ort des Proteinatoms i , ϵ_r die Dielektrizitätskonstante des Wassers, \mathbf{x}_j der Ort des j -ten Gitterpunkts, σ die Breite der Gaußfunktionen und A_j die Höhe der Gaußfunktion am Gitterpunkt j , die so gewählt werden muß, daß

$$\sum_i \left(V(\mathbf{x}_i) - \tilde{V}(\mathbf{x}_i) \right)^2 \stackrel{!}{=} \text{Min} \quad . \quad (4.3)$$

Dabei bestimmt die Breite der Gaußfunktionen zum einen die Stärke der räumlichen Schwankung des Potentials, die noch durch dieses Interpolationsverfahren beschrieben werden kann. Zum anderen ist das resultierende Potential umso glatter, je breiter die Gaußfunktionen sind. Außerdem hängt die Wahl der Breite von dem Abstand der Gitterpunkte ab. Der hier für die Breite gewählte Wert von $\sigma = 1.13 \text{ \AA}$ bei einem Gitterabstand von 1 \AA stellt also einen Kompromiß zwischen der Glattheit des Potentials und der Beschreibbarkeit von schnellen Schwankungen dar. Die Berechnung des durch die Gaußfunktionen genäherten Potentials $\tilde{V}(\mathbf{x})$ in Gleichung 4.2 kann nun noch vereinfacht werden, indem die Summation nur über Gaußfunktionen zu solchen Gitterpunkten ausgeführt wird, die innerhalb eines Radius von in diesem Fall $R=4 \text{ \AA}$ liegen. Dies ist erlaubt, da die Beiträge von weiter entfernten Gaußfunktionen zu vernachlässigen sind. So braucht nicht über das ganze Gitter (ca. 95.000 Punkte), sondern nur über einen Teil (ca. 260 Punkte) summiert zu werden. Dieses Gittermodell wurde in das MD-Programm EGO implementiert und verkleinerte das System weiter von 3145 auf 505 Atome. Die Wechselwirkungen der in Abbildung 4.4 dunkelgrau dargestellten Atome mit dem Farbstoff wurde jedoch weiterhin paarweise ausgewertet.

In den beiden folgenden Abschnitten werden die ersten beiden Schritte des gewählten hierarchischen Ansatzes beschrieben.

4.2.2 Schritt 1: Vollständige Konformationssuche

Hier soll der Farbstoff durch nur fünf Freiheitsgrade unter Verwendung der beiden oben dargestellten Näherungen (*Mean-field*-Näherung und Gittermodell) beschrieben werden. Ein so niedrigdimensionaler Konformationsraum läßt sich *vollständig* absuchen, das heißt, es läßt sich für eine vorgegebene Anzahl von Punkten im Konformationsraum die Energie des Farbstoffs

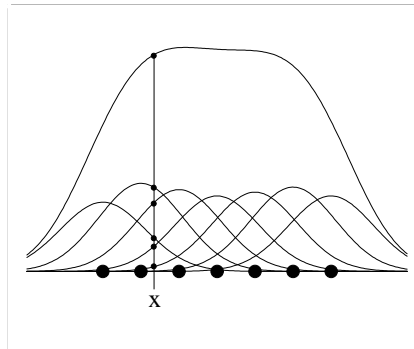


Abbildung 4.5: Interpolation durch Summation über Gaußfunktionen. Erklärung siehe Text.

im vom Protein verursachten Potential berechnen. Damit läßt sich das oben beschriebene *Sampling* -Problem umgehen.

Die Wahl der wesentlichen Freiheitsgrade wird durch Abbildung 4.6 motiviert: Dabei kann man sich das gesamte Farbstoffmolekül aus zwei Teilen zusammengesetzt denken. Der untere Teil, die aliphatische Kette (der „Linker“) ist der eine, und der eigentliche Farbstoff (der „Kopf“) ist der andere Teil. Dieser Kopf ist aufgrund seiner chemischen Struktur relativ starr, so daß er in guter Näherung lediglich durch seine Orientierung im Raum mit drei Freiheitsgraden beschrieben werden kann. Für den Linker ist diese Näherung allerdings schlechter, da er wesentlich flexibler ist als der Kopf. Sie soll dennoch durchgeführt werden, und es wird sich zeigen, daß sie ausreicht, um einen ersten Eindruck von energetisch günstigen Konformationen zu bekommen. Entsprechend wird der Linker hier durch *eine* Raumrichtung, also zwei Freiheitsgrade beschrieben. Würde man hier für den Linker vier Freiheitsgrade benutzen, so könnte der Konformationsraum nicht mehr systematisch abgetastet werden, da der Rechenaufwand für einen 7-dimensionalen Raum bereits viel zu groß wäre.

In Abbildung 4.6 wird gezeigt, wie die Orientierung des Farbstoffs vereinfacht dargestellt werden kann. Hier wird der Konformationsraum des Farbstoffs also auf fünf Freiheitsgrade projiziert, die die wesentliche äußere Bewegungsfreiheit darstellen. Diese Freiheitsgrade sind in der Abbildung gezeigt: Es handelt sich um zwei Raumrichtungen (φ_1, θ_1) , (φ_2, θ_2) und einen Dreh-

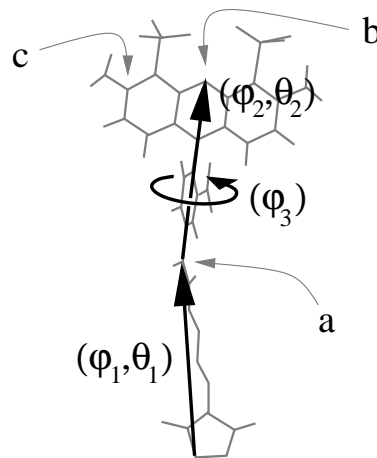


Abbildung 4.6: Die wesentliche äußere Bewegungsfreiheit des Farbstoffs kann näherungsweise durch fünf Freiheitsgrade beschrieben werden. Diese vereinfachte Darstellung des Farbstoffs wird im ersten Schritt des hierarchischen Ansatzes verwendet.

winkel (φ_3) . Mit Hilfe dieser fünf Winkel können also, eine fixierte innere Struktur des Farbstoffs angenommen, die Koordinaten jedes Farbstoffatoms bestimmt werden. Dabei wird zunächst aus φ_1 und θ_1 die Position des Atoms a, dann aus φ_2 und θ_2 die des Atoms b und schließlich aus φ_3 die des Atoms c bestimmt. Daraus ergeben sich nun alle anderen Atompositionen.

Wir haben den 5-dimensionalen Konformationsraum in 10° -Schritten abgetastet ($\varphi_1 = [0, 350], \theta_1 = [-90, 90], \varphi_2 = [0, 350], \theta_2 = [-90, 90], \varphi_3 = [0, 350]$) und für jede Konformation sowohl die elektrostatische, als auch die Van der Waals-Energie des Systems, bestehend aus Farbstoff und Protein, mit den oben beschriebenen beiden Näherungen berechnet. Die Energiebeiträge der bindenden Wechselwirkungen innerhalb des Farbstoffs werden hier nicht betrachtet, da durch die Annahme einer festen internen Struktur des Farbstoffs keine Aussagen über die interne Realisierung gemacht werden können und so dafür auch keine Energie angegeben werden kann.

Man erhält also ein Gitter mit etwa 16.8 Mio. Punkten und für jeden Punkt die Energie. Nun lassen sich leicht alle Konformationen finden, deren Energie unter einer bestimmten Grenze liegt. Um nun zu überprüfen, wie gut die vereinfachte Beschreibung mit fünf Freiheitsgraden die günstigen

Konformationen wiedergibt, sollen im nächsten Schritt alle Freiheitsgrade des Farbstoffs beschrieben werden.

4.2.3 Schritt 2: Verwendung zufälliger Ausgangskonformationen

Dieser zweite Schritt soll ebenfalls das Sampling-Problem umgehen und gleichzeitig überprüfen, wie gut die günstigen Konformationen in Schritt 1 bestimmt wurden. Hier wurde der Farbstoff in einer MD-Simulation mit allen seinen Freiheitsgraden beschrieben und ebenfalls, wie in Schritt 1, die *Mean-field*-Näherung, das Kontinuumsmodell für das Wasser und das Gittermodell zur Beschreibung der Elektrostatik (vgl. 4.2.1) benutzt. Der Farbstoff bewegt sich so im gemittelten Potential des Proteins.

Es werden nun 11 Anfangskonformationen des Farbstoffs zufällig ausgewählt und von diesen ausgehend MD-Simulationen gestartet, bei denen sich also nur der Farbstoff bewegen kann. Dieser wird, wie in Abschnitt 4.1.1 beschrieben, durch Kopplung an ein Wärmebad bei einer Temperatur von 300 K simuliert. Der Farbstoff wird dann ein jeweils nahegelegenes lokales Energieminimum finden.

Üblicherweise werden bei der impliziten Beschreibung des Lösungsmittels zusätzliche Rausch- und Reibungskräfte eingeführt (vgl. Kapitel 2). Diese wurden hier jedoch stark verringert, um die Bewegungen und damit die Konformationssuche zu beschleunigen. Das ist erlaubt, weil dabei das durch die Simulation erzeugte Ensemble und damit die Gleichgewichtszustände unverändert bleiben. Die Dynamik des Farbstoffs wird zwar nicht realistisch beschrieben, ist hier aber auch nicht interessant. So erreichen die Farbstoffe schon nach etwa 100 ps eine stabile Gleichgewichtskonformation.

4.2.4 Ergebnisse aus Schritt 1 und 2

Abbildung 4.7 zeigt die Ergebnisse aus Schritt 1 (oben) und Schritt 2 (unten). In verschiedenen Farben sind hier die in den beiden Schritten gefundenen günstigen Konformationen eingezeichnet. Die Farben dienen nur zur besseren Unterscheidung der übereinandergelegten Strukturen. Vom Protein (grau) ist aus Gründen der Übersichtlichkeit nur ein Ausschnitt gezeigt. Vergleicht man die Ergebnisse der beiden Schritte miteinander, so lassen sich nahezu alle Cluster aus Schritt 2 auch schon bei Schritt 1 erkennen. Das be-

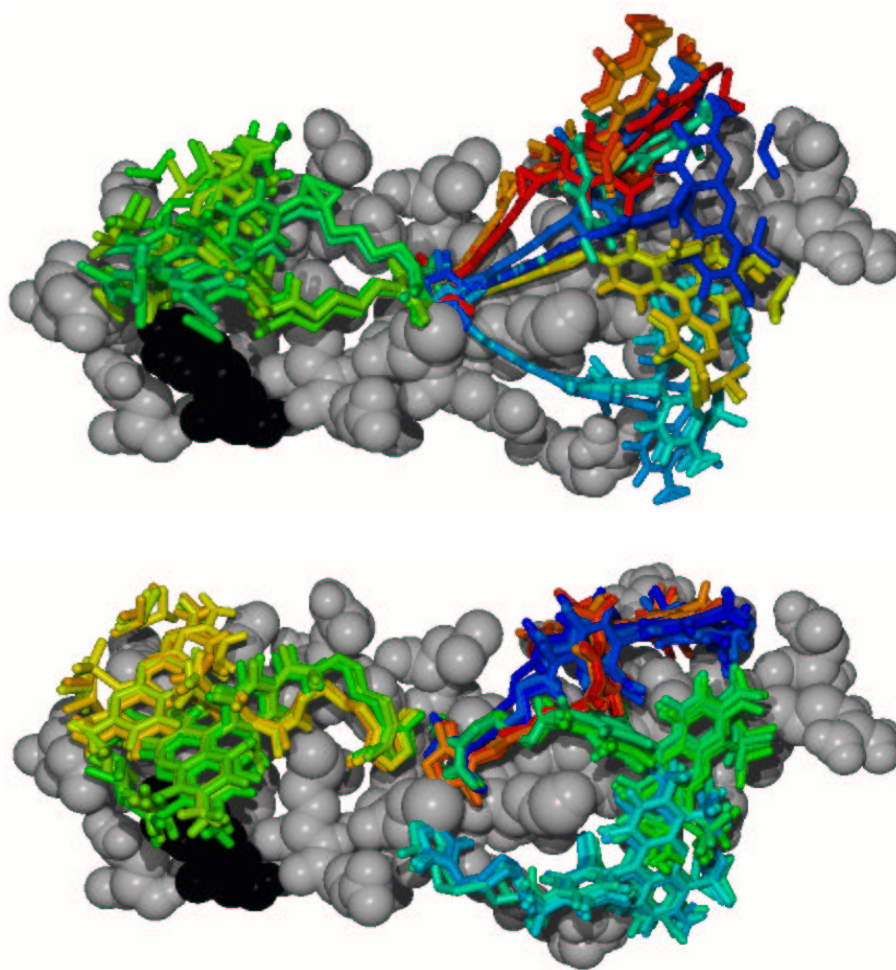


Abbildung 4.7: In grau ist ein Ausschnitt aus der Proteinstruktur gezeigt (zur Orientierung in schwarz: Arg232). Zusätzlich sieht man farbig dargestellt die in Schritt 1 und 2 gefundenen Konformationen des Farbstoffs. **Oben:** Die durch die vollständige Suche (Schritt 1) gefundenen Cluster von Konformationen niedriger Energie. **Unten:** Die Cluster aus den MD-Simulationen mit verschiedenen Ausgangskonformationen (Schritt 2). Es lassen sich fünf verschiedene Zustände erkennen. In beiden Fällen wurde eine *Mean-field*-Näherung und eine mit einem Gittermodell vereinfachte Elektrostatik verwendet.

deutet, selbst die stark vereinfachte Darstellung des Farbstoffs mit lediglich fünf Freiheitsgraden liefert bereits einen guten Eindruck von Konformationen niedriger Energie. Außerdem kann man nun davon ausgehen, daß mit Schritt 2 alle wesentlichen Zustände innerhalb dieses vereinfachten Modells gefunden wurden, da sich auch mit der vollständigen Konformationssuche keine weiteren Zustände ergaben. Insgesamt lassen sich fünf Zustände erkennen, die nun also eine erste Näherung der realen Zustände darstellen; es ist jedoch nicht zu erwarten, daß sie mit einem so groben Kontinuumsmodell bereits realistisch beschrieben wurden.

Die Lage der Konformationen soll nun genau bestimmt werden. Daher sollen im dritten Schritt die bisher in Schritt 2 gefundenen fünf Konformationen als Ausgangspunkt für eine MD-Simulation mit explizitem Lösungsmittel benutzt werden.

4.2.5 Schritt 3: Verwendung der in Schritt 2 gefundenen Konformationen

Um nun alle Farbstoffkonformationen möglichst detailliert zu beschreiben, sollen hier auch alle Lösungsmittelleffekte berücksichtigt werden. Daher wurden fünf Systeme mit den in Schritt 2 gefundenen Konformationen als Ausgangskonformationen in einer expliziten Wasserumgebung modelliert. Es wird hier allerdings nicht mehr das Gittermodell für die Elektrostatik verwendet, da diese Methode nur in die sequentielle Version von EGO implementiert wurde, der Rechenaufwand aber durch die explizite Wasserumgebung so stark ansteigt, daß die herkömmliche Berechnung der Elektrostatik mit der Verwendung eines Parallelrechners günstiger ist als die Verwendung des Gittermodells bei der Verwendung einer Workstation mit nur einem Prozessor. Um diese fünf Konformationen herum werden mit dem Programm SOLVATE je ca. 4000 Wassermoleküle plaziert. Die Wasserumgebungen umfassen hier allerdings nicht wie bei dem in Abbildung 4.1 dargestellten System den gesamten SNARE-Komplex, sondern nur die jeweilige direkte Umgebung des Farbstoffs, da die Bewegungen vom Farbstoff weit entfernter Residuen einen zu vernachlässigenden Einfluß auf den Farbstoff haben und so Rechenzeit gespart werden kann. Die Wasserumgebungen haben einen Durchmesser von ca. 50 Å, so daß der Farbstoff innerhalb dieser Wasserum-

gebung genug Bewegungsfreiheit hat und der Wasseroberfläche nicht näher als 10 Å kommen kann, so daß der Farbstoff nicht durch Oberflächeneffekte gestört wird. Das Protein wird diesmal nicht vollständig fixiert: Die Residuen, die sich innerhalb der Wasserumgebung, also in direkter Nähe des Farbstoffs befinden, können sich nun bewegen, so daß auch der Einfluß des Farbstoffs auf die lokale Proteinstruktur, also auf die Konformationen einzelner Aminosäuren berücksichtigt werden kann. Diejenigen Residuen, die aber außerhalb des Wassers liegen, sind weiterhin fixiert, da ihre Bewegung aufgrund der fehlenden Wassermoleküle ohnehin nicht realistisch beschrieben werden kann.

Die fünf Systeme wurden nach einer Energieminimierung sowohl bei 280 K, als auch bei 300 K simuliert. Zunächst zeigt sich bei 280 K, daß sich die Farbstoffe von der Oberfläche lösen und sich etwa ein bis zwei Schichten Wasser zwischen Protein und Farbstoff schieben. Man beobachtet weiterhin, daß die beiden Zustände, die in Abbildung 4.7 auf der linken Seite liegen, zu einem Zustand A und die drei Zustände von der rechten Seite in einen Zustand B verschmelzen. Diese beiden neuen Cluster bilden sich in den fünf Simulationen nach ca. 100–300 ps Simulationszeit heraus. Abbildung 4.8 zeigt diese beiden Cluster A und B aus zwei 6ns-Trajektorien.

