

Untersuchungen von Struktur-Funktions-Beziehungen an Membranproteinen mittels Molekulardynamik-Simulationen

Von der Fakultät Mathematik und Physik der Universität Stuttgart
zur Erlangung der Würde eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigte Abhandlung

Vorgelegt von

Andrew Aird

aus Stuttgart

Hauptberichter: Prof. Dr. Jörg Wrachtrup
Mitberichter: Prof. Dr. Hans-Rainer Trebin

Tag der mündlichen Prüfung:
5. Mai 2008

3. Physikalisches Institut der Universität Stuttgart
2008

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
Summary	7
1. Einleitung	15
2. Theorie und Methoden	19
2.1. Molekulardynamik-Simulation	19
2.1.1. Allgemeine Beschreibung	19
2.1.1.1. Die Born Oppenheimer Näherung	20
2.1.1.2. Empirische Kraftfeldfunktion	20
2.1.1.3. Die Newtonsche Bewegungsgleichung.....	24
2.1.2. Wichtige Parameter einer MD-Simulation	27
2.1.2.1. Lösungsmittel	27
2.1.2.2. Periodische Randbedingungen.....	28
2.1.2.3. Elektrostatische Wechselwirkung.....	28
2.1.2.4. Temperatur- und Druckkopplung	29
2.1.2.5. Strukturelle Abweichung	31
2.2. Beschleunigte Simulationen	32
2.2.1. Steered Molecular Dynamics	33
2.3. Freie Energie des Simulationssystems	35
2.4. Fluktuationstheoreme	37
2.4.1. Die Jarzynski-Gleichung.....	39
2.4.2. Rekonstruktion des Freien Energieprofils aus SMD-Simulationen	40
3. Strukturelle Stabilität verschiedener Mutanten und Fragmente des Tumornekrosefaktor-Rezeptors 1	47
3.1. Einleitung	47
3.2. Untersuchte Systeme und Simulationsdetails	52
3.2.1. TNF / $LT\alpha$	52
3.2.2. TNFR1	53
3.2.3. TNFR1- $LT\alpha$ -Komplex	55
3.2.4. Simulationssysteme und Simulationsdetails	56
3.3. Ergebnisse und Diskussion	58
3.3.1. System 0 - Referenzsystem TNFR1 _{ex}	58
3.3.1.1. Diskussion	64
3.3.2. System I und II - A1B2 _{CRD1} - und A1B2 _{CRD1} A1 _{CRD2} -Fragmente	66
3.3.2.1. Diskussion	68
3.3.3. System III und IV - $\Delta A1_{CRD1}$ -TNFR1 _{ex} - und $\Delta CRD1$ -TNFR1 _{ex} -Mutanten	70
3.3.3.1. Diskussion	73
3.4. Zusammenfassung des Kapitels	74
4. Untersuchung eines möglichen Diffusionspfades des Ubichinon-Moleküls durch den LH1-Ring im Purpurbakterium <i>Rhodospirillum rubrum</i>	77
4.1. Einführung in die Photosynthese	78
4.2. Photosynthese der Purpurbakterien	79
4.3. Simulation des Kernkomplexes von <i>R. rubrum</i>	83
4.3.1. Simulationssystem und Simulationsparameter	84
4.3.2. Ergebnisse	90
4.3.3. Diskussion.....	93
4.4. Modellsystem	96
4.4.1. Simulationssystem und Simulationsparameter	96
4.4.2. Ergebnisse und Diskussion	98

4.5. Voruntersuchung zur Ubichinon-Diffusion durch den LH1-Ring	100
4.5.1. Simulationssystem und Simulationsparameter	100
4.5.2. Ergebnisse und Diskussion	102
4.6. Identifizierung eines möglichen Pfades durch den LH1-Ring	103
4.6.1. Simulationssystem und Simulationsparameter	103
4.6.2. Ergebnisse und Diskussion	104
4.7. Rekonstruktion des Potentials entlang der Reaktionskoordinate.....	107
4.7.1. Simulationssystem und Simulationsparameter	107
4.7.2. Ergebnisse und Diskussion	109
4.8. Bestimmung des entropischen Beitrags durch Streckung des Ubichinons	112
4.8.1. Ergebnisse und Diskussion	113
4.9. Rekonstruktion des korrigierten Potentials entlang der Reaktionskoordinate	116
4.9.1. Diskussion.....	118
4.9.1.1. Fehlerbetrachtung	119
4.9.1.2. Mean First Passage Time	122
4.9.1.3. Vergleich der Simulationsergebnisse mit experimentellen Daten	124
4.10. Zusammenfassung	126
5. Untersuchung des Proteintranslokationskanals SecY	
aus <i>Methanococcus jannaschii</i>	129
5.1. Einleitung.....	130
5.1.1. Allgemeine Beschreibung des Proteinkanals SecY bzw. Sec61	130
5.1.2. Funktionsweise des Proteinkanals SecY bzw. Sec61.....	131
5.1.3. Die Kristallstruktur des Proteinkanals SecY aus <i>M. jannaschii</i>	133
5.2. Untersuchte Systeme und Simulationsdetails	140
5.3. Equilibrierung der Startstruktur von SecY.....	142
5.3.1. Ergebnisse und Diskussion	144
5.4. Simulation der aktiv geschlossenen Konformation des Proteinkanals SecY.....	147
5.4.1. Ergebnisse und Diskussion	150
5.5. Abziehen des Pfropfens.....	153
5.5.1. Voruntersuchung – Schnelles Abziehen	154
5.5.1.1. Ergebnisse und Diskussion	154
5.5.2. Bestimmung des Potential of Mean Force	158
5.5.2.1. Ergebnisse.....	159
5.5.2.2. Diskussion	163
5.6. Translokation von kleinen Molekülen.....	164
5.6.1. Abdichtung des Proteinkanals.....	165
5.6.1.1. Ergebnisse und Diskussion	167
5.6.2. Translokation von Wasser und Ionen.....	167
5.6.2.1. Ergebnisse.....	169
5.6.2.2. Diskussion	171
5.7. Relaxation des Proteinkanals.....	174
5.7.1. Ergebnisse.....	175
5.7.1.1. Relaxation des Proteinkanals in der inaktiv offenen Konformation	175
5.7.1.2. Relaxation des Proteinkanals in der aktiv geschlossenen Konformation.....	177
5.7.1.3. Relaxation des Proteinkanals in der aktiv offenen Konformation	179
5.7.2. Diskussion.....	181
5.8. Zusammenfassung des Kapitels.....	183
6. Zusammenfassung der Dissertation.....	187
Literaturverzeichnis	193
Danksagung.....	201