Der Cluster B stimmt recht gut mit dem schon in der oben beschriebenen ersten Simulation gefundenen Cluster (vgl. Abb. 4.3) überein. Die dort gewählte willkürliche Startkonformation lag also zufällig schon in der Nähe des Zustands B. Darüber hinaus wurde also noch ein weiterer Cluster gefunden. Man erkennt in Abbildung 4.8, daß Zustand A deutlich näher an der Oberfläche liegt als Zustand B. Der Farbstoff könnte somit in Zustand A aufgrund der Nähe zur Oberfläche in seiner Bewegungsfreiheit stärker eingeschränkt sein in Zustand B. In den nächsten beiden Kapiteln wird diese Vermutung sowohl durch die Ergebnisse einer Entropie- als auch durch eine Anisotropieberechnung bestätigt.

Nun wird der Farbstoff sowohl in Zustand A als auch in Zustand B (in zwei getrennten Rechnungen) bei 300 K simuliert, dies entspricht etwa der im Experiment herrschenden Temperatur. Definiert man, wie in Abbildung 4.9 (rechts) dargestellt, den Winkel θ durch die Verbindungslinie von Cys225, an das der Farbstoff gebunden ist, mit dem Atom 7 (Numerierung

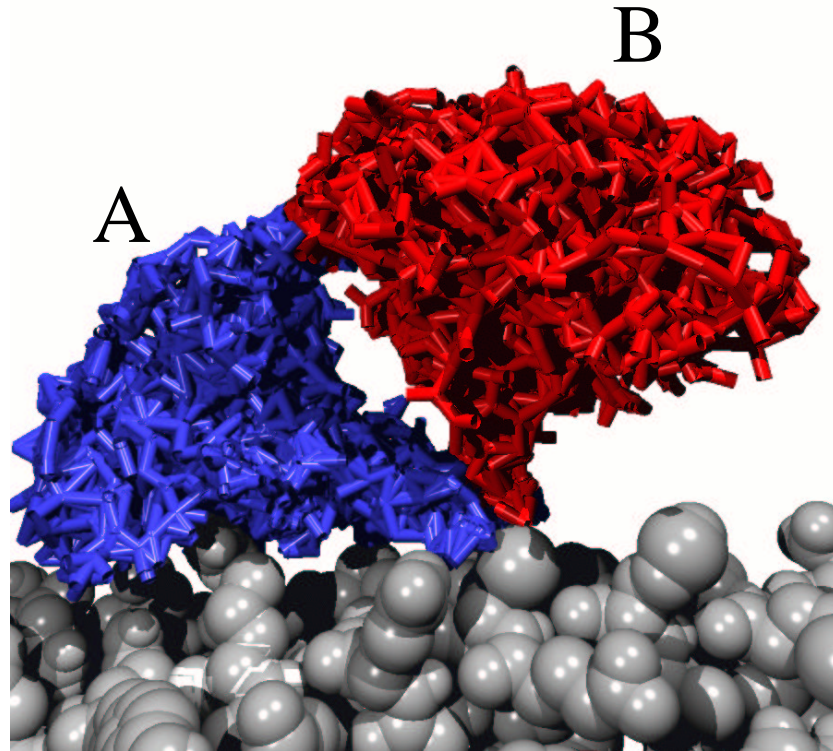


Abbildung 4.8: Hier sind die zwei mit dem hierarchischen Ansatz gefundenen Zustände des Farbstoffs gezeigt: A (rot) und B (blau). Eine willkürlich ausgewählte Struktur des SNARE-Komplexes in grau.

siehe Abb. 3.2) und durch die Verbindungslinie dieses Cysteins mit Asp68, das auf der Oberfläche in der Nähe des Zustands A liegt, so kann man diesen Winkel θ gegen die Zeit auftragen. Abbildung 4.9 (links) zeigt diese Auftragung für die Simulation, die in Zustand A gestartet wurde und bei der die Wasserhülle im wesentlichen nur diesen Zustand einschließt. Das bedeutet, daß die Bewegung des Farbstoffs nur bis zu einem Winkel von etwa 70° richtig beschrieben werden kann, da bei größeren Winkeln der Farbstoff zu nahe an den Rand der Wasserhülle kommt und Oberflächeneffekte seine Bewegung beeinflussen. Man erkennt dennoch deutlich, daß die Winkel bei einer Temperatur von 280 K kleiner als bei 300 K sind. Daraus läßt sich zunächst schließen, daß der Farbstoff in Zustand A bei 300K weniger stabil

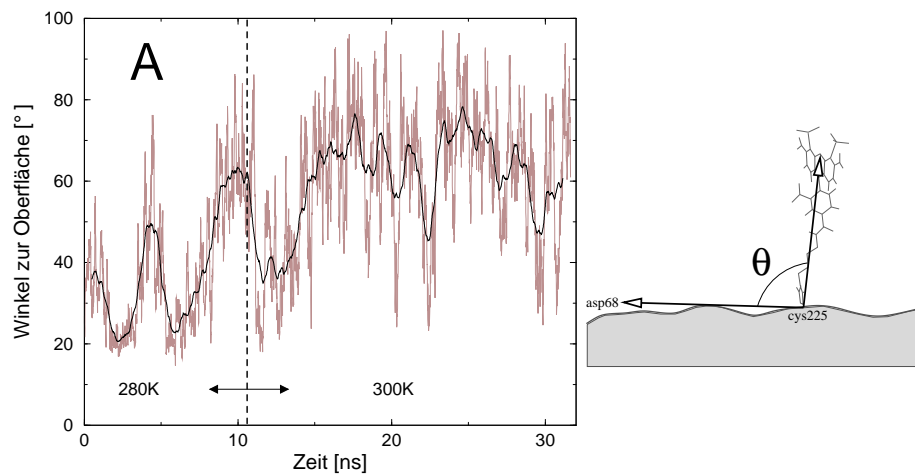


Abbildung 4.9: Rechts ist der Winkel θ zwischen Farbstoff und Oberfläche des Proteins gezeigt. Links ist dieser während einer Simulation über die Zeit aufgetragen. Die ersten etwa 10 ns wurden bei 280 K simuliert und anschließend bei 300 K. Bei 280 K ist der Farbstoff näher an der Oberfläche als bei 300 K.

als bei 280 K ist. Allerdings lassen sich hier keine Übergänge zwischen den Zuständen erkennen, da der Farbstoff aufgrund der zu kleinen Wasserhülle nicht vollständig in den Zustand B übergehen kann. Er kehrt also häufiger in Zustand A zurück, als er das bei einer sehr großen Wasserhülle tun würde.

In Zustand B ist bei dieser Temperaturänderung kein signifikanter Unterschied zu beobachten.

Wie stabil ist nun der Farbstoff in Zustand A bzw. B? Wie groß sind also die Besetzungswahrscheinlichkeiten der beiden Zustände? Wäre z. B. die Wahrscheinlichkeit für den Farbstoff, in Zustand A zu sein, sehr gering, so wäre die Betrachtung dieses Zustands bei der Berechnung der Anisotropie in Kapitel 6 nicht sehr wichtig. Um nun die Besetzungswahrscheinlichkeiten zu bestimmen, muß die freie Energie der Zustände berechnet werden, wie im nächsten Kapitel ausführlich beschrieben wird.

Kapitel 5

Freie Energie

In diesem Kapitel sollen die Besetzungswahrscheinlichkeiten für die beiden im vorigen Kapitel gefundenen Zustände abgeschätzt werden. Die Besetzungswahrscheinlichkeiten des Zustands A (P_A) und des Zustands B (P_B) ergeben sich mit dem Boltzmann-Faktor aus der Differenz ΔF der freien Energien F_A und F_B :

$$\frac{P_A}{P_B} = e^{-\beta(F_A - F_B)} = e^{-\beta\Delta F}, \quad (5.1)$$

mit $\Delta F = \Delta U - T\Delta S$ (U: innere Energie, T: Temperatur, S: Entropie). Solche Berechnungen sind für komplexe Systeme recht schwierig und mit Fehlern, z. B. aufgrund des *sampling*-Problems behaftet. Daher wurden hier zwei verschiedene Methoden eingesetzt, um auch die Methoden zu überprüfen. Die erste Methode ist die *thermodynamische Integration*, mit der sich der Verlauf der freien Energie entlang einer Reaktionskoordinate bestimmen läßt. Der zweite anschließend beschriebene Weg ist die separate Bestimmung der Beiträge ΔU und $T\Delta S$ zur freien Energie. Dazu soll hier eine neue Methode zur Berechnung von Entropiedifferenzen entwickelt werden (vgl. 5.5.2).

5.1 Thermodynamische Integration

Zunächst soll die Methode der thermodynamischen Integration skizziert werden. Eine genaue Herleitung findet sich z. B. in Ref. [65]. Zur Berechnung der Differenz der freien Energie ΔF zwischen zwei Zuständen A und B ist es

hier zunächst erforderlich, einen Reaktionsweg festzulegen. Dieser Weg wird mit einer Reaktionskoordinate λ parametrisiert, so daß sich das System in Zustand A für $\lambda = 0$ und in B für $\lambda = 1$ befindet. Die Differenz der freien Energie ΔF zwischen A und B ergibt sich dann zu:

$$\Delta F = \int_0^1 \frac{\partial F(\lambda)}{\partial \lambda} d\lambda \quad , \quad (5.2)$$

wobei $F(\lambda)$ die freie Energie des Systems an der Stelle λ ist. Mit der Zustandssumme $Z(\lambda)$ läßt sich $F(\lambda)$ schreiben als

$$F(\lambda) = -\frac{1}{\beta} \ln Z(\lambda) \quad , \quad (5.3)$$

mit $\beta = 1/(k_B T)$. Dann ist

$$\frac{\partial F(\lambda)}{\partial \lambda} = -\frac{1}{\beta Z(\lambda)} \frac{\partial Z(\lambda)}{\partial \lambda} \quad . \quad (5.4)$$

Die Zustandssumme $Z(\lambda)$ ist gegeben durch:

$$Z(\lambda) = \frac{1}{h^{3N} N!} \int e^{-\beta H(\mathbf{p}, \mathbf{x}, \lambda)} d^{3N} \mathbf{p} d^{3N} \mathbf{x} \quad , \quad (5.5)$$

wobei $H(\mathbf{p}, \mathbf{x}, \lambda)$ die Gesamtenergie und N die Anzahl, \mathbf{p} die Impulse und \mathbf{x} die Orte der Teilchen des Systems sind. Da potentielle Energie $V(\mathbf{x}, \lambda)$ hier nicht von den Impulsen abhängt, läßt sich die Gesamtenergie schreiben als

$$H(\mathbf{p}, \mathbf{x}, \lambda) = E_k(\mathbf{p}) + V(\mathbf{x}, \lambda) \quad , \quad (5.6)$$

wobei E_k die kinetische Energie ist. Damit läßt sich die Zustandssumme separieren:

$$Z(\lambda) = \underbrace{\frac{1}{h^{3N} N!} \int e^{-\beta E_k(\mathbf{p})} d^{3N} \mathbf{p}}_C \int e^{-\beta V(\mathbf{x}, \lambda)} d^{3N} \mathbf{x} \quad . \quad (5.7)$$

Daraus ergibt sich

$$\frac{\partial Z(\lambda)}{\partial \lambda} = -\beta C \int \frac{\partial V(\mathbf{x}, \lambda)}{\partial \lambda} e^{-\beta V(\mathbf{x}, \lambda)} d^{3N} \mathbf{x} \quad . \quad (5.8)$$

Setzt man Gleichung 5.8 in 5.4 ein, so erhält man

$$\frac{\partial F(\lambda)}{\partial \lambda} = \frac{C}{Z(\lambda)} \int \frac{\partial V(\mathbf{x}, \lambda)}{\partial \lambda} e^{-\beta V(\mathbf{x}, \lambda)} d^{3N} \mathbf{x} \quad . \quad (5.9)$$

Das läßt sich als Ensemblemittelwert an der Stelle λ schreiben,

$$\frac{\partial F(\lambda)}{\partial \lambda} = \left\langle \frac{\partial V(\mathbf{x}, \lambda)}{\partial \lambda} \right\rangle_{\lambda} \quad (5.10)$$

Somit ergibt sich für die Differenz der freien Energie ΔF zwischen den Zuständen A und B

$$\Delta F = \int_0^1 \left\langle \frac{\partial V(\mathbf{x}, \lambda)}{\partial \lambda} \right\rangle_{\lambda} d\lambda . \quad (5.11)$$

Mit der MD-Simulation sind solche Ensemblemittelwerte prinzipiell zugänglich. Eine Möglichkeit, die freie-Energie-Differenz aus Gleichung 5.11 zu berechnen, besteht darin, das Intervall $[0, 1]$ in Teilintervalle zu unterteilen und den Ensemblemittelwert $\left\langle \frac{\partial V(\mathbf{x}, \lambda)}{\partial \lambda} \right\rangle_{\lambda}$ für diskrete λ zu berechnen. Bei einer weiteren in Ref. [66] vorgestellten und hier verwendeten Möglichkeit wird während der Simulation das λ kontinuierlich verändert. Hier bedarf es nur einer Simulation, bei der das System strenggenommen allerdings nie vollkommen im Gleichgewicht ist. Daher ist es wichtig, das λ so langsam zu verändern, daß das System zumindest auf hinreichend kleinen Intervallen $[\lambda, \lambda + \Delta\lambda]$ im Gleichgewicht ist und so also (quasi-)reversibel von Zustand A nach Zustand B überführt wird. Die Differenz ΔF erhält man dann durch einfache Integration über $\partial V(\mathbf{x}, \lambda)/\partial \lambda$. Ein guter Test auf Reversibilität ist es, das System sowohl von Zustand A nach B als auch von Zustand B nach A zu überführen. Im Fall vollkommener Reversibilität sollten beide Wege den gleichen Verlauf der freien Energie liefern.

5.2 Simulationen zur Bestimmung der freien Energie

Die Methode der thermodynamischen Integration soll nun auf das Protein-Farbstoff-System angewendet werden. In diesem Fall entspricht dem Reaktionsweg λ ein Abschnitt eines Kreisbogens, auf dem der Farbstoff quasireversibel vom Zustand A ($\lambda=0$) nach B (λ) oder umgekehrt überführt wird (vgl. Abb. 5.1). Das soll erreicht werden, indem der Farbstoff während einer MD-Simulation kontinuierlich von einem Zustand in den anderen bewegt wird. Dabei wird an ein Atom (Atom 7 aus Abb. 3.2) ein harmonisches Fe-

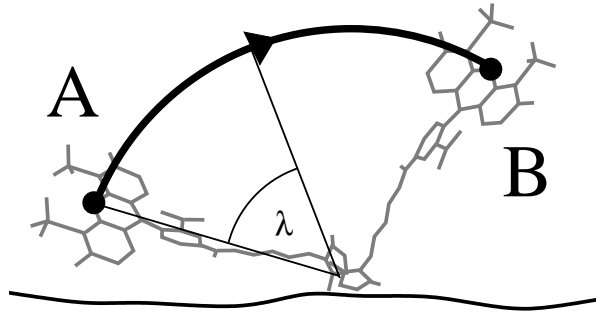


Abbildung 5.1: Der Farbstoff wird während einer MD-Simulation auf dem eingezeichneten Weg an einem Atom von einem Zustand in den anderen gezogen.

derpotential angelegt,

$$V_{Feder} = \frac{1}{2}k_F(\mathbf{x} - \mathbf{x}_0)^2 \quad , \quad (5.12)$$

wobei k_F die Federkonstante, \mathbf{x} der Ort des Atoms, an dem gezogen wird, und \mathbf{x}_0 die Gleichgewichtsposition der Feder sind. Diese Gleichgewichtsposition wird während einer MD-Simulation kontinuierlich auf dem Kreisbogen entlang bewegt. Die Kraft

$$\mathbf{K}[\lambda(t)] = \frac{\partial V(\mathbf{x}, \lambda)}{\partial \lambda} \quad (5.13)$$

kann nun durch die Auslenkung des Atoms im Ziehpotential bestimmt werden. Als Federkonstante wurde hier $k_F=1.2 \text{ kcal}/(\text{mol} \cdot \text{Å}^2)$ gewählt.

Die Ziehgeschwindigkeit sollte möglichst klein sein, damit der Farbstoff seinen Konfigurationsraum senkrecht zur Ziehrichtung möglichst vollständig abtasten kann, der Ziehvorgang also reversibel ist und entropische Beiträge in die Gesamtenergie vollständig eingehen.

Bei dieser Ziehbewegung treten Reibungskräfte auf, die zu einer Überhöhung des Verlaufs der freien Energie führen, da die Reibungskräfte immer entgegen der Ziehrichtung wirken. Zur Korrektur dieses Effekts werden zwei Simulationen durchgeführt. Dabei wird der Farbstoff einmal vom Zustand A nach B und dann von B nach A gezogen und anschließend über beide Kurven gemittelt. Da die Reibungskräfte in beiden Simulationen mit unterschiedlichem Vorzeichen eingehen, können sich die Reibungsbeiträge zur

freien Energie teilweise herausmitteln, so daß das Ergebnis damit verbessert werden kann.

Das verwendete Simulationssystem

Es wurde ein Simulationssystem verwendet, das bis auf die Größe der Wasserumgebung dem in Abschnitt 4.2.5 entspricht. Alle Residuen des Proteins werden fixiert, mit Ausnahme derjenigen, die sich in der Nähe des Farbstoffs, also auf der Oberfläche des Proteins, innerhalb der Wasserumgebung befinden. Die Wasserumgebung ist jedoch diesmal so groß gewählt, daß sie beide Zustände A und B einschließt. Zur Berechnung der freien Energie wurden zwei Simulationen mit unterschiedlichen Ziehgeschwindigkeiten v bei 300 K durchgeführt.