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
Å	ÅNGSTRÖM
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AFM	Rasterkraftmikroskop (Atomic force microscope)
ALP	α -Untereinheit
ATP	Adenosintriphosphat
BChl	Bacteriochlorophyll
BET	β -Untereinheit
BPTI	Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor
bzw.	beziehungsweise
ca.	Circa
Car	Carotinoid
Chl	Chlorophylle
CRD	Cysteinreiche Domäne
DD	Todesdomäne (Death domain)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EM	Elektronenmikroskop
FFT	Fast Fourier Transformation
Fs	Femtosekunde
GDP	Guanosindiphosphat
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
Hz	Hertz
IR	Infrarot
K	Kelvin
kcal	Kilokalorie
LH1	Lichtsammelkomplex 1
LH2	Lichtsammelkomplex 2
LT α	Lymphotoxin α
<i>M. jannaschii</i>	<i>Methanococcus jannaschii</i>
MD	Molekulardynamik (Molecular dynamics)
MFPT	Mean First Passage Time
MM	Molekularmechanik
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
NMFF	Normal mode based flexible fitting

Fortsetzung Abkürzungsverzeichnis

μ s	Mikrosekunde
Ms	Millisekunde
NMR	Kernresonanzspektroskopie
Ns	Nanosekunde
PLAD	Pre Ligand binding Assembly Domain
PME	Particle Mesh Ewald
PMF	Freies Energieprofil (Potential of Mean Force)
pN	Pikonewton
ps	Pikosekunde
QM	Quantenmechanik
<i>Rb. sphaeroides</i>	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>
RC	Reaktionszentrum
RMSD	Root mean square deviation
<i>R. rubrum</i>	<i>Rhodospirillum rubrum</i>
s	Sekunde
SMD	Steered Molecular Dynamics
SRP	Signal recognition particle
t	Zeit
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR1	Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1
TNFR1 _{ex}	Extrazelluläre Domäne des Tumornekrosefaktor-Rezeptors 1
TNFR2	Tumornekrosefaktor-Rezeptor 2
TRAF	TNF-Rezeptor assoziierter Faktor
TRADD	TNF-Rezeptor assoziiertes Todesdomänenprotein
TRANS	Transmembranbereich
UV	Ultraviolett
VdW	Van der Waals
WLC	Worm like chain
z. B.	zum Beispiel

Summary

Molecular Dynamics (MD) simulations of biomolecules have come a long way since Karplus et al. performed the first protein simulation in 1977. The simulation system comprised 885 atoms and was run for 10 ps in vacuum to investigate the flexibility of the structure on very short timescales. Steady progress in describing the interactions between the participating atoms along with an ever-increasing number of available high-resolution structures of proteins and other biomolecules have helped to establish MD-simulation as a powerful tool for studying biological systems. This rapid progress only became possible through an exponential increase in computation power (Moore's law) together with the development of efficient simulation algorithms.

The major advantage of a MD-simulation is obvious, since it allows capturing protein dynamics with atomic spatial resolution, therefore delivering a microscopic picture of the biological process under investigation. This is done by numerically integrating Newton's equation of motion, resulting in a trajectory $r_i(t)$ for every atom i in the system.

Nowadays, system sizes of up to 10^5 atoms are routinely investigated on the nanosecond timescale - some simulations have even gone far beyond these limits with respect to system size (10^6) as well as timescale (500 μ s).

The main field of application of MD-simulations is the microscopic description of the dynamics and function of biomolecules and thus, the construction of a detailed picture of the relevant processes taking place inside the cell.

Many biological processes take place on timescales, which are still not accessible by conventional MD-simulations. A number of special simulation techniques, like *Umbrella Sampling*, *Essential Dynamics* or *Steered Molecular Dynamics* (SMD) have emerged that can accelerate the process under investigation onto accessible timescales. One common feature of these methods is an enforced movement of the system along a specified reaction coordinate in order to overcome potential barriers. This is done by applying an additional force or adding a harmonic potential to manipulate one or more atoms of the simulated system. Using statistical analysis methods like fluctuation theorems allows the quantitative study of the accelerated processes.

In 1997, Jarzynski formulated an integral version of the fluctuation theorem, connecting the free energy difference to an exponential average of the external work for systems driven arbitrarily out of equilibrium. For infinite sampling of work values, the free-energy estimate is

exact; for finite sampling, it allows an estimate of this value. This remarkable equation has since been tested in many experimental investigations as well as simulation studies.

In the framework of this thesis, three different biological systems are investigated using MD-simulations. The main focus lies on the identification between structural features that are related to functional consequences.

Structural stability of Tumor Necrosis Factor receptor type 1 mutants and fragments

Apoptosis, the programmed cell death, is an essential mechanism for every organism to maintain cell homeostasis and effectively kill cells, which are harmful or no longer functional. Apoptosis specifically initializes a signaling cascade within these cells, which ultimately leads to their death. It can be induced by several different mechanisms. The Tumor Necrosis Factor (TNF) is a mediator of the innate immune system and can also induce apoptosis. The homotrimeric TNF can bind to two different membrane receptors; TNF receptor type 1 (TNFR1) and TNF receptor type 2 (TNFR2). Both receptors contain four cysteine rich domains (CRDs) in their extracellular parts, which is a hallmark of a whole family of receptors (TNFR superfamily). Each CRD can be structurally further divided into two subdomains A1 and B2. The initial step of TNF induced apoptosis is the binding of TNF to three TNFR1. However, single TNF-[TNFR1]₃ complexes are not capable of initiating strong intracellular signals; for efficient signal transduction oligomerization of TNF-[TNFR1]₃ is necessary. CRD2 and CRD3 are involved in numerous ligand contacts and thus responsible for ligand binding, as observed in the crystal structure of lymphotoxin- α (LT α) in complex with the extracellular domain of TNFR1. CRD1 is believed to be involved in receptor-receptor interaction and therefore also necessary for the formation of signal competent receptor clusters.

MD-simulations are performed to gain insight into conformational consequences induced by mutational changes of the extracellular part of TNFR1. Together with data from an experimental study done by Marcus Branschädel from the Institute of Cell Biology and Immunology at the University of Stuttgart, these conformational consequences are linked to functional changes.

In the extracellular domain of TNFR1, the subdomains A1 and B2 of the CRDs are the smallest structurally stable subunits. These subunits are arranged in alternating sequence and make up the flexible backbone. The flexibility can be attributed to relative movements of the subunits A1 and B2. The intra-CRD flexibility is larger than the inter-CRD flexibility.

From the data of the crystal structure, the different CRDs can be connected with different functional aspects. But this simple relation cannot be used to create functionalized mutants. Deletion of CRD1 should abolish receptor-receptor interaction, but results in a deletion mutant that retains its ligand binding affinity. However, experimental data clearly shows, that deletion of CRD1 also eliminates ligand binding. MD-simulations of Δ CRD1-TNFR1_{ex}, a deletion mutant, where CRD1 is removed, show a clear conformational change in the A1 subunit of CRD2. This can be attributed to a missing stabilizing effect of the deleted CRD1. In contrast, deletion of only the first half of CRD1 Δ A1_{CRD1}-TNFR1_{ex} did not show any visible conformational changes in CRD2. In this case, part of the CRD1 (B2) is enough to stabilize the adjacent subdomain. Results from the experimental study confirm this observation. The Δ A1_{CRD1}-TNFR1 deletion mutants did show ligand binding affinity but were not able to build signaling competent receptor clusters and therefore did not show sufficient receptor-receptor interaction.

Receptor-receptor interaction between TNFR1 is an interesting target for therapeutic research. A molecule that can bind to CRD1 of TNFR1 can inhibit the formation of signaling competent receptor clusters. Crosslinking studies reveal that a TNFR1 fragment consisting only of CRD1 is not able to form homo-oligomers and therefore does not exhibit any CRD1-CRD1 interaction. MD-simulations of CRD1 show an increased flexibility in B2_{CRD1}. Again the missing stabilizing effect, this time from A1_{CRD2} is responsible for the increased flexibility. Subsequent simulations of a fragment, which contained CRD1 and A1_{CRD2}, did not show any increased structural stability within the subdomains of CRD1 and should therefore be able to show CRD1-CRD1-interaction. This prediction has yet to be verified. However, a CRD1 with a Glutathione-S-Transferase- (GST)-tag was able to inhibit signal transduction via TNFR1. In this case, the GST-tag could serve as a scaffold to stabilize CRD1.

This study shows that although different primary functions of TNFR1 like receptor-receptor interaction or ligand binding can be attributed to structurally distinct domains of the receptor. A structural stabilizing effect by adjacent subdomains is necessary to retain these individual functions.

Possible Pathway for ubiquinone diffusion through the LH1 ring of the purple bacteria *Rhodospirillum rubrum*

In the last decade, the structures of many components of the photosynthetic apparatus of purple bacteria, as well as the mutual organization of these components within the purple membrane, were resolved. The core complex of the photosynthetic unit of purple bacteria,

consisting of the reaction center (RC) and the light-harvesting 1 complex (LH1), plays a crucial role in the conversion of light into chemical energy. In the reaction center, a ubiquinone molecule functions as an electron carrier to transport electrons, created in the first step of photosynthesis, from inside of the core complex to the cytochrome bc1-complex.