Dabei sollte die Simulation mit einer hohen Ziehgeschwindigkeit von $v_s = 0.007 \text{ rad/ps} \cong 138 \text{ \AA/ns} \cong 13.8 \text{ m/s}$ als Testsimulation dienen; wir erwarten hier nicht, daß der Farbstoff reversibel bewegt wird, da die hier gewählte Geschwindigkeit zu groß ist. Beim Übergang von Zustand A nach B muß ein Winkelbereich von 82° überschritten werden, so daß die Simulationszeit mit dieser hohen Ziehgeschwindigkeit 204 ps beträgt. Die kleinere Ziehgeschwindigkeit sollte so klein wie möglich gewählt werden, dabei sollte die Rechenzeit auf einem Parallelrechner jedoch einen Monat nicht überschreiten. Daraus ergibt sich eine maximale Simulationszeit dieses Systems von 4.77 ns, also eine Ziehgeschwindigkeit von $v_l = 0.0003 \text{ rad/ps} \cong 0.6 \text{ m/s}$.

5.3 Ergebnisse

Abbildung 5.2 zeigt die aus den beiden beschriebenen Simulationen erhaltenen Verläufe der freien Energie: Der obere Verlauf für die hohe Ziehgeschwindigkeit und der untere für die niedrige Ziehgeschwindigkeit. Dabei wird die Definition des Winkels θ aus Abbildung 4.9 verwendet. Die Winkel θ der mittleren Strukturen des Farbstoffs wurden aus den für die beiden Zustände bei unterschiedlicher Temperatur (280 K und 300 K) durchgeführten Simulationen (siehe Abschnitt 4.2.5) bestimmt und sind ebenfalls in die Abbildung eingezeichnet: Der Winkel θ der mittleren Struktur des Farbstoffs in Zustand A bei 280 K ist 35° , bei 300 K 55° , in Zustand B bei 280 K 105°

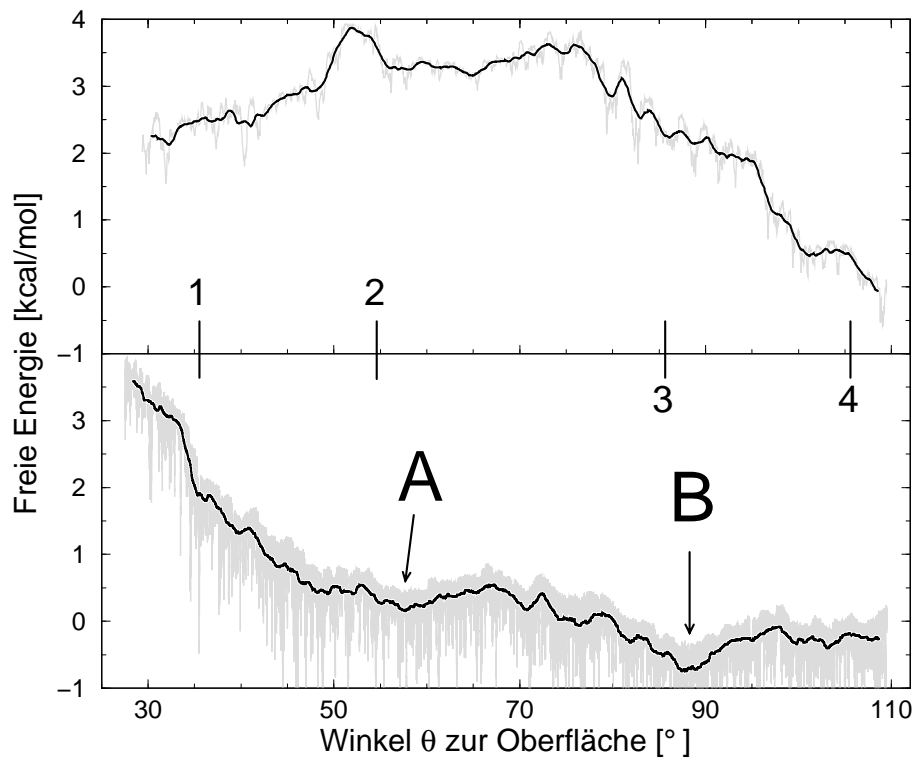


Abbildung 5.2: Freie-Energie-Landschaften als Funktion des Drehwinkels θ aus Simulationen mit hoher (oben) und niedriger Ziehgeschwindigkeit (unten). Außerdem aufgetragen sind die Winkel der mittleren Strukturen des Farbstoffs aus den in Abschnitt 4.2.5 beschriebenen Simulationen für Zustand A bei 280K (1) und bei 300K (2), sowie für Zustand B bei 280K (3) und bei 300K (4) eingetragen.

und bei 300 K 85°. Bei niedriger Ziehgeschwindigkeit (Abb. 5.2, unten) lassen sich die Minima den Zuständen A und B zuordnen. Als Differenz der freien Energie zwischen den Zuständen A und B ergibt sich (aus der unteren Kurve)

$$\Delta F \approx 1 \frac{\text{kcal}}{\text{mol}} . \quad (5.14)$$

Daraus erhält man mit Gleichung 5.1 die Besetzungswahrscheinlichkeiten für die Zustände A und B:

$$A : 15\%$$

$$B : 85\%$$

Für hohe Winkelgeschwindigkeit (Abb. 5.2) lassen sich den mittleren Strukturen keine Minima zuordnen. In Abschnitt 5.6 werden mögliche Gründe dafür gegeben.

Im folgenden soll nun genauer bestimmt werden, wie sich die freie Energie der beiden Zustände aus Beiträgen der inneren Energie U und der Entropie S zusammensetzt.

5.4 Abschätzung der Differenz ΔU der inneren Energie

Hier soll nun die Differenz ΔU der inneren Energie zwischen den Zuständen A und B abgeschätzt werden. Der größte Beitrag zu ΔU kommt von der Differenz ΔU_q der elektrostatischen Energie, daher wurde hier nur diese zur Abschätzung der inneren Energie herangezogen. Dazu wurde der Verlauf der elektrostatischen Energie entlang der beiden 4.77 ns langen Trajektorien aus den in Abschnitt 5.2 beschriebenen Simulationen (Ziehsimulation von Zustand A nach B und zurück) des langsam gezogenen Farbstoffs benutzt.¹ Dabei wurde *ein* Energiewert pro 100 fs während der Simulation herausgeschrieben. Die Fluktuationen der elektrostatischen Energie, die hauptsächlich von den thermischen Fluktuationen der in der Simulation explizit beschriebenen Wassermoleküle erzeugt werden, sind mit ungefähr $\sigma_E \approx 120$ kcal/mol allerdings sehr groß und erschweren die genaue Berechnung von ΔU , so daß hier

¹Hier wurde ein 60 ps langes Teilstück einer der beiden Trajektorien unabsichtlich gelöscht. Die entstandene Lücke wurde mit Energiewerten des sich an die Lücke anschließenden 60ps langen Teilstücks aufgefüllt. Dadurch sollte das Ergebnis aber nicht wesentlich verfälscht werden.

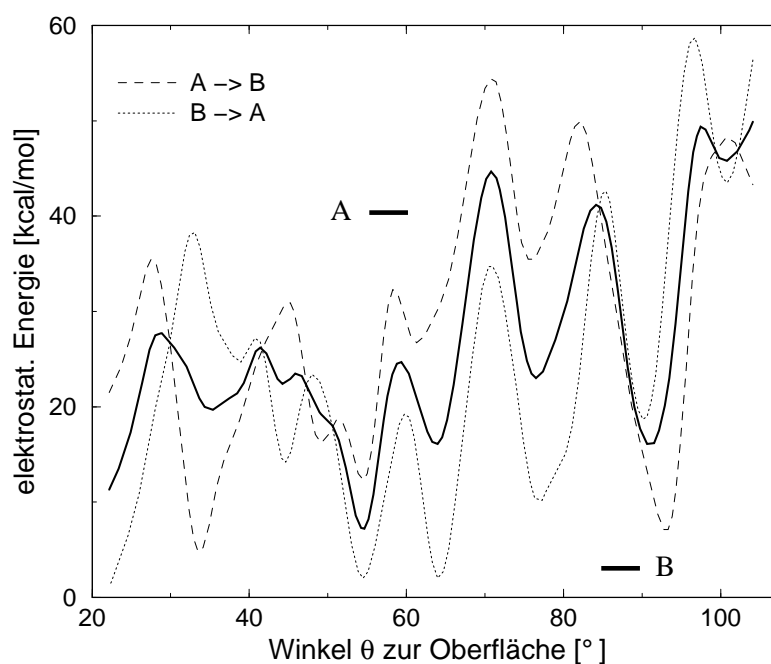


Abbildung 5.3: Verlauf der geglätteten elektrostatischen Energie aus den Ziehsimulationen von Zustand A nach B (gestrichelte Linie), von Zustand B nach A (gepunktete Linie) und der Mittelwert dieser beiden Kurven (durchgezogene Linie), aufgetragen über den Drehwinkel θ . Ebenfalls eingezeichnet sind die Winkelbereiche, denen in der freie-Energie-Landschaft die Zustände A und B zugeordnet werden können (fette Balken).

gemittelt werden muß. Zur Mittelung wurde der zeitliche Verlauf der elektrostatischen Energie mit einer Gaußfunktion der Breite σ_G geglättet. Die Breite wurde dabei so gewählt, daß der Einfluß der thermischen Fluktuationen weitgehend eliminiert wird, die elektrostatische Energie-Landschaft aber ausreichend detailliert wiedergegeben wird ($\sigma_G = 1.7^\circ$). Abbildung 5.3 zeigt die so gemittelten elektrostatischen Energien.

Die Wahl der Breite der Gaußfunktion von $\sigma_G = 1.7^\circ$ entspricht der Mittelung über etwa 6000 Datenpunkte (bei einer Ziehgeschwindigkeit von 0.0003 rad/ps und *einem* Energiewert pro 100 fs). Die Datenpunkte sind jedoch nicht alle unabhängig voneinander. Um abzuschätzen, wie viele effektiv voneinander unabhängige Datenpunkte vorliegen, wurde die Korrelationszeit

aus der Autokorrelationskurve des Energieverlaufs zu etwa 1 ps bestimmt. Daraus ergibt sich eine Anzahl von $n = 600$ statistisch unabhängigen Werten und hieraus für den Fehler des Mittelwerts:

$$\frac{\sigma_E}{\sqrt{n}} \approx 5 \frac{\text{kcal}}{\text{mol}} \quad (5.15)$$

Ordnet man Zustand A und B in Abbildung 5.2 die Winkelbereiche

$$\begin{aligned} A &: 55^\circ - 60^\circ \\ \text{und } B &: 85^\circ - 90^\circ \end{aligned}$$

zu, so ergibt sich aus Abbildung 5.3

$$U_A - U_B = \Delta U_{AB} \approx \Delta U_q \approx (-10 \pm 5) \frac{\text{kcal}}{\text{mol}}$$

Aufgrund der großen Fluktuationen der Energie und des damit verbundenen großen Fehlers kann dieses Ergebnis nur als grobe Abschätzung dienen.

5.5 Abschätzung der Differenz ΔS der Entropie

Zur Abschätzung der Entropiedifferenzen aus den MD-Simulationen werden hier zwei Verfahren angewendet: Zunächst eine etablierte Methode, die mit Hilfe einer Hauptkomponentenanalyse (PCA, *principal component analysis*) [67, 68] ein Ensemble durch eine multivariate Gaußfunktion annähert und daraus das Zustandsraumvolumen abschätzt. Diese Methode überschätzt die Entropie jedoch prinzipiell. Daher wird anschließend eine neue Methode entwickelt, die Volumenverteilungen von Simplexes miteinander vergleicht und die, wie sich zeigen wird, bessere Ergebnisse liefert. Zunächst besteht die Aufgabe darin, die Entropie, gegeben durch

$$S = -k_B \int \rho(\mathbf{x}) \ln \rho(\mathbf{x}) d^{3N} \mathbf{x} \quad , \quad (5.16)$$

mit der Konfigurationsraumdichte $\rho(\mathbf{x})$, aus einem Ensemble von Konfigurationen $\{\mathbf{x}_i\}$ aus einer MD-Simulation zu berechnen. Dies soll mit Hilfe der Hauptkomponentenanalyse geschehen.

5.5.1 Hauptkomponentenanalyse

Die Hauptkomponentenanalyse (PCA) wurde vor einigen Jahren in das Gebiet der MD-Simulation eingeführt, um die (kollektiven) Freiheitsgrade zu finden, die die größten, sogenannten essentiellen Bewegungen eines Proteins beschreiben. Dazu wird die Konfiguration eines Moleküls mit N Atomen als ein Punkt $\mathbf{x} \in \mathbb{R}^{3N}$ aufgefaßt. Ein Ensemble von m Konfigurationen $\{\mathbf{x}(t_1), \mathbf{x}(t_2), \dots, \mathbf{x}(t_m)\}$, $\mathbf{x} \in \mathbb{R}^{3N}$ (Punktwolke im $3N$ -dimensionalen Raum), wie es zum Beispiel durch eine MD-Trajektorie erzeugt wird, approximiert damit die Konfigurationsraumdichte $\rho(\mathbf{x})$ des Systems.

Mit Hilfe des Mittelwerts $\bar{\mathbf{x}} = \langle \mathbf{x} \rangle_{t_i}$ und der Kovarianzmatrix

$$\mathbf{K} = \langle (\mathbf{x} - \bar{\mathbf{x}}) \cdot (\mathbf{x} - \bar{\mathbf{x}})^T \rangle_{t_i} \quad (5.17)$$

läßt sich die Dichte $\rho(\mathbf{x})$ durch eine multivariate Gaußverteilung $\tilde{\rho}(\mathbf{x})$ annähern

$$\rho(\mathbf{x}) \approx \tilde{\rho}(\mathbf{x}) \sim e^{-\frac{1}{2}(\mathbf{x} - \bar{\mathbf{x}})\mathbf{K}^{-1}(\mathbf{x} - \bar{\mathbf{x}})} \quad , \quad (5.18)$$

und die zugehörige Entropie ergibt sich zu

$$S = S_0 + \frac{3}{2}Nk_B + \frac{1}{2} \ln [(2\pi)^2 3N \det(\mathbf{K})] \quad , \quad (5.19)$$

wobei S_0 eine Konstante ist [69]. Betrachtet man nun zwei verschiedene Zustände A und B des Moleküls mit den beiden entsprechenden Punktwolken und bestimmt die zugehörigen Kovarianzmatrizen, so läßt sich die Entropiedifferenz zwischen A und B angeben [69]:

$$\Delta S_{AB} = \frac{1}{2}k_B \ln \frac{\det \mathbf{C}_A}{\det \mathbf{C}_B} \quad (5.20)$$

Sind die Punkte der Punktwolke allerdings nicht gaußförmig verteilt, so überschätzt die PCA die Ausdehnungen der Punktwolke. Die Entropiedifferenz kann jedoch auch dann exakt berechnet werden, wenn die Punktwolken zwar nicht gaußverteilt, aber die gleiche Form haben, denn dann wird das Volumen beider Punktwolken um den gleichen Faktor überschätzt. Da hier aber weder von einer Gaußverteilung der Punktwolken noch von gleicher Form ausgegangen werden kann, wurde ein Verfahren entwickelt, das stabiler bei Abweichungen der Formen voneinander ist.

5.5.2 Simplex-Verfahren

Diese Methode beruht im Gegensatz zur PCA auf einem statistischen Ansatz. Hier soll das Volumenverhältnis von zwei $n = 3N$ -dimensionalen Punktwolken bestimmt werden, denn daraus läßt sich mit

$$S = k_B \ln \Omega$$

und $\Omega \sim V$ die Entropiedifferenz bestimmen:

$$\Delta S_{AB} = k_B \ln \frac{V_A}{V_B} \quad , \quad (5.21)$$

wobei Ω die Anzahl der Zustände ist und V das Volumen, das diese Zustände einnehmen.

Das Volumenverhältnis wird nun wie folgt bestimmt: In der n -dimensionalen Punktwolke werden zufällig $k + 1$ Punkte ausgewählt. Sie dienen als Eckpunkte $(\mathbf{v}_0, \mathbf{v}_1, \dots, \mathbf{v}_k)$ eines k -dimensionalen Simplex S . Die *Gram-Determinantenformel* [70] liefert nun das Volumen des Simplex:

$$V_k(S) = \frac{|\det \mathbf{W}\mathbf{W}^T|^{\frac{1}{2}}}{k!} \quad (5.22)$$

mit der $k \times n$ -Matrix \mathbf{W} , in denen die Zeilenvektoren \mathbf{w}_i ($i = 1, \dots, k$) mit

$$\mathbf{w}_1 = \mathbf{v}_1 - \mathbf{v}_0, \quad \mathbf{w}_2 = \mathbf{v}_2 - \mathbf{v}_0, \quad \dots, \quad \mathbf{w}_k = \mathbf{v}_k - \mathbf{v}_0$$

stehen. Wiederholt man das sehr oft, so erhält man eine Verteilung von Volumina der in die Punktwolke gewürfelten Simplices. Verfährt man mit Punktwolke B genauso, kann man, wie in Abbildung 5.4 gezeigt, zwei kumulative Verteilungen V_{sum}^A und V_{sum}^B auftragen.

Ist in Gleichung 5.22 $k = n$, dann kann man das Volumenverhältnis der beiden Punktwolken mit

$$\frac{V_A}{V_B} \approx \frac{1}{M} \sum_{i=1}^M \frac{V_{sum}^A(i)}{V_{sum}^B(i)} =: f_n \quad (5.23)$$

abschätzen, wobei N die Anzahl der verwendeten Simplices und f_n das mittlere Verhältnis der Simplexvolumina ist.