One key question that emerged concerned the assembly of the core complex. In some species, like *Rhodobacter sphaeroides* (*Rb. sphaeroides*), the ring-shaped LH1 complex was found to be open, whereas other species, like *R. rubrum*, have a closed ring surrounding the reaction center. This poses the question of how the ubiquinone molecule that transports electrons and protons from the RC to the cytochrome bc1 complex overcomes the apparent barrier of the LH1 ring. The pathway of the ubiquinone molecule is still unknown. In this study, we investigated how, in the case of a closed ring structure, the ubiquinone molecule diffuses through the LH1 ring.

Starting from model structures for both the LH1 ring and the RC, the core complex was assembled and simulated in a lipid water environment. The core complex was structurally stable and a detailed analysis of the protein complex revealed openings in the LH1 ring due to the flexibility of the embedded chlorophyll tails where a possible diffusion might take place. The enormous size of the pigment protein complex made it necessary to construct a minimum model system and to accelerate the diffusion process onto accessible timescales. The minimum model consisted of one ubiquinone molecule and a quarter LH1 ring embedded in a lipid bilayer and solvated in a water box. Analysis of SMD simulations pulling the ubiquinone molecule, which was already halfway inserted in the LH1 ring, into the membrane area, revealed a possible pathway for ubiquinone diffusion. There are three strong indications for the plausibility of this pathway. First, simulations along two different pulling directions (forward and backward) result in almost identical pathways. Second, there is very little structural deviation for substructures of the LH1 ring and pigments that could be disturbed by the ubiquinone headgroup. Third, the forces along the pathway are comparable to other SMD simulation studies exploring ligand diffusion in protein channels. To reconstruct the potential of mean force (PMF) along the proposed pathway through the LH1 ring, additional SMD simulations were performed. To keep the system close to equilibrium, the pathway was divided into nine independent sections for both directions. 10 SMD simulations per section were performed, where the head of the ubiquinone molecule was pulled along the specified pathway. To reconstruct the PMF, statistical analysis on the work profiles, which can be calculated from the forces of the SMD simulation, was performed. Using the second-order cumulant expansion and assuming a Gaussian shaped work distribution, the PMF of every

individual section for both directions were reconstructed and subsequently combined. Accounting for the entropic contribution of stretching the ubiquinone during the SMD simulations, results in very similar PMFs for both pulling directions. The statistical error for both PMFs was estimated from the dissipated work and hence from the width of the work distribution. Parts from both forward and backward potentials were combined to obtain a PMF with minimum overall statistical inaccuracy. The PMF exhibits potential characteristics that can be closely connected to structural features along the pathway. There are potential barriers at positions along the pathway between two α -helices of the inner and outer protein structure and a central barrier, which can be attributed to the influence of chlorophyll and carotenoid tails. The potential modulation is $\sim 8 k_B T^{(300K)}$ and the error is on average 25% of the total modulation depth. Using a model of one-dimensional diffusion along the PMF and a scaled potential to include the error bars, a Mean First Passage Time (MFPT) of $\sim 8 \times 10^{-3}$ s can be estimated. Under the assumption, that this process is the rate limiting step of the core complex, an overall turnover rate of ~ 50 Hz can be predicted. In comparison with experimentally determined turnover rates, this supports the proposed model of ubiquinone diffusion through the LH1 ring and can explain why cryoelectron microscopy and AFM studies of this species always find closed LH1 structures around the reaction center.

Investigation of the protein-conducting channel SecY from *Methanococcus jannaschii*

Protein translocation, the transport of a protein through a pore is of great importance for all living organisms. It is essential for cells to have membrane channels, which are able to transport proteins to different locations inside and outside the cell. An example for such a channel is the protein-conducting channel SecY. Here, proteins are both translocated across and inserted into the membrane. Two of the main structural features of this protein channel are a pore region, consisting of a ring of six hydrophobic residues located in the center of the channel, as well as a "plug" consisting of a short alpha-helix located just below the pore region. For protein translocation, the plug has to be removed from the pore region and the pore has to be dilated. Both features guarantee the correct functionality, meaning specific transport of polypeptides through the channel area while blocking the channel in the closed state.

Molecular dynamics simulations are performed to understand the overall mechanism of protein transport across the membrane and to address questions concerning translocation, sealing of the channel and relaxation. Protein translocation processes usually take place on timescales (\sim ms) not accessible to conventional molecular dynamics simulation. By using

steered molecular dynamics simulations to accelerate the opening process together with statistical analysis using fluctuation theorems, the potential of mean force for removal of the plug is obtained.

Starting from the crystal structure of the SecY-complex of *Methanococcus jannaschii*, which resembles the protein-conducting channel in its inactive form, the protein was equilibrated in a lipid-water environment. The simulation resulted in a stable protein structure (*inactive closed* conformation). Based on data from cryoelectron microscopy of the SecY-complex in an active form bound to a ribosome, the equilibrated structure of the *inactive closed* conformation was modified using harmonic constraints. The resulting structure (*active closed* conformation) was in good agreement with the experimental data.

Using SMD simulations, the plug was pulled away from the pore region in both the *inactive closed* and the *active closed* conformation. Ten simulations were performed for each conformation. From the calculated work profiles, the PMF was reconstructed using the second-order cumulant expansion. The resulting PMFs showed distinct differences inside the first 6 Å of pulling distance. The plug in the *inactive closed* conformation sits very tightly bound below the pore region and a potential barrier of $72 \pm 13 \text{ k}_B\text{T}^{(300\text{K})}$ has to be overcome to remove the plug. In case of the *active closed* conformation the potential barrier is $13 \pm 11 \text{ k}_B\text{T}^{(300\text{K})}$ which is significantly lower. In comparison to known potential barriers of biological processes and by estimating the MFPT of thermally crossing these barriers, a conformational change from the *inactive* form into the *active* form is necessary to enable plug removal and thus protein translocation on biologically relevant timescales in the range of milliseconds. This conformational change is initiated by binding of the ribosome, which leads to a destabilization of the pore-plug interaction, by widening the pore region.

Another necessary feature of the protein-conducting channel is its ability to prevent water and ions from spontaneously crossing the membrane. This is especially important in order to maintain the membrane potential. SMD simulations were performed on different conformations of SecY to pull a water molecule and a sodium ion across the pore region. The *inactive* as well as the *active* conformation, both with the plug in a *closed* and *open* state were investigated and reveal distinct differences in the ability to block water and sodium ions, respectively. To effectively prevent water and ion flow across the pore region, the plug must be located directly below the pore, which means the protein must be in the *inactive closed* conformation. In this case, the work to translocate a water and a sodium ion was $25 \text{ k}_B\text{T}^{(300\text{K})}$ and $55 \text{ k}_B\text{T}^{(300\text{K})}$, respectively. Removing the plug or undergoing a conformational change into the *active* form markedly reduces the necessary work. In both *active* conformations,

spontaneous water translocation even occurs on the nanosecond timescale. This result is in agreement with experimental data, where water permeability and ion conduction through SecY was measured. Only the native, non-translocating form of the protein (which corresponds to the *inactive closed* conformation) is able to effectively prevent the flow of water and ions across the membrane.

This means, that once a protein is translocated across the membrane, the channel must return quickly to its *inactive closed* conformation. MD-simulations of the relaxation process reveal that plug and pore relaxation are connected. The *inactive* pore region accelerates the return of the plug from the *open* to the *closed* state, whereas a plug located directly below the pore region accelerates relaxation of the pore from the *active* to the *inactive* form. The plug does not only play a role in simply blocking the protein channel and therefore helping to seal the pore region but also in stabilizing the protein structure in the *inactive* conformation.

1. Einleitung

Die Molekulardynamik (MD)-Simulation hat sich in den letzten Jahrzehnten zu einer wichtigen und erfolgreichen Methode zur theoretischen Untersuchung biologischer Systeme entwickelt. Den Grundstein legten Alder and Wainwright bereits Ende der fünfziger Jahre mit der Simulation harter Kugeln, die wichtige Einblicke in das Verhalten einfacher Flüssigkeiten lieferte [1, 2].

Danach vergingen rund 20 Jahre bis die erste MD-Simulation eines Proteins veröffentlicht wurde [3]. Die Proteinstruktur BPTI (Bovine Pancreatic trypsin inhibitor) besteht lediglich aus 885 Atomen, deren Verhalten für 10 ps im Vakuum simuliert wurde.

In den nachfolgenden drei Jahrzehnten vollzog sich eine rasante Entwicklung, die durch den Fortschritt in drei unterschiedlichen wissenschaftlichen Bereichen maßgeblich beeinflusst wurde.

(i) Verbesserungen bei der Beschreibung der Wechselwirkung der simulierten Atome mit Hilfe von Kraftfeldern sorgten dafür, dass sich die MD-Simulation als rechnergestützte Untersuchungsmethode sowohl im Bereich der Chemie, der Biologie sowie der Physik weiter etablierte. Es dauerte jedoch bis in die frühen 80iger Jahre bis durch die Entwicklung von Kraftfeldern für Wassermoleküle (SPC bzw. TIP3P/TIP4P) [4, 5] Simulationen von Proteinen in Lösung möglich wurden, was bei vielen Wissenschaftlern in dieser Zeit reges Interesse weckte.

Heutzutage gibt es eine ganze Reihe unterschiedlicher Kraftfelder für die Simulation biologischer Moleküle, die ein sehr breites Anwendungsgebiet abdecken und für jeweils eine bestimmte Fragestellung optimiert sind. Neben Standard-Kraftfeldern wie AMBER [6, 7] oder

CHARMM [8] gibt es weitere Kraftfelder, die beispielsweise die Polarisierbarkeit der Atome berücksichtigen [9] oder es erlauben, einen Teil des Simulationssystems quantenmechanisch zu behandeln [10].

(ii) Einen weiteren wichtigen Beitrag zum Erfolg der MD-Simulation hat die Struktur- aufklärung geleistet, die eine kontinuierlich wachsende Zahl an verfügbaren Strukturen von Proteinen und anderen Biomolekülen mit atomarer Auflösung zur Verfügung stellt. Diese bilden die Grundlage für MD-Simulationen an biologischen Systemen. Im Jahr 1971 ist man erstmals dazu übergegangen, diese Strukturdaten systematisch, in einem einheitlichen Format in einer Proteindatenbank abzulegen. Zu Beginn waren dort gerade einmal sieben Strukturen verzeichnet [11]. Bis 1986 erhöhte sich diese Zahl bereits auf über 50 und heute sind mittlerweile mehr als 48000 Strukturdatensätze von Proteinen, DNA und anderen biologisch relevanten Molekülen in der Datenbank enthalten. Dabei steigt die jährliche Anzahl an neu hinzugekommenen Strukturen exponentiell an.