Die Berechnung der Simplexvolumina erfordert die Berechnung einer Determinante, die bei großen Dimensionen ($n > 100$) sehr rechenaufwendig sein

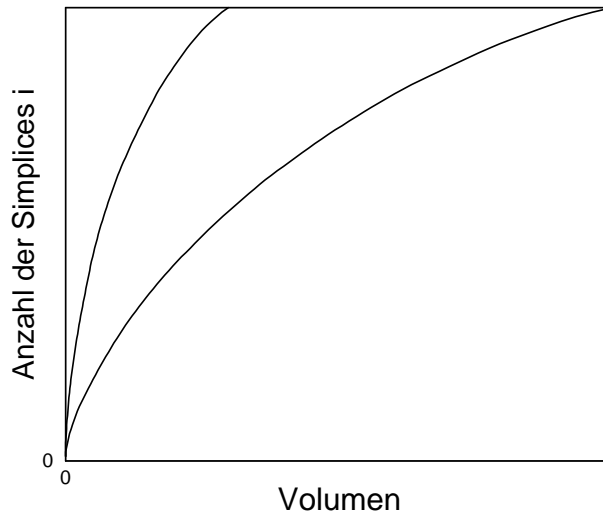


Abbildung 5.4: Kumulative Verteilungen von Simplexvolumina von zwei Punktwolken mit unterschiedlichem Volumen (schematisch).

kann. Es lassen sich aber auch k -dimensionale Simplexes mit $k < n$ verwenden, wie im folgenden gezeigt wird: Da in die Berechnung der Verteilungen alle n Dimensionen, also alle Freiheitsgrade des Systems gleichermaßen eingehen, läßt sich der aus der Verteilung der k -dimensionalen Simplexes aus der Gleichung 5.23 gewonnene Faktor f_k schreiben als

$$f_k = f_1^k, \quad (5.24)$$

wobei f_k das Volumenverhältnis von k -dimensionalen Simplexes und f_1 das Verhältnis der mittleren Ausdehnung der Punktwolken pro Dimension ist. In der logarithmischen Auftragung $\ln f_k(k)$ ergibt sich eine Gerade (Abb. 5.6)

$$\ln f_k = k \ln f_1, \quad (5.25)$$

aus deren Steigung man f_1 bestimmen kann. Das Volumenverhältnis der n -dimensionalen Punktwolken bestimmt man nun für $k = n$ aus Gleichung 5.24.

5.5.3 Vergleich von PCA und Simplexmethode

Um die beiden Verfahren zu testen, wurden zwei 10-dimensionale Punktwolken mit je 20000 Punkten und bekanntem Volumenverhältnis von 57.67

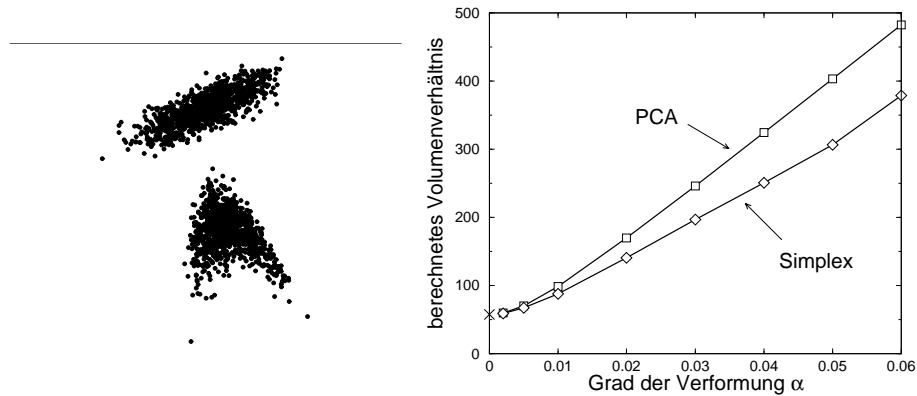


Abbildung 5.5: **Links:** Die Projektionen zweier Punktwolken (schematisch). Die Verbiegung der unteren Punktwolke ist zur Veranschaulichung viel größer als die maximale Verformung im Bild rechts. **Rechts:** Volumenverhältnis in Abhängigkeit vom Grad der Verformung.

erzeugt. Dabei sind die Punktwolken in alle Dimensionen gaußverteilt und haben ihren Mittelpunkt im Ursprung. Um den Vergleich möglichst realistisch zu gestalten, wurde die Breite σ der Gaußverteilungen mit dem Eigenwertspektrum $\mathbf{c} \in \mathbb{R}^{10}$ einer MD-Simulation multipliziert. Das bedeutet, die Punktwolke hat nur in einige Richtungen große Ausdehnungen, in die meisten aber relativ kleine Ausdehnungen. Um zu testen, wie empfindlich die beiden Methoden auf Unterschiede in der Form der Punktwolken reagieren, wurde eine der beiden Punktwolken gegenüber der anderen bei konstantem Volumen wie folgt verformt (vgl. Abbildung 5.5): Ist $\mathbf{x}^i = (x_1^i, \dots, x_{10}^i)$ der Ortsvektor des Punktes i der Punktwolke, so wurde die verformte Punktwolke mit dem Eigenwertspektrum $\mathbf{c} \in \mathbb{R}^{10}$ gemäß

$$x_j^i = x_j^i - \alpha \cdot e_j \cdot (x_j^i)^2, j = 1, \dots, 10 \quad (5.26)$$

berechnet, wobei α der Grad der Verformung ist, der hier zwischen 0 und 0.06 gewählt wurde. Abbildung 5.5 zeigt die berechneten Volumenverhältnisse in Abhängigkeit vom Grad der Verformung α . Man sieht, daß beide Verfahren die Entropie überschätzen, da ja das Volumenverhältnis eigentlich konstant sein sollte. Das Simplex-Verfahren ist jedoch stabiler gegenüber Abweichungen in der Form der Punktwolken. Es sollte also niedrigere und damit bessere Ergebnisse liefern. Der Vorteil des Simplex- gegenüber dem

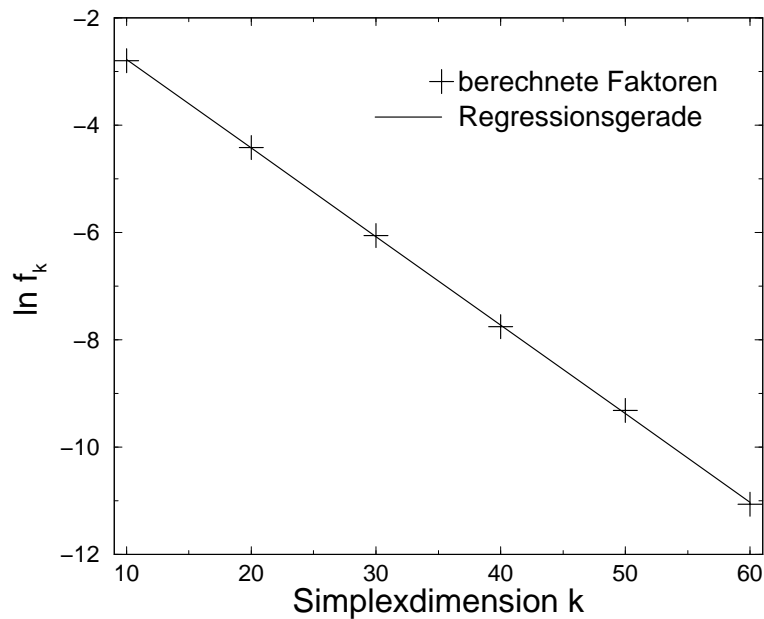


Abbildung 5.6: Aufgetragen ist der natürliche Logarithmus des mittleren Volumenverhältnisses k -dimensionaler Simplexes über die Simplexdimension k . Erklärung siehe Abschnitt 5.5.2.

PCA-Verfahren ist umso größer, je unähnlicher sich die Punktwolken (bezogen auf die Form, nicht auf die Größe) sind. Möglicherweise könnte man sogar den Fehler des Simplexergebnisses aus der Differenz der Ergebnisse abschätzen, was hier jedoch nicht weiter verfolgt wurde.

5.5.4 Ergebnisse der Entropieberechnung

Zur Berechnung der Entropie wurden zwei 4.6ns-Trajektorien der in Kapitel 4 gefundenen Zustände A und B benutzt. Der Farbstoff hat $N=59$ Atome und somit einen $3N=177$ -dimensionalen Konfigurationsraum. Aus der PCA erhält man:

$$\frac{\det \mathbf{C}_A}{\det \mathbf{C}_B} = 7.886 \cdot 10^{-32} \quad . \quad (5.27)$$

Mit 5.20 ergibt sich so eine Entropiedifferenz von

$$T(S_A - S_B) = T\Delta S_{AB}^{PCA} = -21.5 \frac{\text{kcal}}{\text{mol}} \quad . \quad (5.28)$$

Bei der Entropieberechnung mit Hilfe des Simplex-Verfahrens werden zunächst, wie in Abschnitt 5.5.2 beschrieben, k -dimensionale Simplexes mit

$k=[10, 20, 30, 40, 50, 60]$ „gewürfelt“. Daraus werden für jedes k jeweils für beide Punktwolken 100 kumulative Verteilungen berechnet und dann das mittlere Volumenverhältnis f_k bestimmt. Für die Verteilungen werden jedesmal 100 Simplicies in die Punktwolken gewürfelt. Aus der Steigung der Geraden in der logarithmischen Auftragung (vgl. Abb. 5.6) kann nun f_1 bestimmt werden:

$$f_1 = 0.84733 \quad .$$

Für das Volumenverhältnis erhalten wir mit Gleichung 5.24

$$\frac{V_A}{V_B} \equiv f_n = f_1^{177} = 1.842 \cdot 10^{-13} \quad ,$$

welche in Gleichung 5.21 eingesetzt die Entropiedifferenz

$$T\Delta S_{AB}^S = -17.6 \frac{\text{kcal}}{\text{mol}}$$

ergibt.

ΔS_{AB}^S ist betragsmäßig kleiner als ΔS_{AB}^{PCA} und sollte also, wie in Abschnitt 5.5.3 dargestellt, näher am richtigen Wert liegen, der allerdings betragsmäßig auch noch kleiner als ΔS_{AB}^S sein wird.

5.6 Diskussion der Ergebnisse

Zunächst wurde in Abschnitt 5.3 eine freie Energie-Landschaft zwischen den Zuständen A und B berechnet, woraus sich eine Differenz der freien Energie von $\Delta F \approx 1$ kcal/mol ergab. Dann wurde die Differenz der inneren Energie ($\Delta U_{AB} \approx (-10 \pm 5$ kcal/mol) abgeschätzt. Zustand A hat demnach also eine niedrigere Enthalpie als Zustand B. Die Ergebnisse der anschließenden Entropieberechnung zeigen, daß wegen $T\Delta S_{AB} \approx -18$ kcal/mol die Entropie in Zustand A kleiner als in B ist. Das ist auch verständlich, da Zustand A, wie in Abbildung 4.8 zu sehen ist, deutlich näher an der Oberfläche als Zustand B liegt und dadurch seine Bewegungsfreiheit stärker eingeschränkt ist. Da bei niedrigeren Temperaturen der Beitrag der Entropie zur freien Energie kleiner wird, wird sich die freie Energie zugunsten von Zustand A ändern, so daß A bei niedrigeren Temperaturen stärker besetzt sein wird. Legt man das hier berechnete ΔS_{AB} (das eine obere Grenze für die Entropiedifferenz darstellt) zugrunde, so würde eine Temperaturänderung

von 300 K auf 280 K die freie-Energie-Differenz ΔF bereits um ungefähr 1 kcal/mol senken, womit beide Zustände nahezu gleich wahrscheinlich besetzt wären.

Vergleicht man die beiden Kurven in Abbildung 5.2, so fällt auf, daß sie eine deutlich unterschiedliche Form haben. Die obere Kurve (hohe Ziehgeschwindigkeit) scheint in der Mitte eine breitere Energiebarriere zu haben, wobei die niedrigsten Energien an den Rändern, also näher an der Oberfläche liegen. Im Gegensatz dazu liegen die Energieminima der unteren Kurve (langsame Ziehgeschwindigkeit) näher zusammen und weiter von der Oberfläche entfernt. Woran liegt das und worin liegt der prinzipielle Unterschied dieser Kurven?

In 5.3 wurde bereits angedeutet, daß die schnelle Simulation dem Farbstoff vermutlich nicht genug Zeit läßt, während des Ziehvorgangs ins statistische Gleichgewicht zu kommen, während das beim langsamen Ziehen viel wahrscheinlicher ist.

Um diesen Effekt besser zu verstehen, soll er im Rahmen eines stark vereinfachten Modells diskutiert werden. Wir nehmen an, daß der Farbstoff in alle Richtungen senkrecht zur Ziehrichtung in einem harmonischen Potential diffundiert. Dazu werden folgende Annahmen gemacht:

1. Der Farbstoff diffundiert in seinem Konfigurationsraum in allen zur Ziehrichtung senkrechten Richtungen in einem harmonischen Potential (vgl. Abb. 5.7).
2. Die Temperaturabhängigkeit der inneren Energie E kann vernachlässigt werden.

Beim Ziehen des Farbstoffs von Zustand A nach B bewegt sich der Farbstoff aus einem engeren Potential (niedrigere Entropie) in ein weiteres Potential (höhere Entropie) (vgl. Abb. 5.7). Die Diffusionsbewegung senkrecht zur Ziehrichtung wird gemäß der Annahme 1. durch eine Langevin-Gleichung beschrieben, die für die i -te Dimension lautet:

$$\ddot{x}_i = -\gamma\dot{x}_i + A_i(t) - \omega_i^2 x_i \quad , \quad (5.29)$$

wobei ω_i die Kreisfrequenz des Farbstoffs in dem harmonischen Potential in

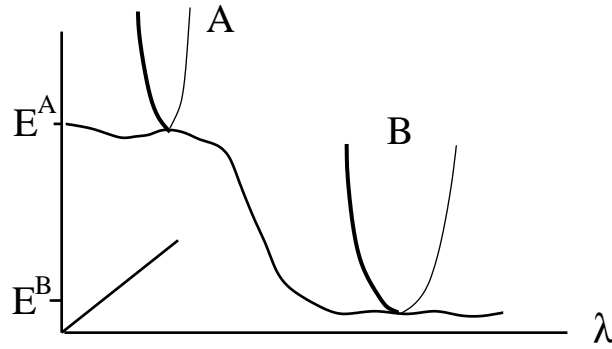


Abbildung 5.7: In Zustand A ist das genäherte harmonische Potential schmäler als in B. E^A bzw. E^B ist die innere Energie in Zustand A bzw. B

der i -ten Dimension, γ die Reibung und $A_i(t)$ ein stochastischer Kraftterm ist.

Das mittlere Verschiebungsquadrat $\langle x_i^2 \rangle$ ist nach [71] für die i -te Dimension:

$$\langle x_i^2 \rangle = \frac{k_B T}{m\omega_i^2} \left[1 - e^{-\gamma t} \left(2 \frac{\gamma^2}{\beta_i^2} \sinh^2 \frac{1}{2} \beta_i^2 t + \frac{\gamma}{\beta_i} \sinh \beta_i t + 1 \right) \right] \quad , \quad (5.30)$$

mit $\beta_i = (\gamma^2 - 4\omega_i^2)^{\frac{1}{2}}$.

Bei einer hohen Ziehgeschwindigkeit bleibt dem Farbstoff auf einem gegebenen Intervall $[\theta, \theta + \Delta\theta]$ nur eine kurze Zeit $t_s(\Delta\theta)$ zur Diffusion im Potential, während beim langsamen Ziehen diese Zeit $t_l(\Delta\theta)$ größer ist: $t_l > t_s$. Trägt man nun Gleichung 5.30 für zwei unterschiedlich breite Potentiale (unterschiedliche ω_i) auf (vgl. Abb. 5.8), so erkennt man, daß

$$1 < \frac{\langle x_i^2 \rangle^B(t_s)}{\langle x_i^2 \rangle^A(t_s)} < \frac{\langle x_i^2 \rangle^B(t_l)}{\langle x_i^2 \rangle^A(t_l)}$$

Analog zu Gleichung 5.21 gilt

$$\begin{aligned} \Delta S_{BA}^s &= \frac{1}{2} k_B \ln \frac{\prod \langle x_i^2 \rangle^B(t_s)}{\prod \langle x_i^2 \rangle^A(t_s)} \\ \Delta S_{BA}^l &= \frac{1}{2} k_B \ln \frac{\prod \langle x_i^2 \rangle^B(t_l)}{\prod \langle x_i^2 \rangle^A(t_l)} \end{aligned} \quad (5.31)$$

Damit ist die Entropiedifferenz beim schnellen Ziehen kleiner als beim langsamen Ziehen:

$$\Delta S_{BA}^l > \Delta S_{BA}^s \quad . \quad (5.32)$$

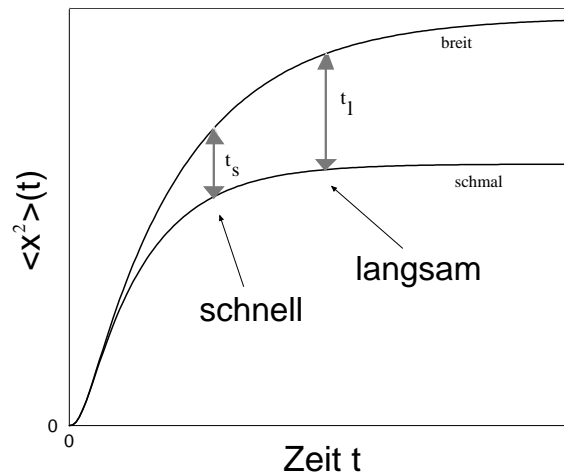


Abbildung 5.8: Das mittlere Verschiebungsquadrat in zwei unterschiedlich breiten harmonischen Potentialen. Das Verhältnis des mittleren Verschiebungsquadrats zwischen breitem und schmalen Potential ist nach kurzer Zeit kleiner (näher bei eins) als nach langer Zeit.