(iii) Letztlich wäre der Einzug der MD-Simulation in die Wissenschaft aber nicht ohne die ständig steigende Rechenleistung möglich gewesen. Durch die fortwährende Miniaturisierung der Prozessoren verdoppelt sich die Leistung von Computern grob geschätzt alle zwei Jahre (Moore's law) [12]. Durch die Entwicklung effizienter Simulationsalgorithmen und der Möglichkeit mehrere Prozessoren parallel für eine einzige Simulation zu verwenden, konnte die Rechenleistung nochmals deutlich erhöht werden. Mit den heute verfügbaren Hochleistungsrechnern werden biologische Systeme typischerweise mit einigen 10^5 wechselwirkenden Teilchen auf Zeitskalen, die sich im Bereich von mehreren 10 ns bewegen simuliert. In Einzelfällen werden diese „Grenzen“ deutlich überschritten. Zwei Vorreiter, die sich weit ab der heute üblichen Teilchen- bzw. Zeitskalen bewegen, seien in diesem Zusammenhang kurz erwähnt. In Bezug auf die Systemgröße ist das die Simulation des kompletten Tabakmosaiksatelliten-Virus. Der solvatisierte Satelliten-Virus, mit einer Gesamtsystemgröße von einer Million Atomen wurde für 50 ns simuliert, um damit Aussagen bezüglich Aufbau und Stabilität des Virus zu treffen [13]. Das andere Extrem ist die Simulation der Faltung eines kleinen Polypeptids (Kopfgruppe des Proteins Villin), bestehend aus 20000 Atomen für eine Zeitdauer von 500 μ s. Aus dieser Simulation konnten Informationen zum Faltungsverhalten gewonnen werden [14].

Die Hauptanwendung heutiger MD-Simulationen ist die Beschreibung der Dynamik und der Funktion von Proteinen und Proteinkomplexen auf mikroskopischer Ebene, um damit einen detaillierten Einblick in die in der Zelle ablaufenden Prozesse zu erhalten. Hierbei kann die

Methode der MD-Simulation einen wichtigen Beitrag leisten, da sie ein atomistisches Bild der Dynamik von Proteinen liefert; eine Eigenschaft, die bislang von keiner experimentellen Untersuchungsmethode erbracht wird.

Viele biologische Prozesse laufen auf Zeitskalen ab, die mit heute verfügbaren Rechenressourcen und der konventionellen MD-Simulation noch nicht erreicht werden können. Es existiert eine Reihe von MD-Simulationstechniken, die es erlauben, diese Prozesse auf berechenbare Zeitskalen zu beschleunigen. Allen Methoden gemein ist, dass zusätzliche Potentiale in das System integriert werden, so dass Potentialbarrieren überwunden werden können. In den Methoden *Umbrella Sampling* [15], *Essential Dynamics* [16] oder *Steered Molecular Dynamics* [17] werden dabei mit einer zusätzlichen Kraft oder einem harmonischen Potential, ein oder mehrere Atome manipuliert, um das System aus seinem Ausgangs- in den Endzustand zu überführen. In Kombination mit statistischen Analyseverfahren wie beispielsweise der *Weighted Histogram Analysis Method* [18] oder Fluktuationstheoremen können biologische Prozesse quantitativ untersucht werden. Hierzu hat insbesondere das von Jarzynski im Jahr 1991 entdeckte integrale Fluktuationstheorem beigetragen [19]. Es verknüpft die Änderung der Freien Energie mit einer exponentiellen Mittelung von Arbeitswerten eines beliebig ins Nichtgleichgewicht getriebenen Prozesses. Erstaunlich ist, dass für den Fall einer unendlichen Anzahl an Trajektorien dieser Zusammenhang exakt ist und damit eine Gleichgewichtsgröße aus Nichtgleichgewichtsdaten extrahiert werden kann. Die Anwendung dieses Fluktuationstheorems und weiterer Abwandlungen hat in den letzten Jahren sowohl in der Auswertung von Experimenten als auch von MD-Simulationen Einzug gehalten.

In dieser Arbeit werden drei unterschiedliche biologische Systeme vorgestellt, die mit Hilfe von MD-Simulationen untersucht wurden. Dabei stand die Verknüpfung von strukturellen Eigenschaften der Proteine bzw. Proteinkomplexe mit ihrer Funktionalität im Mittelpunkt.

Nach einer Einführung in die theoretischen Grundlagen werden in Kapitel 3 Simulationen am Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1 (TNFR1) präsentiert. TNFR1 ist ein Membranrezeptor, der eine wichtige Rolle in der Tumornekrosefaktor-vermittelten Apoptose spielt. Anhand der Simulationsdaten der extrazellulären Domäne des TNFR1 und der daraus abgeleiteten Deletionsmutanten wird eine Bewertung der strukturellen Stabilität vorgenommen. Zusammen mit den Daten einer experimentellen Studie von Marcus Branschädel vom Institut für Zellbiologie und Immunologie der Universität Stuttgart wird die Frage beantwortet, wie sich die struk-

turellen Veränderungen der Deletionsmutanten von TNFR1 auf die Funktionalität, insbesondere auf mögliche Rezeptor-Rezeptor- und Rezeptor-Ligandenbindung auswirkt.