Das läßt sich auch schreiben als

$$\Delta S_{BA}^l = \alpha \Delta S_{BA}^s \quad , \quad \text{mit} \quad \alpha > 1 . \quad (5.33)$$

Allgemein gilt nun

$$\Delta F = \Delta U - T \Delta S$$

bzw.

$$\Delta F^l = \Delta U - T \Delta S^l \quad (5.34)$$

und ebenso

$$\Delta F^s = \Delta U - T \Delta S^s = \Delta U - T \frac{1}{\alpha} \Delta S^l \quad (5.35)$$

$$= \Delta U - T' \Delta S^l \quad (5.36)$$

$$\text{mit} \quad T' = \frac{T}{\alpha} < T \quad , \quad \text{da} \quad \alpha > 1 . \quad (5.37)$$

Aus Gleichung 5.30 erkennt man, daß das mittlere Verschiebungsquadrat proportional zur Temperatur ist. Mit Gleichung 5.31 bedeutet das, daß die Entropiedifferenzen in diesem Fall unabhängig von der Temperatur sind. Der

entropische Beitrag zur Differenz der freien Energie ist nach Gleichung 5.32 für eine höhere Ziegeschwindigkeit also geringer. Nach Gleichung 5.36 läßt sich dieser Effekt auch durch eine niedrigere Temperatur erzeugen. Demnach hat, unter den oben gemachten Annahmen, eine Erhöhung der Ziegeschwindigkeit den gleichen Effekt wie eine Verringerung der Temperatur.

Dieser Effekt kann zumindest in der Tendenz die unterschiedlichen Formen der Kurven in Abbildung 5.2 erklären. Danach würde die obere Kurve (hohe Ziegeschwindigkeit) die freie Energielandschaft bei einer niedrigeren Temperatur als die in der Simulation herrschenden 300 K darstellen. Das ist konsistent mit der Beobachtung, daß die in Abbildung 5.2 eingezeichneten mittleren Strukturen bei 280 K (1 und 4) weiter außen, also näher an der Oberfläche liegen, ähnlich den Minima der oberen Kurve in Abbildung 5.2.

Kapitel 6

Berechnung der Anisotropie

In diesem Kapitel sollen nun die Anisotropiezerfallskurven des Farbstoffs in den zuvor gefundenen zwei Zuständen aus MD-Simulationen berechnet werden. Es wird außerdem ein zur Interpretation von experimentellen Daten üblicherweise angewendetes Modell, das *wobbling-in-a-cone*-Modell, vorgestellt, das die Bewegung des Farbstoffs vereinfacht als Diffusion in einem Kegel beschreibt. Wir wollen dann die aus den MD-Simulationen berechneten Anisotropien mit dem *wobbling-in-a-cone*-Modell vergleichen. Abschließend wird eine einfache numerische Analyse den statistischen Fehler der hier bestimmten Anisotropiespektren liefern.

6.1 Theorie

Da der Farbstoff am Protein befestigt ist, ist seine Bewegung eingeschränkt. Eine der Fluoreszenzspektroskopie zugängliche Größe, die von der Bewegung des Farbstoffs abhängig ist, ist die Anisotropie $r(t)$ [30]. Im Experiment wird der Farbstoff mit polarisiertem Licht angeblitzt. Dabei wird er mit der Wahrscheinlichkeit $\sim \cos^2\omega$ angeregt, wobei ω den Winkel zwischen der Polarisationsrichtung \mathbf{n} des anregenden Lichts und der Richtung $\mathbf{a}(t)$ des Absorptionsdipolmomentes bezeichnet (vgl. Abb. 6.1). Nach einer Zeit τ gibt der Farbstoff das Photon mit einer Polarisationsrichtung $\mathbf{a}(t+\tau)$ wieder ab (hier wird angenommen, daß das Absorptionsdipolmoment parallel zum Emissionsdipolmoment orientiert ist, vgl. Kapitel 3). Die Wahrscheinlichkeit

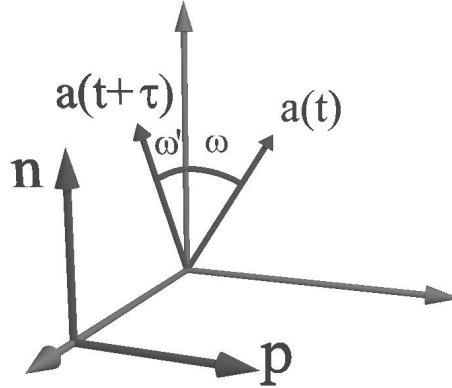


Abbildung 6.1: \mathbf{n} bezeichnet die Richtung der Polarisation des anregenden Lichts sowie des parallelen Detektors I_{\parallel} und \mathbf{p} die Richtung von I_{\perp} . $\mathbf{a}(t)$ ist die Richtung des Absorptionsdipolmoments zum Zeitpunkt der Absorption und $\mathbf{a}(t + \tau)$ die zum Zeitpunkt der Emission.

für den Durchgang durch einen Polarisator mit der Richtung \mathbf{n} beträgt dabei $\cos^2\omega'$, wobei ω' der Winkel zwischen der Polarisationsrichtung des abgegebenen Photons und der Polarisationsrichtung \mathbf{n} des anregenden Lichts ist. Bezeichnet nun I_{\parallel} (bzw. I_{\perp}) die Intensität des Lichts, das durch den parallel (bzw. senkrecht) zur Anregungsrichtung orientierten Polarisator fällt, dann ist die Anisotropie $r(t)$ wie folgt definiert:

$$r(\tau) = \frac{I_{\parallel}(\tau) - I_{\perp}(\tau)}{I_{\parallel}(\tau) + 2I_{\perp}(\tau)} \quad (6.1)$$

Aus der MD-Simulation läßt sich eine Trajektorie des Absorptionsdipolmoments $\mathbf{a}(t)$ berechnen. Die Intensitäten ergeben sich aus den Wahrscheinlichkeiten für die Anregung $\cos^2\omega = (\mathbf{n} \cdot \mathbf{a}(t))^2$, für den Durchgang des reflektierten Strahls durch den parallelen Polarisator $(\mathbf{n} \cdot \mathbf{a}(t' + \tau))^2$ und für den Durchgang durch den senkrechten Polarisator $(\mathbf{p} \cdot \mathbf{a}(t' + \tau))^2$ durch Mittelung über alle Orientierungen von $\mathbf{n}(\alpha, \varphi, \theta)$ bzw. $\mathbf{p}(\alpha, \varphi, \theta)$ und die

Gesamtlänge T der Trajektorie $\mathbf{a}(t)$:

$$I_{\parallel}(\tau) = \frac{1}{T - \tau} \int_0^{T-\tau} \frac{\int_0^{2\pi} \int_0^{2\pi} \int_0^{\pi} (\mathbf{n}(\alpha, \varphi, \theta) \cdot \mathbf{a}(t'))^2 (\mathbf{n}(\alpha, \varphi, \theta) \cdot \mathbf{a}(t' + \tau))^2 \sin \theta \, d\theta \, d\varphi \, d\alpha}{\int_0^{2\pi} \int_0^{2\pi} \int_0^{\pi} \sin \theta \, d\theta \, d\varphi \, d\alpha} dt' \quad (6.2)$$

$$I_{\perp}(\tau) = \frac{1}{T - \tau} \int_0^{T-\tau} \frac{\int_0^{2\pi} \int_0^{2\pi} \int_0^{\pi} (\mathbf{n}(\alpha, \varphi, \theta) \cdot \mathbf{a}(t'))^2 (\mathbf{p}(\alpha, \varphi, \theta) \cdot \mathbf{a}(t' + \tau))^2 \sin \theta \, d\theta \, d\varphi \, d\alpha}{\int_0^{2\pi} \int_0^{2\pi} \int_0^{\pi} \sin \theta \, d\theta \, d\varphi \, d\alpha} dt' \quad (6.3)$$

Die Vektoren $\mathbf{n}(\alpha, \varphi, \theta)$ bzw. $\mathbf{p}(\alpha, \varphi, \theta)$ gehen aus dem Einheitsvektor in y - bzw. x -Richtung durch drei Drehungen D_{α} , D_{θ} und D_{φ} hervor, so daß alle Orientierungen des Vektorpaars \mathbf{n} und \mathbf{p} beschrieben werden können:

$$D_{\alpha} = \begin{pmatrix} \cos \alpha & \sin \alpha & 0 \\ -\sin \alpha & \cos \alpha & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}, D_{\theta} = \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & \cos \theta & \sin \theta \\ 0 & -\sin \theta & \cos \theta \end{pmatrix}, D_{\varphi} = \begin{pmatrix} \cos \varphi & \sin \varphi & 0 \\ -\sin \varphi & \cos \varphi & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix},$$

wobei $\alpha = [0, 2\pi]$, $\theta = [0, \pi]$, $\varphi = [0, 2\pi]$. Damit ist

$$\mathbf{n}(\alpha, \theta, \varphi) = D_{\varphi} D_{\theta} D_{\alpha} \begin{pmatrix} 0 \\ 1 \\ 0 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \cos \varphi \sin \alpha + \sin \varphi \cos \alpha \cos \theta \\ -\sin \varphi \sin \alpha + \cos \varphi \cos \alpha \cos \theta \\ -\cos \alpha \sin \theta \end{pmatrix} \quad (6.4)$$

$$\mathbf{p}(\alpha, \theta, \varphi) = D_{\varphi} D_{\theta} D_{\alpha} \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \cos \varphi \cos \alpha - \sin \varphi \sin \alpha \cos \theta \\ -\sin \varphi \cos \alpha - \cos \varphi \sin \alpha \cos \theta \\ \sin \alpha \sin \theta \end{pmatrix} \quad (6.5)$$

Für den Grenzfall, daß sich der Farbstoff überhaupt nicht bewegt und das Absorptionsdipolmoment somit feststeht, ergibt sich aus den Mittelungen in den Gleichungen 6.2 und 6.3 durch Einsetzen in 6.1 eine limitierende Anisotropie r_0 von

$$r_0 = 0.4 \quad . \quad (6.6)$$

Die Anisotropie wird also nie einen größeren Wert als r_0 annehmen. Im folgenden wird ein Modell dargestellt, daß die Anisotropie in Beziehung zu einer Einschränkung der Bewegungsfreiheit des Farbstoffs setzt.

6.2 Das *wobbling-in-a-cone*-Modell

Dieses Modell wurde ursprünglich entwickelt, um die Anisotropie von Fluorophoren auf einer Membranoberfläche zu charakterisieren [30]. Es soll im folgenden auf unseren Fall des Farbstoffs an einer Proteinoberfläche angewendet werden.

Wir betrachten zunächst einen stabförmigen Farbstoff, der an einer Oberfläche befestigt ist und dessen Absorptionsdipolmoment parallel zu seiner Achse, also senkrecht zur Oberfläche steht. Im Rahmen des *wobbling-in-a-cone*-Modells wird die durch die Oberfläche verursachte Einschränkung der Bewegungsfreiheit des Farbstoffs durch ein Kastenpotential im Winkelraum mit unendlich hohen Wänden beschrieben. Beschreibt man nun die Bewegung des Farbstoffs durch eine einfache Diffusion innerhalb des durch das Kastenpotential vorgegebenen Kegels, so erhält man eine Näherung für die Anisotropie in diesem Modellsystem [30]:

$$\frac{r(t)}{r_0} = C_\infty + (1 - C_\infty)e^{-\frac{t}{\tau}} \quad , \quad (6.7)$$

wobei τ die Abklingzeit und $C_\infty = r_\infty/r_0$ ist, wobei r_∞ die stationäre Anisotropie ist, die vom Öffnungswinkel θ_{\max} des Kegels wie folgt abhängt:

$$C_\infty = \frac{r_\infty}{r_0} = \left[\frac{1}{2}(1 + \cos \theta_{\max}) \cos \theta_{\max} \right]^2 \quad . \quad (6.8)$$

In unserem Fall steht das Absorptionsdipolmoment allerdings senkrecht zur Längsachse des Farbstoffs (vgl. Abb. 3.5) und somit parallel zur Oberfläche, so daß sich das Absorptionsdipolmoment nur außerhalb eines Kegels bewegen kann (siehe Abb. 6.2). Die genäherte Lösung des Ausdrucks für die Anisotropie hat wieder die Form [30]:

$$\frac{r(t)}{r_0} = C_\infty + (1 - C_\infty)e^{-\frac{t}{\tau}} \quad , \quad (6.9)$$

diesmal mit

$$C_\infty = \frac{r_\infty}{r_0} = \left[\frac{1}{2}(1 - \cos^2(\theta_{\min})) \right]^2 \quad . \quad (6.10)$$

r_∞/r_0 kann hier aufgrund der freien Bewegung um die z -Achse nicht größer als 0.25 werden.

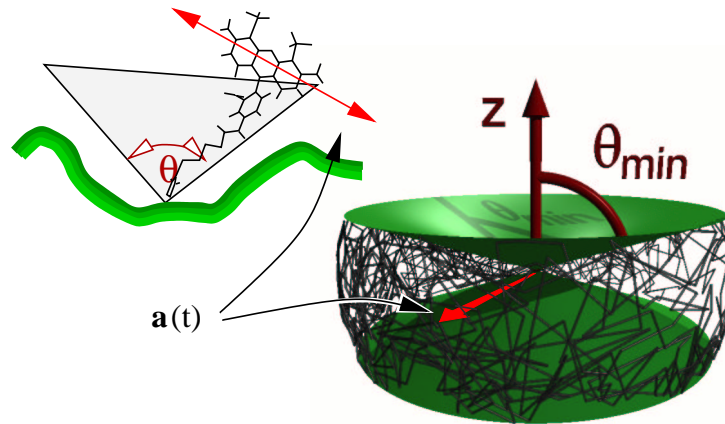


Abbildung 6.2: Das Absorptionsdipolmoment $\mathbf{a}(t)$ (in hellrot) steht senkrecht zur Längsachse des Farbstoffs; es bewegt sich daher in einem Raumwinkelbereich zwischen zwei Kegeln mit dem Öffnungswinkel θ_{\min} .

Die Anisotropie ist für kleine t gegeben durch [30]:

$$\frac{r(t)}{r_0} = 1 - 6D_w t \quad , \quad (6.11)$$

so daß sich aus der Anfangssteigung von $r(t)$ direkt die Diffusionskonstante D_w der „Wackelbewegung“ bestimmen läßt. Für kleine t kann die Gleichung 6.9 auch durch

$$r(t) = 1 - \frac{1 - C_\infty}{\tau} t \quad (6.12)$$

genähert werden. Durch Vergleich mit Gleichung 6.11 ergibt sich für eine gegebene Diffusionskonstante D_w eine Abhängigkeit der Abklingzeit τ von $C_\infty(\theta_{\min})$ und damit auch von θ_{\min} . Es gilt also

$$\frac{1 - C_\infty^A}{\tau^A} = \frac{1 - C_\infty^B}{\tau^B} \quad . \quad (6.13)$$

Bei festem D_w muß bei einer Erhöhung von C_∞ , also bei einer Einschränkung der Bewegungsfreiheit, die Abklingzeit τ kleiner werden. Der stationäre Zustand ist also schneller erreicht.

6.3 Simulationen zur Berechnung der Anisotropie

Statt von einer einfachen Diffusion des Absorptionsdipolmoments in einem Kastenpotential auszugehen, soll nun die Anisotropie des Farbstoffs direkt und ohne einschränkende Annahmen aus einer MD-Trajektorie berechnet werden. Bestimmt man die Richtung des Absorptionsdipolmoments in einem Farbstoff-internen Koordinatensystem, so läßt sich aus einer gegebenen Konfiguration des Farbstoffs zu diskreten Zeitpunkten t_i die Richtung des Absorptionsdipolmoments $\mathbf{a}(t_i)$ der Trajektorie berechnen. Die Integrationen über die Winkel θ, φ, α in den Gleichungen 6.2 und 6.3 lassen sich bei Verwendung der Definitionen von \mathbf{n} und \mathbf{p} (vgl. Gleichungen 6.4 und 6.5) analytisch ausführen, so daß man einen Ausdruck erhält, der sowohl von der Richtung des Absorptionsdipolmoments $\mathbf{a}(t_i) =: (a_x, a_y, a_z)$ zum Zeitpunkt der Anregung und $\mathbf{a}(t_i + \tau_j) =: (c_x, c_y, c_z)$ zum Zeitpunkt der Emission als auch von der Zeit τ_j abhängt.

$$I_{\parallel} = \frac{1}{T - \tau_j} \sum_{t_i=0}^{T-\tau_j} \frac{1}{15} (a_y^2 c_x^2 + a_x^2 c_z^2 + a_z^2 c_y^2 + 3a_x^2 c_x^2 + 3a_z^2 c_z^2 + 4a_x a_z c_x c_z + a_z^2 c_x^2 + 4a_y a_z c_y c_z + 4a_x a_y c_x c_y + a_y^2 c_z^2 + a_y^2 c_y^2 + a_x^2 c_y^2) \quad (6.14)$$

$$I_{\perp} = \frac{1}{T - \tau_j} \sum_{t_i=0}^{T-\tau_j} \frac{1}{15} (2a_y^2 c_x^2 + 2a_x^2 c_z^2 + 2a_z^2 c_y^2 + a_x^2 c_x^2 + a_z^2 c_z^2 - 2a_x a_z c_x c_z + 2a_z^2 c_x^2 - 2a_y a_z c_y c_z - 2a_x a_y c_x c_y + 2a_y^2 c_z^2 + a_y^2 c_y^2 + 2a_x^2 c_y^2) \quad , \quad (6.15)$$

wobei T die Gesamtlänge der Trajektorie, I_{\parallel} bzw. I_{\perp} die Intensität am parallelen bzw. senkrechten Detektor ist. Durch Einsetzen dieser beiden Ausdrücke in Gleichung 6.1 läßt sich nun die Anisotropie $r(t_i)$ berechnen:

$$r(\tau_j) = \frac{I_{\parallel}(\tau_j) - I_{\perp}(\tau_j)}{I_{\parallel}(\tau_j) + 2I_{\perp}(\tau_j)} \quad (6.16)$$

Zur Berechnung der Anisotropie des Farbstoffs in den beiden Zuständen A und B wurde je eine 4.7ns-Trajektorie der in Abschnitt 4.2.5 beschriebenen MD-Simulationen verwendet. Da der Farbstoff in der Simulation bei 300 K

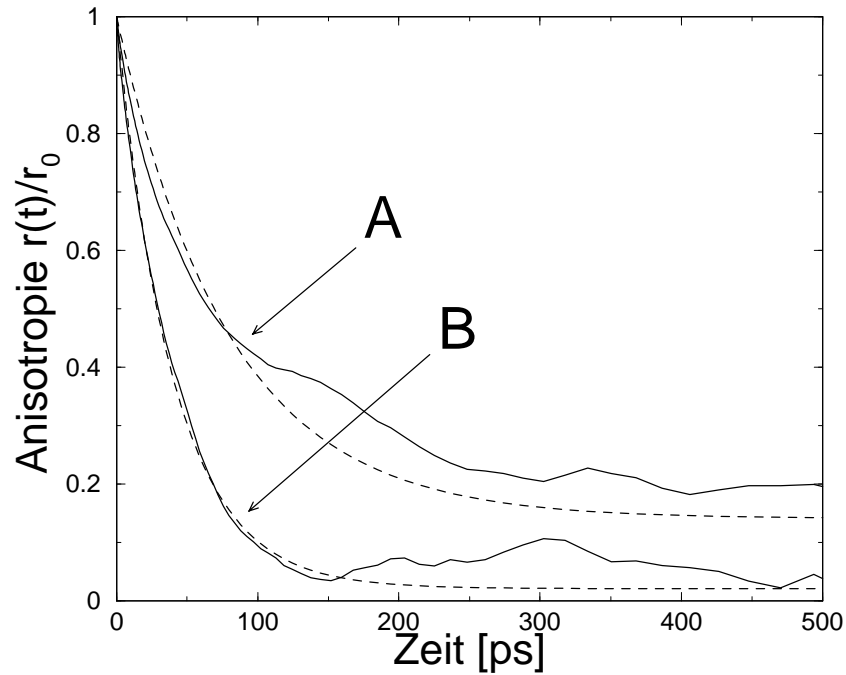


Abbildung 6.3: Anisotropiekurven des Farbstoffs in den Zuständen A und B berechnet aus MD-Simulationen (durchgezogene Linie) und gefittet nach dem *wobbling-in-a-cone* Modell (gestrichelte Linie).

nicht lange genug stabil in Zustand A blieb, wurde eine 4.7ns-Trajektorie aus einer Simulation bei 280 K ausgewählt. Die Dynamik des Farbstoff bei dieser niedrigeren Temperatur ist aufgrund einer kleineren Diffusionskonstante gegenüber der Dynamik bei 300 K verlangsamt, so daß die Abklingzeit τ bei 280 K größer ist als bei 300 K. Die Rotationskorrelationszeit τ_R hängt umgekehrt proportional von der Temperatur ab [1]. Demnach ergibt sich die Abklingzeit bei 300 K aus der bei 280 K gemäß

$$\tau_{300\text{K}} = \frac{280}{300} \tau_{280\text{K}} \quad (6.17)$$

6.4 Ergebnisse

Abbildung 6.3 zeigt die aus den beiden Simulationen berechneten Anisotropieabklingkurven. Ein Fit nach dem Modell von Gleichung 6.9 ergibt für

Zustand A

$$\begin{aligned}\tau_{280\text{K}}^A &= 79.5 \text{ ps} \stackrel{(6.17)}{\rightsquigarrow} \tau_{300\text{K}}^A = 74.2 \text{ ps} \\ C_\infty^A &= 0.140\end{aligned}$$

und für Zustand B

$$\begin{aligned}\tau_{300\text{K}}^B &= 40.2 \text{ ps} \\ C_\infty^B &= 0.021\end{aligned}$$

Es fällt auf, daß die Abklingzeiten τ^A und τ^B deutlich voneinander abweichen. Ob dieser Unterschied signifikant ist oder ob lediglich der Fehler bei dieser Berechnung so groß ist, wird in Abschnitt 6.5 diskutiert. Mit dem *wobbling-in-a-cone*-Modell läßt sich nun auch der Öffnungswinkel des Kegels angeben, außerhalb dessen sich das Absorptionsdipolmoment des Farbstoffs bewegt. Aus Gleichung 6.10 folgt

$$\theta_{\min} = \arccos \left(\sqrt{1 - 2 \sqrt{\frac{r_\infty}{r_0}}} \right) . \quad (6.18)$$

Damit erhält man für die Zustände A und B die Kegelöffnungswinkel

$$\begin{aligned}\theta_{\min}^A &= 59.9^\circ \\ \theta_{\min}^B &= 32.6^\circ .\end{aligned} \quad (6.19)$$

Nun wollen wir untersuchen, wie gut das *wobbling-in-a-cone* Modell die Bewegung des Farbstoffs beschreibt. Aus der MD-Simulation wurde eine Trajektorie des Absorptionsdipolmomentvektors gewonnen. Zum Vergleich der Winkelverteilungen des Winkels θ zwischen *wobbling-in-a-cone* Modell und MD-Simulation mußte eine der z-Achse in Abbildung 6.2 entsprechende Richtung für die Trajektorie des Absorptionsdipolmomentvektors gefunden werden. Diese z-Achse wurde hier nun so gewählt, daß die Varianz der Projektion der Dipolmomenttrajektorie minimal wird. Nun läßt sich der Winkel $\theta(t)$ zwischen Absorptionsdipolmoment und z-Achse und seine Verteilung berechnen (vgl. ,Abb. 6.4). Die so erhaltenen Verteilungen der Winkel θ werden gut durch eine Gaußverteilung angenähert, das bedeutet, das Potential,

in dem sich das Absorptionsdipolmoment bewegt, ist näherungsweise harmonisch und hat die Form:¹

$$P(\theta) \sim \sin(\theta) e^{-\frac{(\theta-\theta_0)^2}{2\sigma^2}} \quad .$$

Ein Fit nach diesem Modell ergibt nun für die Breite σ und daraus mit $\theta_{\min} = 90^\circ - \sigma$ einen Öffnungswinkel des „Kegels“

$$\sigma_A = 26.3^\circ \quad \rightsquigarrow \quad \theta_{\min}^A = 63.7^\circ$$

$$\sigma_B = 45.6^\circ \quad \rightsquigarrow \quad \theta_{\min}^B = 44.4^\circ$$

Diese Winkel stimmen tendenziell mit denen aus dem *wobbling-in-a-cone*-Modell (Gleichung 6.19) überein. Sie haben hier jedoch eine andere Bedeutung: Sie beschreiben eine Gaußverteilung in einem harmonischen Potential, während die Winkel aus dem *wobbling-in-a-cone*-Modell die Grenzen eines Kastenpotentials beschreiben. Die Verteilung der Winkel, die das *wobbling-in-a-cone*-Modell liefert, ist ebenfalls in Abbildung 6.4 eingezeichnet (dicke Linie). Die Annahme eines harmonischen Potentials beschreibt, wie aus der Abbildung ersichtlich, die Bewegung des Farbstoffs wesentlich besser als die Annahme eines Kastenpotentials.

6.5 Fehlerbetrachtung

Eine wesentliche Fehlerquelle bei der Berechnung der Anisotropie aus einer MD-Simulation besteht im unzureichenden Sampling. Dieses Problem tritt auf, wenn die Trajektorienlänge bezüglich einer gegebenen Diffusionskonstanten D_w nicht deutlich länger ist als die Relaxationszeit des Systems, die von D_w abhängt. Das Absorptionsdipolmoment hat dann nicht genügend Zeit, seinen ihm prinzipiell zugänglichen Raumwinkelbereich vollständig zu überstreichen. Um diesen Fehler abzuschätzen, müßte man eigentlich viele MD-Trajektorien berechnen. Dies ist jedoch viel zu rechenaufwendig und daher nicht praktikabel. Das *wobbling-in-a-cone*-Modell beschreibt zwar die Winkelverteilung nicht genau, es kann jedoch angenommen werden, daß der hier abzuschätzende statistische Fehler nur geringfügig von der speziellen

¹ Wäre die Bewegung des Absorptionsdipolmoments nicht eingeschränkt, so ergäbe sich für die Winkelverteilung $P(\theta) \sim \sin \theta$.

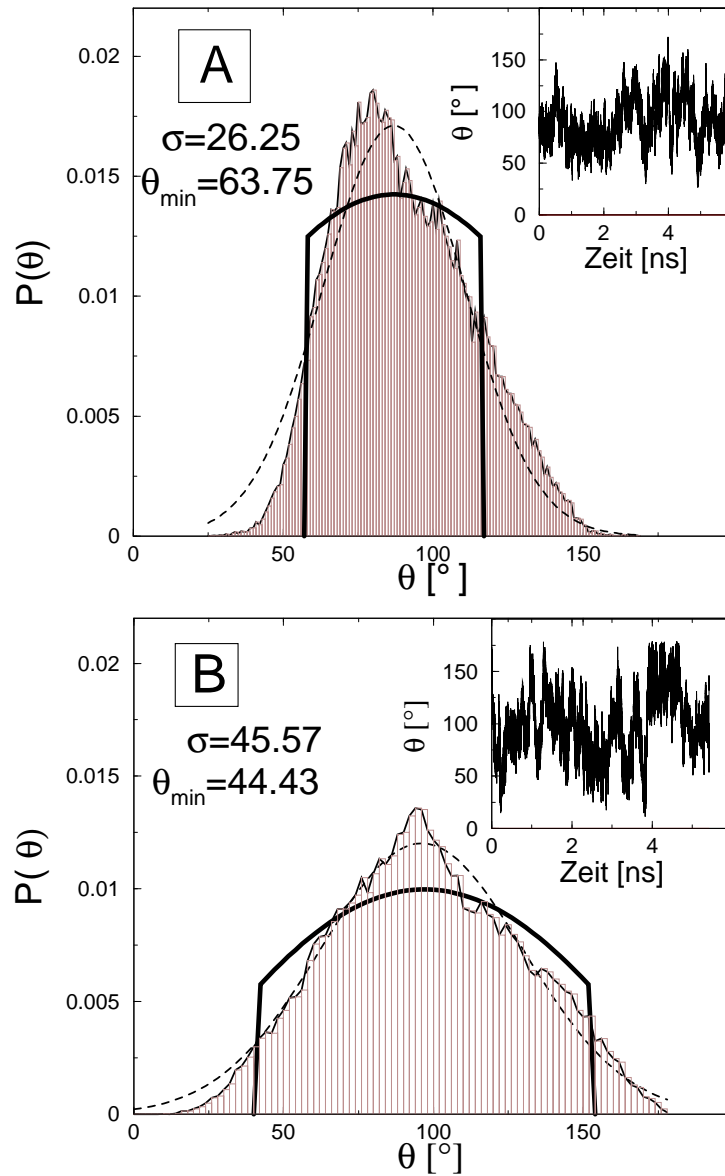


Abbildung 6.4: Verteilung der Winkel zwischen Absorptionsdipolmoment und Richtung des Öffnungswinkels für Zustand A (oben) und Zustand B (unten). Eingetragen der Fit einer Gaußfunktion (gestrichelte Linie) und der Verteilung aus dem *wobbling-in-a-cone*-Modell (dicke Linie). Der Winkel θ aufgetragen über die Simulationszeit (Diagramm jeweils oben rechts).

Winkelverteilung abhängt. Daher soll nun der Fehler mit einer einfachen statistischen Analyse unter Verwendung des *wobbling-in-a-cone* Modells abgeschätzt werden. Eine analytische Beschreibung wäre an dieser Stelle recht aufwendig, daher haben wir dieses Problem numerisch behandelt.

Dazu wurde die Diffusionsbewegung eines Richtungsvektors ($\hat{=}$ Absorptionsdipolmoment) außerhalb zweier Kegel, wie im *wobbling-in-a-cone*-Modell angenommen und in Abbildung 6.2 dargestellt, numerisch berechnet. Es wird also eine Diffusionsbewegung im zweidimensionalen Winkelraum (Raumwinkel θ und φ) berechnet, wobei der Winkel θ auf das Intervall $[\theta_{\min}, 180^\circ - \theta_{\min}]$ eingeschränkt ist und die Winkelschrittweite der Winkel θ und φ gaußverteilt zufällig bestimmt wurde. Die so erhaltene Trajektorie soll die MD-Trajektorie für diese Betrachtung ersetzen. Berechnet man nun so eine Diffusionstrajektorie einer vorgegeben Länge, so läßt sich daraus, wie oben beschrieben, ebenfalls eine Anisotropieabklingkurve berechnen. An diese Kurve läßt sich nun (ebenfalls wie oben) das *wobbling-in-a-cone*-Modell fitten, und man erhält sowohl die Abklingzeit als auch den Öffnungswinkel des Kegels für diese spezielle Diffusionstrajektorie. Wiederholt man das nun einige hundertmal, so erhält man Verteilungen von Abklingzeiten und Öffnungswinkeln, woraus sich nun der statistische Fehler berechnen läßt.

Um den Fehler der Ergebnisse aus dem vorigen Abschnitt abzuschätzen, wurde dieses Verfahren für beide Zustände A und B durchgeführt. Dabei wurden die Öffnungswinkel $\theta_{\min}^A = 59.9^\circ$ für Zustand A und $\theta_{\min}^B = 32.6^\circ$ für Zustand B benutzt. Die Standardabweichungen σ_A und σ_B der Winkelschrittweiten für die Zustände A und B wurden so gewählt, daß die Abklingzeiten $\tau^A=74.2$ ps und $\tau^B=40.2$ ps ungefähr reproduziert wurden:

$$\sigma_A = 0.0225^\circ/100\text{fs}$$

$$\sigma_B = 0.0335^\circ/100\text{fs}$$

Dann wurden für beide Zustände A und B je 100 Trajektorien der gleichen Länge wie die der MD-Trajektorien (4.7ns) berechnet und für jede Trajektorie aus dem Fit nach Gleichung 6.9 die Parameter τ und C_∞ wie oben aus der MD-Trajektorie bestimmt. Daraus lassen sich nun die Streuungen der Parameter berechnen:

$$\begin{aligned}
\bar{\tau}^A &= 76.04 \text{ ps} & \Delta\tau^A &= 13.16 \text{ ps} \\
\bar{C}_\infty^A &= 0.148 & \Delta C_\infty^A &= 0.044
\end{aligned} \tag{6.20}$$

$$\begin{aligned}
\bar{\tau}^B &= 40.86 \text{ ps} & \Delta\tau^B &= 4.21 \text{ ps} \\
\bar{C}_\infty^B &= 0.016 & \Delta C_\infty^B &= 0.021
\end{aligned} \tag{6.21}$$

6.6 Diskussion

Wie oben bereits erwähnt, fällt auf, daß τ^A deutlich größer ist als τ^B . Diese Differenz läßt sich, wie die Fehlerrechnung zeigt, nicht allein durch den statistischen Fehler erklären. Nach Gleichung 6.13 würde man bei gleicher Diffusionskonstante jedoch erwarten, daß τ^A sogar kleiner als τ^B ist, da in Zustand A die stationäre Anisotropie C_∞^A größer ist. Die folgende Rechnung zeigt dies konkret mit Hilfe der eben bereits verwendeten einfachen numerischen Berechnung der Diffusionstrajektorie des Absorptionsdipolmoments. Hier wurde die gleiche Winkelschrittweite (gleiche Diffusionskonstante) wie oben für den Zustand B benutzt ($\sigma_B=0.0335^\circ/100\text{fs}$), der Winkel θ_{\min} nun aber wie vorher bei Zustand A mit $\theta_{\min} = 59.9^\circ$ gewählt. Daraus sieht man, daß sich die Zeit τ^A tatsächlich verkürzt:

$$\begin{aligned}
\bar{\tau}^A &= 33.98 \text{ ps} & \Delta\tau^A &= 3.15 \text{ ps} \\
\bar{C}_\infty^A &= 0.149 & \Delta C_\infty^A &= 0.021
\end{aligned}$$

Dieses Ergebnis spricht dafür, daß die Diffusionskonstante des Farbstoffs in Zustand A kleiner ist als in Zustand B. Ebenso ist in Abbildung 6.3 die anfängliche Steigung der Kurve zu B kleiner als diejenige der Kurve zu A, was mit Gleichung 6.11 diese Aussage bestätigt. Ein möglicher Grund für das Auftreten unterschiedlicher Diffusionskonstanten ist, daß die Wassermoleküle nahe der Proteinoberfläche aufgrund von spezifischen Wasserstoffbrücken mit dem Protein orientiert sind, also bestimmte Vorzugsausrichtungen haben. Eine Umordnung der Wassermoleküle, die bei der Diffusion des Farbstoffs durch das Wasser notwendig ist, kostet damit mehr Energie als

im freien Wasser und wird deshalb unwahrscheinlicher. Das verringert die Diffusionskonstante.

Abschließend wurde eine Rechnung mit den gleichen Parametern wie für das Ergebnis 6.21, jedoch mit der doppelten Trajektorienlänge von 9.4 ns durchgeführt, um zu untersuchen, wie groß der Fehler für eine längere Trajektorie wäre. Die Ergebnisse

$$\begin{aligned}\bar{\tau}^B &= 40.39 \text{ ps} & \Delta\tau^B &= 2.94 \text{ ps} \\ \bar{C}_\infty^B &= 0.0152 & \Delta C_\infty^B &= 0.011\end{aligned}$$

zeigen, daß sich der (statistische) Fehler der Abklingzeit τ um 30 % und bei der stationären Anisotropie C_∞ um 46 % verringert. Mit diesem Verfahren läßt sich nun also abschätzen, wie lang eine Trajektorie mindestens sein muß, damit bei gegebener Diffusionskonstante des Farbstoffs ein bestimmter Fehler nicht überschritten wird.