Kapitel 4 beschäftigt sich mit dem Lichtsammelkomplex LH1 und dem Reaktionszentrum (RC) der photosynthetischen Einheit aus dem Purpurbakterium *Rhodospirillum rubrum*. Eingebaut in die Membran, sind sie für die Absorption von Licht sowie für die Erzeugung von Ladungsträgern in der bakteriellen Photosynthese verantwortlich. Die Ladungsträger werden mit Hilfe des Elektronencarriers Ubichinon zu weiteren Pigment-Proteinkomplexen befördert. Der Weg zum benachbarten Cytochrom-bc₁-Komplex führt vom RC, das sich im Inneren des LH1-Rings befindet, in den Membranbereich außerhalb des LH1-Rings. Experimentelle Daten zeigen, dass der LH1-Ring aus dieser Spezies eine geschlossene Struktur um das RC bildet. Es stellt sich somit die Frage, wie das Ubichinon diese Proteinbarriere überwinden kann. Mit Hilfe von MD-Simulationen wird ein möglicher Pfad des Ubichinons durch den LH1-Ring aufgezeigt und eine Zeit abgeschätzt, auf der eine Diffusion durch den geschlossenen LH1-Ring möglich ist.

In Kapitel 5 wird der Proteintranslokationskanal SecY aus dem Archaeobakterium *Methanococcus jannaschii* vorgestellt. Der Proteinkanal ist für die Translokation von Proteinen durch bzw. für deren Einbau in die Membran verantwortlich. Wird kein Protein transloziert, muss der Kanal die Membran gegenüber kleinen Molekülen abdichten. Zwei wichtige Strukturelemente, die Pore und der Pfropfen, sind für diese Funktionen von besonderer Bedeutung. Anhand von MD-Simulationen an einer nicht-translozierenden, sowie einer translozierenden Konformation des Proteinkanals werden Unterschiede im Abdichtungsverhalten, der Relaxation, sowie der Bindung des Pfropfens an die Pore untersucht. Es wird gezeigt, dass eine Konformationsänderung in die translozierende Form notwendig ist, um Proteintranslokation zu ermöglichen.

2. Theorie und Methoden

2.1. Molekulardynamik-Simulation

In diesem Kapitel werden grundlegende Prinzipien der Molekulardynamik (MD)-Simulation vorgestellt. Dabei beschränkt sich die Betrachtung auf MD-Simulationen von biologischen Systemen. Für eine ausführliche Beschreibung sei auf Lehrbücher [20-22] sowie Review Artikel [23, 24] verwiesen. Ziel einer MD-Simulation ist es, die zeitliche Entwicklung eines molekularen Systems auf atomarer Ebene zu erfassen.

2.1.1. Allgemeine Beschreibung

Grundsätzlich lässt sich die Dynamik eines beliebigen Systems mit der zeitabhängigen Schrödingergleichung

$$\hat{H} \Psi = \frac{i\hbar}{2\pi} \frac{\partial \Psi}{\partial t} \quad (2.1)$$

exakt beschreiben. Hierbei ist \hat{H} der Hamiltonoperator, \hbar das Plancksche Wirkungsquantum und Ψ die Wellenfunktion des Systems. Die Gleichung beschreibt jedes Teilchen des Systems und ist somit eine Funktion der Koordinaten und Impulse aller Kerne und Elektronen. Selbst für kleine Systemgrößen von wenigen Atomen ist die Zahl der zu berücksichtigenden

Freiheitsgrade groß und eine Berechnung daher zeitintensiv bzw. in vielen Fällen unmöglich. Die Methode der MD-Simulation ist eine Vereinfachung und beruht auf mehreren Annahmen, die es erlauben, die Zahl der zu berücksichtigenden Freiheitsgrade zu reduzieren und damit eine erhebliche Reduktion der notwendigen Rechenzeit zu erreichen.