Kapitel 7

Ein einfaches Membranmodell

In diesem Kapitel soll nun die Kraft abgeschätzt werden, die der SNARE-Komplex aufwenden muß, um die Coulombabstoßung zwischen Vesikel- und Plasmamembran, die beide negativ geladen sind, zu überwinden und die Membranen aneinanderzuziehen. Auch der SNARE-Komplex, der zwischen den Membranen liegt, trägt eine negative Gesamtladung, wobei aber der Teil des Komplexes, der der später gebildeten Fusionspore zugewandt ist, eine positive Teilladung besitzt. Diese positive Ladung könnte die Abstoßung der Membranen gerade dort verringern, wo die Membranen später miteinander verschmelzen sollen [72]. Es wird vermutet, daß mehrere SNARE-Komplexe an der Fusion beteiligt sind, was den Effekt der Abschirmung der negativen Ladungen der gegenüberliegenden Membranen verstärken sollte. Auf die Membranen wirken also Kräfte aufgrund von elektrostatischen Wechselwirkungen sowohl mit der jeweils anderen Membran als auch mit dem SNARE-Komplex. Es wurden bereits viele Modelle entwickelt, die die Abstoßung von zwei Membranen beschreiben [73]; hier soll jedoch zusätzlich die Ladungsverteilung des SNARE-Komplexes berücksichtigt werden, was bisher noch nicht gemacht wurde. Um abzuschätzen, wie groß diese Kräfte sind und wie sich die Membranen in diesem System verhalten, wurde ein stark vereinfachtes Modell entwickelt, das im folgenden vorgestellt wird.

7.1 Beschreibung des Membranmodells

Mit diesem Modell soll ein Gleichgewichtszustand von zwei Membranen gefunden werden, zwischen denen vier SNARE-Komplexe sternförmig angeordnet sind (vgl. Abb. 7.2). Dazu wird eine MD-Simulation mit einem stark vereinfachten Kraftfeld, bestehend aus lediglich drei Energietermen, verwendet. Jeder der SNARE-Komplexe ist in beiden Membranen an je einem Punkt verankert. Die Struktur der SNARE-Komplexe wird hierbei fixiert, so daß auch die Ankerpunkte in den Membranen fixiert sind. Aus der Röntgenstruktur des SNARE-Komplexes läßt sich für den vollständig assoziierten Komplex (der Zustand in Schritt III aus Abbildung 1.2) ein Membranabstand von etwa 30 \AA schätzen. Da hier jedoch der Prozeß des Aneinanderziehens, also Schritt II in Abbildung 1.2, untersucht werden soll, wird der anfängliche Abstand der Membranen mit 50 \AA so gewählt, daß zum einen die Abstoßung der Membranen nicht mehr durch Hydrationskräfte oder durch das Vorspringen einzelner Lipide („*protrusions*“)[73], die eine Reichweite von etwa 10 \AA haben, sondern im wesentlichen von der Elektrostatik bestimmt wird. Zum anderen sollte der Abstand auch klein genug sein, um die Näherung rechtfertigen zu können, die durch die Verwendung der Struktur des vollständig assoziierten SNARE-Komplexes vorgenommen wird.

Die Membran wird nun als geladene elastische Fläche mit einem Gittermodell beschrieben. Es wird angenommen, daß 10% aller Lipide geladen sind [74, 75]. Die Ladungen wurden in jedem Integrationsschritt neu auf 10% aller Gitterpunkte zufällig verteilt, um der lateralen Diffusion der Ladungen Rechnung zu tragen. Im zeitlichen Mittel trägt dann also jeder Gitterpunkt eine Ladung von $0.1 e$. Pro Membran wurden 10000 Gitterpunkte mit einem Abstand von je 5 \AA verwendet, der ungefähr dem mittleren Abstand von Lipiden entspricht.

Die verwendeten Energieterme

In diesem Modell werden drei Energieterme berücksichtigt:

1. Die Coulombwechselwirkungen zwischen den Ladungen der Membranen und zwischen denen der Membranen und der SNARE-Komplexe
2. Die Elastizität der Membranen

3. Die Bindungen zwischen den Gitterpunkten: Sie werden durch ein harmonisches Potential beschrieben, das ausreichend stark sein muß, um die Topologie des Gitters zu erhalten, aber so schwach ist, daß bei einer Verbiegung der Membran die Kräfte viel kleiner sind als die des Elastizitätsterms.

Da keine expliziten Wassermoleküle mitgerechnet werden sollen, wird bei der Berechnung der Coulombwechselwirkung sowohl die Elektrizitätskonstante des Wassers ($\epsilon_r^w \approx 80$) als auch die Verteilung von Ionen in physiologischer Konzentration mit Hilfe der Debye-Hückel-Theorie [64, 1] berücksichtigt (vgl. Kapitel 2). Daraus ergibt sich der folgende Energieterm für die elektrostatische Wechselwirkung:

$$U_q = \frac{1}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r^w} \frac{q_i q_j}{r} e^{\frac{r_{ij}}{K_D}} \quad , \quad (7.1)$$

wobei r_{ij} der Abstand zwischen den Ladungen q_i und q_j ist und K_D die Debye-Hückel-Länge bezeichnet, die bei physiologischer Konzentration etwa 10 Å beträgt.

Die Elastizitätsenergie der Membran pro Fläche beträgt nach Ref.[76]:

$$U_e = \frac{1}{2} K_e (c_x(\mathbf{x}_{i,j}) + c_y(\mathbf{x}_{i,j}))^2 \quad . \quad (7.2)$$

Dabei sind $c_x(\mathbf{x}_{i,j})$ und $c_y(\mathbf{x}_{i,j})$ die lokalen Krümmungen in die x- und y-Richtung parallel zur Membran an den Gitterpunkten $\mathbf{x}_{i,j}$. Für die Elastizitätskonstante wird $K_e = 1.0 \times 10^{-19} \text{J}$ gewählt [76]. Die Krümmung c ist durch den Krümmungsradius R mit $c = 1/R$ gegeben. Abbildung 7.1 und einfache trigonometrische Überlegungen liefern

$$c_x = \frac{\sin \beta_x}{h} \quad ,$$

wobei h den Abstand der Gitterpunkte bezeichnet und die Auslenkung der Gitterpunkte näherungsweise nur in z-Richtung erfolgt. Mit dem Vektorprodukt läßt sich $\sin \beta_x$ auch schreiben als

$$\sin \beta_x(\mathbf{x}_{i,j}) = \frac{|(\mathbf{x}_{i-1,j} - \mathbf{x}_{i,j}) \times (\mathbf{x}_{i,j} - \mathbf{x}_{i+1,j})|}{|\mathbf{x}_{i-1,j} - \mathbf{x}_{i,j}| \cdot |\mathbf{x}_{i,j} - \mathbf{x}_{i+1,j}|} \quad . \quad (7.3)$$

Damit ergibt sich der hier benutzte Energieterm der Elastizität:

$$U_e = \frac{1}{2} \frac{K_e}{h^2} \sum_{1 < i, j < 100} \left[\frac{|(\mathbf{x}_{i-1,j} - \mathbf{x}_{i,j}) \times (\mathbf{x}_{i,j} - \mathbf{x}_{i+1,j})|}{|\mathbf{x}_{i-1,j} - \mathbf{x}_{i,j}| \cdot |\mathbf{x}_{i,j} - \mathbf{x}_{i+1,j}|} \right] +$$

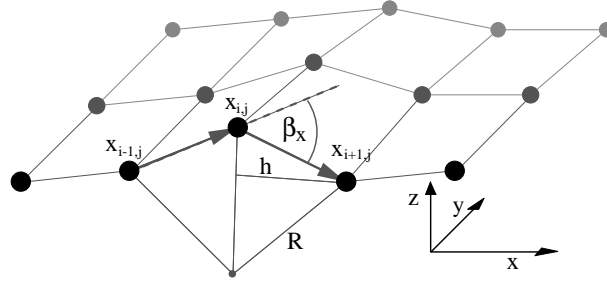


Abbildung 7.1: Das Gittermodell einer Membran mit Gitterpunkten $\mathbf{x}_{i,j}$, dem Gleichgewichtsabstand h der Gitterpunkte, dem Krümmungsradius R und dem Winkel β_x zwischen $(\mathbf{x}_{i,j} - \mathbf{x}_{i-1,j})$ und $(\mathbf{x}_{i,j} - \mathbf{x}_{i+1,j})$.

$$\left[\frac{(\mathbf{x}_{i,j-1} - \mathbf{x}_{i,j}) \times (\mathbf{x}_{i,j} - \mathbf{x}_{i,j+1})}{|\mathbf{x}_{i,j-1} - \mathbf{x}_{i,j}| \cdot |\mathbf{x}_{i,j} - \mathbf{x}_{i,j+1}|} \right]^2. \quad (7.4)$$

Diese Beschreibung gilt jedoch nur für Verbiegungen auf Längenskalen, die größer sind als die Dicke der Membran ($\approx 50 \text{ \AA}$) [77].

Der dritte Energieterm beschreibt die Bindungen zwischen den Gitterpunkten durch harmonische Potentiale:

$$U_b = \frac{1}{2} K_b \sum_{1 < i, j < 100} [(|\mathbf{x}_{i-1,j} - \mathbf{x}_{i,j}| - x_0)^2 + (|\mathbf{x}_{i+1,j} - \mathbf{x}_{i,j}| - x_0)^2 + (|\mathbf{x}_{i,j-1} - \mathbf{x}_{i,j}| - x_0)^2 + (|\mathbf{x}_{i,j+1} - \mathbf{x}_{i,j}| - x_0)^2]^2, \quad (7.5)$$

mit dem Gleichgewichtsabstand x_0 , der hier wie oben beschrieben zu 5 \AA gewählt wurde. Zur Simulation wurde der in Kapitel 2 beschriebene *leap-frog*-Algorithmus verwendet. Da hier aber nicht nach der Dynamik, sondern lediglich nach dem Gleichgewichtszustand gefragt ist, wird die Reibung stark erhöht, um die Energie zu minimieren. So kann die Integrationsschrittweite größer gewählt werden ($\Delta t = 500 \text{ ps}$), da kleine Fluktuationen unterdrückt werden, wodurch die Rechenzeit zusätzlich verkürzt wird. Es wird hier also keineswegs eine realistische Dynamik einer Membran beschrieben. Die Randgitterpunkte werden aus Gründen der Stabilität am Rand in x - und y -Richtung festgehalten, sie können sich also nur in z -Richtung bewegen.

Der SNARE-Komplex besitzt je einen Membrananker in der Vesikel- und in der Plasmamembran. Diese werden in dem Modell durch das Festhalten von Gitterpunkten berücksichtigt. Die Kraft, die auf den SNARE-

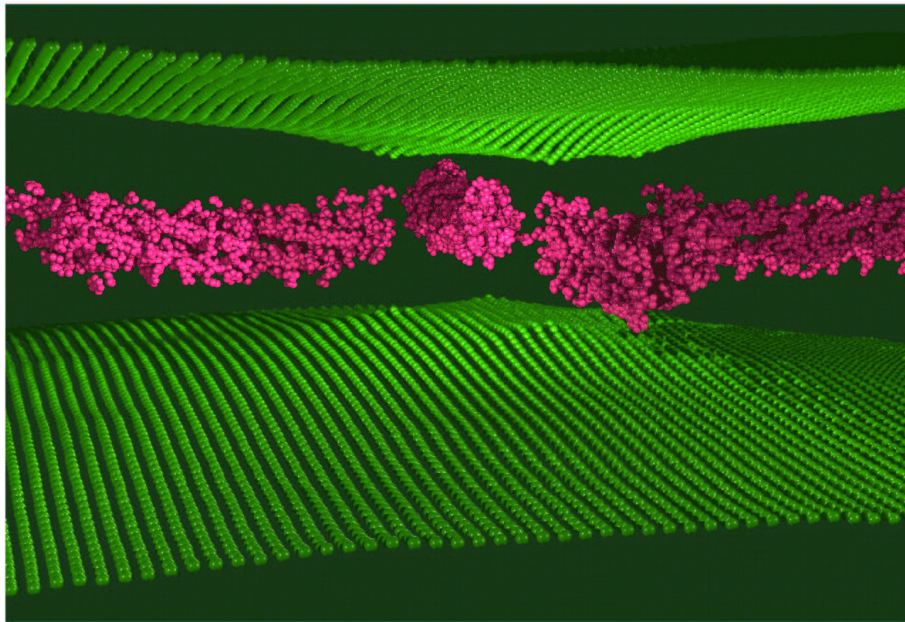


Abbildung 7.2: Der Gleichgewichtszustand des Modellsystems. Die vier SNARE-Komplexe (rot) zwischen zwei Membranen (grün). Die elastischen Membranen sind aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen verbogen.

Komplex wirkt, ist somit gleich der elastischen Kraft, die sich aus der lokalen Krümmung am festgehaltenen Punkt nach Gleichung 7.4 ergibt.

7.2 Ergebnisse

Abbildung 7.2 zeigt die Gleichgewichtslage des Modellsystems. Es zeigt sich, daß die Membran allein schon durch elektrostatische Effekte relativ stark verbogen werden kann. Einschränkend ist anzumerken, daß die Verbiegung direkt an den Haltepunkten durch den Elastizitätsterm nicht richtig beschrieben wird, da dieser, wie oben bereits erwähnt, erst auf Längenskalen, die größer sind als die Dicke der Membran, anwendbar ist. Ferner wurde nicht berücksichtigt, daß die geladenen Lipide im Feld der SNARE-Komplexe diffundieren und so die elektrostatischen Wechselwirkungen beeinflussen.

Insbesondere ist zu erkennen, daß der anfängliche Abstand von 50 \AA größer geworden ist (außer an den fixierten Haltepunkten). In diesem Zu-

stand wirkt auf jeden Haltepunkt eine Kraft von 3–8 pN, die der SNARE-Komplex (mindestens) aufbringen muß, um die Membranen auf diesem Abstand zu halten. Diese Kraft wird hier allein durch die elektrostatische Wechselwirkung verursacht.

Der in Abbildung 1.2 mit Schritt III bezeichnete Zustand kann für einige Minuten stabil sein [78]. Nun wäre es interessant zu untersuchen, ob die Transmembransegmente des SNARE-Komplexes auf dieser Zeitskala stabil in der Membran verankert bleiben, bzw. wie groß die Kraft wäre, die aufzubringen ist um den Membrananker auf dieser Zeitskala aus der Membran zu ziehen. Ebenfalls interessant wäre es zu untersuchen, ob der SNARE-Komplex bei der Assoziation die hier abgeschätzte Kraft aufbringen kann.

Kapitel 8

Zusammenfassung

In dieser Arbeit haben wir die Methode der Molekulardynamik-(MD)-Simulation eingesetzt, um Fluoreszenzanisotropieexperimente eines an ein Protein gebundenen Farbstoffs zu beschreiben. Es handelt sich dabei um den sogenannten SNARE-Komplex, der eine wichtige Rolle bei der synaptischen Übertragung spielt. Er ist dort verantwortlich für die Fusion der Neurotransmitter enthaltenden Vesikel mit der Plasmamembran der Synapse. Dazu wurde zunächst die Flexibilität des Farbstoffs untersucht, wobei zwei verschiedene konformationelle Zustände des Farbstoffs vorhergesagt und charakterisiert wurden. Die Besetzungswahrscheinlichkeiten dieser Zustände wurden mit freie-Energie-Rechnungen abgeschätzt. Dazu haben wir zum einen die Methode der *thermodynamischen Integration* verwendet. Zum anderen wurden die Differenzen der inneren Energie und der Entropie, aus denen sich die Differenz der freien Energie zusammensetzt, separat abgeschätzt. Zur Berechnung der Entropiedifferenz wurde eine neue Methode entwickelt, die Verteilungen von Simplexvolumina miteinander vergleicht, und mit einer etablierten Methode, die das Verfahren der Hauptkomponentenanalyse verwendet, verglichen. Dabei zeigte sich, daß das Simplex-Verfahren der herkömmlichen Methode überlegen ist und signifikant genauere Ergebnisse liefert.

Anschließend wurden aus ausgedehnten MD-Simulationen der freien Dynamik des Farbstoffs in den beiden gefundenen Konformationen Zerfallskurven der polarisierten Fluoreszenz berechnet. Dazu mußte zunächst ein entspre-

chendes Verfahren weiterentwickelt werden.

Das berechnete Besetzungsverhältnis der beiden Zustände (1:4) und die unterschiedlichen Anisotropien der Zustände legen nahe, daß die beiden vorhergesagten Farbstoffkonformere im Experiment tatsächlich auflösbar sein sollten. Ebenso sollte der vorhergesagte Temperatureffekt, der den niedriger besetzten Zustand bei Verringerung der Temperatur stärker besetzt, im Experiment sichtbar sein. Wie hier am Beispiel des SNARE-Komplexes gezeigt, sollte es ganz allgemein möglich sein, die in Einzelmolekülexperimenten beobachteten unterschiedlichen Anisotropiekurven durch die MD-gestützte Berechnung solcher Zerfallskurven direkt bestimmten Konformationen des Farbstoffs zuzuordnen und so erheblich mehr strukturelle Informationen zu erhalten als mit Hilfe des *wobbling-in-a-cone*-Modells.

Zur Interpretation der experimentellen Ergebnisse von Fluoreszenz-anisotropiemessungen wird üblicherweise das *wobbling-in-a-cone*-Modell benutzt. Dieses erfordert die vereinfachende Annahme, der Farbstoff würde sich innerhalb eines Kegels bewegen. Die beiden Informationen, die sich aus der Anwendung dieses Modells ergeben, sind der Öffnungswinkel des Kegels und die Korrelationszeit der Bewegung innerhalb des Kegels. Demgegenüber mußten bei der hier vorgestellten Berechnung der Fluoreszenz-anisotropie aus MD-Simulationen keinerlei Annahmen über das Potential, in dem sich der Farbstoff bewegt, gemacht werden; es wurde vielmehr in atomarem Detail beschrieben. Durch Vergleich der Ergebnisse mit Fluoreszenzmessungen, die gegenwärtig am Institut durchgeführt werden, sollte daher eine vorurteilsfreie mikroskopische Interpretation der Anisotropie möglich sein.

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt beschreibt unser Verfahren allerdings eine *ideale* Messung. Der Vergleich mit dem Experiment kann weiter verbessert werden, indem zusätzlich der Übertragungscharakteristik des Meßaufbaus Rechnung getragen wird, etwa der zeitlichen Auflösung oder auch der endlichen Fluoreszenzzeit des Farbstoffs.

Schließlich sei betont, daß die unseren Rechnungen zugrundeliegende notwendig zeitlich begrenzte Trajektorie des Farbstoffs einen statistischen Fehler in den Zerfallskurven der Fluoreszenz-anisotropie bedingt, der im Experiment aufgrund der sehr viel besseren Mittelung nicht auftritt. In dieser Ar-

beit wurde gezeigt, daß dieser Fehler für den untersuchten SNARE-Komplex tolerierbar ist; längere Simulationszeiten wären jedoch wünschenswert.

Es wurde gezeigt, daß spezifische Eigenschaften der Farbstoffumgebung — insbesondere die Proteinoberfläche — die Dynamik des Farbstoffs beeinflussen können und daß dieser Einfluß mit MD-Simulationen beschrieben werden kann.

Diese Methode soll daher nun auch auf weitere Positionen des Farbstoffs am SNARE-Komplex angewendet werden, um so die gesamte Oberfläche des Proteins zu untersuchen. In ähnlicher Weise sollte die Methode auch auf die Beschreibung von FRET (*fluorescence resonance energy transfer*)-Experimenten erweiterbar sein, die eine Abstandsmessung zweier Farbstoffe ermöglichen. Als Vorbereitung wurden bereits Simulationen durchgeführt (Abb. 4.1). So sollten die Ergebnisse von FRET-Experimenten von Dissoziationen des SNARE-Komplexes mit Hilfe der MD-Simulationen auf der Grundlage der hier entwickelten Methoden in atomarem Detail interpretierbar sein.

Danksagung

Mein größter Dank gilt Dr. Helmut Grubmüller, der mich während der gesamten Zeit dieser Arbeit außerordentlich gut betreut, sich immer sehr viel Zeit für meine Fragen genommen und dadurch wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Außerdem haben mir alle Mitarbeiter der Arbeitsgruppe bei Problemen und Fragen jederzeit hilfsbereit zur Seite gestanden. Im einzelnen möchte ich bei Rainer Böckmann, Dr. Bert de Groot, Peer Geisendorf, unserer Sekretärin Eveline Heinemann, Dr. Berthold Heymann, Volker Knecht, Matthias Müller und Dr. Holger Wagner bedanken.

Die Entscheidung, meine Diplomarbeit in der *Arbeitsgruppe für theoretische molekulare Biophysik* zu schreiben, war daher ein ganz besonderer Glücksgriff.

Bei Herrn Prof. Jürgen Troe möchte ich mich dafür bedanken, daß er bereit war, als Gutachter diese Arbeit zu beurteilen.

Literaturverzeichnis

- [1] W. Hoppe, W. Lohmann, H. Markl, and H. Ziegler, editors. *Biophysik*. Springer, 1982.
- [2] R. F. Schmidt, G. Thews, and F. Lang. *Physiologie des Menschen*. Springer, 2000.
- [3] S. Ferro-Novick and R. Jahn. Vesicle fusion from yeast to man. *Nature*, 370:191–193, 1994.
- [4] J. E. Rothman. Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature*, 372:55–63, 1994.
- [5] R. Jahn and T. C. Südhof. Membrane fusion and exocytosis. *Annu. Rev. Biochem.*, 68:863–911, 1999.
- [6] R. B. Sutton, D. Fasshauer, R. Jahn, and A. T. Brünger. Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature*, 395:347–353, 1998.
- [7] C. Montecucco and G. Schiavo. Structure and function of tetanus and botulinum neurotoxins. *Q. Rev. Biophys.*, 28:423–472, 1995.
- [8] G. Schiavo, M. Matteoli, and C. Montecucco. Neurotoxins affecting neuroexocytosis. *Science*, 80:717–766, 2000.
- [9] B. J. Nichols, C. Ungermann, H. R. B. Pelham, W. T. Wickner, and A. Haas. Homotypic vacuolar fusion mediated by t- and v-SNAREs. *Nature*, 387:199–202, 1997.
- [10] T. Söllner, M. K. Bennett, S. W. Whiteheart, R. H. Scheller, and J. E. Rothman. A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell*, 75:409–418, 1993.
- [11] P. I. Hanson, H. Otto, N. Barton, and R. Jahn. The n-ethylmaleimide-sensitive fusion protein and α -SNAP induce a conformational change in syntaxin. *J. Biol. Chem.*, 270:16955–16961, 1995.

- [12] A. Mayer, W. Wickner, and A. Haas. Sec18p NSF-driven release of sec17p α -SNAP can precede docking and fusion of yeast vacuoles. *Cell*, 85:83–94, 1996.
- [13] L. J. Robinson and T. F. J. Martin. Docking and fusion in neurosecretion. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 10:483–492, 1998.
- [14] A. Banerjee, V. A. Barry, B. R. DasGupta, and T. F. J. Martin. NSF acts at a pre-fusion ATP-dependent step in Ca^{2+} -activated exocytosis. *J. Biol. Chem.*, 271:20223–20226, 1996.
- [15] M. A. Bittner and R. W. Holz. Kinetic analysis of secretion from permeabilized adrenal chromaffin cells reveals distinct components. *J. Biol. Chem.*, 267:16219–16225, 1992.
- [16] S. Gonzalo, W. K. Greentree, and M. E. Linder. SNAP-25 is targeted to the plasma membrane through a novel membrane-binding domain. *J. Biol. Chem.*, 274(30):21313–21318, 1999.
- [17] J. Pevsner, S. C. Hsu, J. E. Braun, N. Calakos, A. E. Ting, M. K. Bennett, and R. H. Scheller. Specificity and regulation of a synaptic vesicle docking complex. *Neuron*, 13:353–361, 1994.
- [18] R. Jahn and P. I. Hanson. SNAREs line up in new environment. *Nature*, 393:14–15, 1998.
- [19] D. Fasshauer, H. Otto, W. K. Eliason, R. Jahn, and A. T. Brünger. Structural changes are associated with soluble n-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptor complex formation. *J. Biol. Chem.*, 272(44):28036–28041, 1997.
- [20] P. I. Hanson, J. E. Heuser, and R. Jahn. Neurotransmitter release - four years of SNARE complexes. *Current Opinion in Neurobiology*, 7:310–315, 1997.
- [21] E. R. Chapman, P. I. Hanson, S. An, and R. Jahn. Ca^{2+} regulates the interaction between Synaptotagmin and Syntaxin 1. *J. Biol. Chem.*, 270:23667–23671, 1995.
- [22] N. Brose, A. G. Petrenko, T. C. Südhof, and R. Jahn. Synaptotagmin a calcium sensor on the synaptic vesicle surface. *Science*, 256:1021–1025, 1992.
- [23] B. A. Davletov and T. C. Südhof. A single C2 domain from synaptotagmin I is sufficient for high affinity Ca^{2+} /phospholipid binding. *J. Biol. Chem.*, 268:26386–90, 1993.

- [24] E. L. Florin, A. Pralle, J. K. H. Hörber, and E. H. K. Stelzer. Photonic force microscope based on optical tweezers and two-photon excitation for biological applications. *J. Struct. Biol.*, 119:202–211, 1997.
- [25] A. Pralle, M. Prummer, E.-L. Florin, E. H. K. Stelzer, and J. H. K. Hörber. Three-dimensional high-resolution particle tracking for optical tweezers by forward scattered light. *Microsc. Res. Tech.*, 44:378–386, 1999.
- [26] P. H. Axelsen, C. Haydock, and F. G. Prendergast. Molecular dynamics of tryptophan in Ribonuclease-T1. *Biophys. J.*, 54:249–258, 1988.
- [27] P. H. Axelsen, E. Gratton, and F. G. Prendergast. Experimentally verifying molecular dynamics simulations through fluorescence anisotropy measurements. *Biochemistry*, 30:1173–1179, 1991.
- [28] S. Ringhofer, J. Kallen, R. Dutzler, A. Billich, A. J. W. G. Visser, D. Scholz, O. Steinhauser, H. Schreiber, M. Auer, and A. J. Kungl. X-ray structure and conformational dynamics of the HIV-1 protease in complex with the inhibitor SDZ283-910: Agreement of time-resolved spectroscopy and molecular dynamics simulations. *J. Molec. Biol.*, 286:1147–1159, 1999.
- [29] G. S. Jas, Y. Wang, S. W. Pauls, C. K. Johnson, and K. Kuczera. Influence of temperature and viscosity on anthracene rotational diffusion in organic solvents: Molecular dynamics simulations and fluorescence anisotropy study. *J. Chem. Phys.*, 107:8800–8812, 1997.
- [30] K. Kinoshita, S. Kawato, and A. Ikegami. A theory of fluorescence polarization decay in membranes. *Biophys. J.*, 20:289–305, 1977.
- [31] S. Weiss. Fluorescence spectroscopy of single biomolecules. *Science*, 283:1676–1683, 1999.
- [32] J. Schaffer, A. Volkmer, C. Eggeling, V. Subramaniam, G. Striker, and C. A. M. Seidel. Identification of single molecules in aqueous solution by time-resolved fluorescence spectroscopy. *J. Phys. Chem. A*, 103:331–336, 1999.
- [33] C. Eggeling, J. R. Fries, L. Brand, R. Günther, and C. A. M. Seidel. Monitoring conformational dynamics of a single molecule by selective fluorescence spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:1556–1561, February 1998.
- [34] J. Schaffer. *Charakterisierung von Einzelmolekülen durch selektive Fluoreszenzspektroskopie*. PhD thesis, Georg-August-Universität Göttingen, 2000.
- [35] W. F. van Gunsteren. Methods for calculation of free energies and binding constants: Successes and problems. In W. F. van Gunsteren and P. K. Weiner,

- editors, *Computer Simulation of Biomolecular Systems (Vol. 1): Theoretical and Experimental Applications*, pages 27–59. ESCOM, Leiden, 1989.
- [36] W. F. van Gunsteren and H. J. C. Berendsen. Computer simulation of molecular dynamics: Methodology, applications, and perspectives in chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 29:992–1023, 1990.
- [37] B. R. Brooks, R. E. Bruccoleri, B. D. Olafson, D. J. States, S. Swaminathan, and M. Karplus. CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *J. Comp. Chem.*, 4:187–217, 1983.
- [38] W. F. van Gunsteren and H. J. C. Berendsen. *Groningen Molecular Simulation (GROMOS) Library Manual*. Biomos, Groningen, 1987.
- [39] S. J. Weiner, P. A. Kollman, D. T. Nguyen, and D. A. Case. An all atom force field for simulations of proteins and nucleic acids. *J. Comp. Chem.*, 7:230–252, 1986.
- [40] N. L. Allinger, Y. H. Yuh, and J.H. Lii. Molecular mechanics. The MM3 force fields for hydrocarbons. *J. Am. Chem. Soc.*, 111:8551–8566, 1989.
- [41] K. Rasmussen. How to develop force fields: An account of the emergence of potential energy functions for saccharides. *J. Mol. Struct.*, 395-396:81–90, 1997.
- [42] P. Derreumaux, M. Dauchez, and G. Vergoten. The structures and vibrational frequencies of a series of alkanes using the SPASIBA force-field. *J. Mol. Struct.*, 295:203–221, 1993.
- [43] M. P. Allen and D. J. Tildesley. *Computer Simulation of Liquids*. Clarendon Press, Oxford, 1987.
- [44] M. Eichinger, H. Grubmüller, and H. Heller. *User Manual for EGO_VIII, Release 2.0*. electronic access: <http://www.mpibpc.gwdg.de/abteilungen/071/-ego.html>.
- [45] F. Wagner and T. Simonson. Implicit solvent models: Combining an analytical formulation of continuum electrostatics with simple models of the hydrophobic effect. *J. Comp. Chem.*, 20:322–355, 1999.
- [46] G. Moy, B. Corry, S. Kuyucak, and S. H. Chung. Tests of continuum theories as models of ion channels. I. Poisson-Boltzmann theory versus Brownian dynamics. *Biophys. J.*, 18:2349–2363, 2000.
- [47] R. Kossmann. Entwicklung eines effektiven Randpotentials für Molekulardynamiksimulationen wässriger Lösungen. Master's thesis, Ludwig-Maximilians-Universität München, 1997.

- [48] J. P. Ryckaert, G. Ciccotti, and H. J. C. Berendsen. Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: Molecular dynamics of n-alkenes. *J. Comp. Phys.*, 23:327–341, 1977.
- [49] H. Grubmüller and P. Tavan. Multiple time step algorithms for molecular dynamics simulations of proteins: How good are they? *J. Comp. Chem.*, 19:1534–1552, 1998.
- [50] M. Eichinger, H. Grubmüller, H. Heller, and P. Tavan. FAMUSAMM: An algorithm for rapid evaluation of electrostatic interaction in molecular dynamics simulations. *J. Comp. Chem.*, 18:1729–1749, 1997.
- [51] L. Greengard and V. Rokhlin. A fast algorithm for particle simulations. *J. Chem. Phys.*, 73(2):325–348, 1987.
- [52] C. Niedermeier and P. Tavan. A structure adapted multipole method for electrostatic interactions in protein dynamics. *J. Chem. Phys.*, 101:734–748, 1994.
- [53] H. Heller, H. Grubmüller, and K. Schulten. Molecular dynamics simulation on a parallel computer. *Molec. Sim.*, 5:133–165, 1990.
- [54] A. Brünger. *X-PLOR*. The Howard Hughes Medical Institute and Department of Molecular Biophysics and Biochemistry, Yale University, version 3.1 edition, 1992.
- [55] W. L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, and J. D. Madura. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.*, 79:926–935, 1983.
- [56] Molecular Simulations, Inc. *DMol Version 960, Density Functional Theory electronic structure program.*, 1996.
- [57] M. J. Frisch et al. *Gaussian 98, Revision A.5*. Gaussian, Inc., Pittsburgh PA, 1998.
- [58] J. P. Stewart. *MOPAC 5.0*. Stewart Computational Chemistry.
- [59] U. C. Singh and P. A. Kollman. An approach to computing electrostatic charges for molecules. *J. Comp. Chem.*, 5:129–145, 1984.
- [60] V. Helms and R. C. Wade. Free energies of hydration from thermodynamic integration: Comparison of molecular mechanics force fields and evaluation of calculation accuracy. *J. Comp. Chem.*, 18(4):449–462, 1997.
- [61] A. Warshel. Quantum-mechanical consistent force-field (QCFF/PI) method. *Israel Journal of Chemistry*, 11:709–717, 1973.

- [62] Protein data bank. electronic access: <http://www.rcsb.org>.
- [63] H. Grubmüller. SOLVATE: A program to create atomic solvent models, 1996. (electronic publication, <http://www.mpibpc.gwdg.de/abteilungen/071/hgrub/solvate/docu.html>).
- [64] J. D. Jackson. *Classical Electrodynamics*. John Wiley & Sons, second edition, 1975.
- [65] D. L. Beveridge and F. M. DiCapua. Free energy via molecular simulation: A primer. In W. F. van Gunsteren and P. K. Weiner, editors, *Computer Simulation of Biomolecular Systems (Vol. 1): Theoretical and Experimental Applications*, pages 1–26. ESCOM, Leiden, 1989.
- [66] H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, and W. F. van Gunsteren. In J. Hermans, editor, *Molecular Dynamics and Protein Structure*. Polycrystal Book Service, P.O. Box 27, Western Springs, IL 60558, 1985.
- [67] K. V. Mardia, J. T. Kent, and J. M. Bibby. *Multivariate Analysis*. Academic Press, London, 1979.
- [68] A. Amadei, A. B. M. Linssen, and H. J. C. Berendsen. Essential dynamics of proteins. *Proteins*, 17:412–425, 1993.
- [69] Martin Karplus and Joseph N. Kushick. Method for estimating the configurational entropy of macromolecules. *Macromolecules*, 14:325–332, 1981.
- [70] P. Gritzmann and V. Klee. On the complexity of some basic problems in computational convexity II: Volume and mixed volumes. In T. Bisztriczky, P. McMullen, and R. Schneider, editors, *Polytopes: Abstract, Convex and Computational*. Kluwer Academic, Boston, 1994.
- [71] S. Chandrasekhar. Stochastic problems in physics and astronomy. *Rev. Mod. Phys.*, 15(1):1–89, 1943.
- [72] M. Montal. Electrostatic attraction at the core of membrane fusion. *FEBS Lett.*, 447:129–130, 1999.
- [73] R. Lipowsky. Generic interactions of flexible membranes. In R. Lipowsky and E. Sackmann, editors, *Structure and Dynamics of Membranes*. Elsevier, 1995.
- [74] R. B. Gennis. *Biomembranes: Molecular Structure and Function*. Springer, New York, 1989.
- [75] B. De Kruijff. Lipids beyond the bilayer. *Nature*, 386:129–130, 1997.

- [76] W. Helfrich. Out-of-plane fluctuations of lipid bilayers. *Z. Naturforsch.*, 30 c:841–842, 1975.
- [77] R. Goetz, G. Gompper, and R. Lipowsky. Mobility and elasticity of self-assembled membranes. *Phys. Rev. Lett.*, 82:221–224, 1999.
- [78] T. Xu, B. Rammner, M. Margittai, A. R. Artalejo, E. Neher, and R. Jahn. Inhibition of SNARE complex assembly differentially affects kinetic components of exocytosis. *Cell*, 99:713–722, 1999.