2.1.1.1. Die Born Oppenheimer Näherung

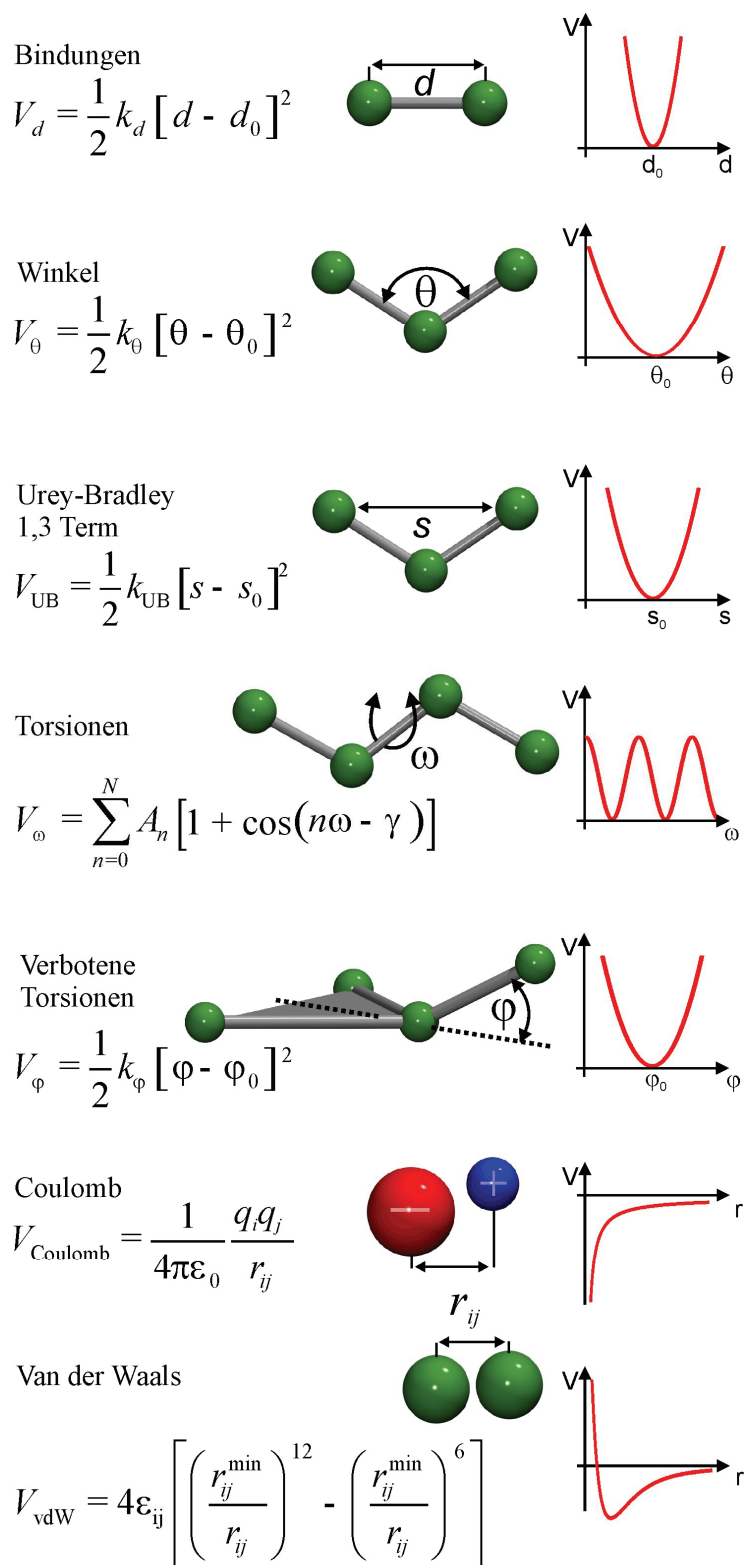
Die erste Vereinfachung stellt die Born-Oppenheimer-Approximation dar [25]. Die Bewegung der Elektronen ist aufgrund ihrer viel geringeren Masse wesentlich schneller als die Bewegung der Atomkerne. Dadurch stellt sich zu jeder Kernkonfiguration quasi instantan eine Elektronenkonfiguration ein. In der Wellenfunktion Ψ lassen sich die Kernfreiheitsgrade von den Elektronenfreiheitsgraden separieren

$$\Psi_{tot}(R, r) = \Psi_{Kern}(R) \cdot \Psi_{El.}(r; R). \quad (2.2)$$

R bzw. r sind die Koordinaten und Impulse der Kerne bzw. Elektronen. Die Separierung der Kern- und Elektronenfreiheitsgrade führt dazu, dass sich Gleichung (2.1) in einen zeitabhängigen Teil, der die Dynamik der Kerne berücksichtigt und einen zeitunabhängigen Teil, der die Elektronen bei fester Kernkonfiguration beschreibt, zerlegen lässt. Die Berechnung der Elektronenenergien erfolgt durch Lösen des zeitunabhängigen Teils der Schrödingergleichung. Das Ergebnis ist ein effektives Potential, das nur noch von den Kernkoordinaten abhängt.

2.1.1.2. Empirische Kraftfeldfunktion

In der zweiten Vereinfachung wird das effektive Potential durch eine empirische Kraftfeldfunktion beschrieben. In einem Kugel-Feder-Modell werden inter- bzw. intramolekulare Wechselwirkungen zwischen den Atomkernen definiert. In **Abb. 2.1** sind die einzelnen Wechselwirkungen des CHARMM-Kraftfeldes [8], einem typischen Kraftfeld, das zur Simulation von Biomolekülen wie Proteinen verwendet wird, aufgelistet.

**Abb. 2.1**

Energietерme des CHARMM-Kraftfeldes, das in MD-Simulationen von Biomolekülen Verwendung findet. In dieses Kraftfeld gehen sowohl gebundene Wechselwirkungen (Bindungen, Winkel, Urey-Bradley, Torsionen und verbotene Torsionen) sowie nicht gebundene Wechselwirkungen (Elektrostatik und Van der Waals-Wechselwirkung) ein. Links in der Abbildung ist die funktionale Form der Wechselwirkung, rechts deren Verlauf gezeigt. Eine anschauliche Darstellung der einzelnen Wechselwirkungsterme ist in der Mitte zu sehen. Diese funktionale Form wird im CHARMM-Kraftfeld verwendet.

In das CHARMM-Kraftfeld gehen sowohl so genannte gebundene (interne) Wechselwirkungen als auch nicht-gebundene Wechselwirkungen ein. Zu den internen Wechselwirkungen zählen neben dem Energieterm V_{Bindung} , der Änderungen des Abstandes zweier gebundener Atome berücksichtigt, der Energieterm V_{Winkel} , der Änderungen des Winkels dreier gebundener Atome beschreibt und V_{Torsion} , der Änderungen des Torsionswinkels von vier aufeinander folgenden Atomen angibt, auch der Urey-Bradley-Term V_{UB} und der Term zur Berücksichtigung verbotener Torsionen $V_{\text{Torsionen}}^{\text{verbotene}}$. Die letzten beiden Terme sind Korrekturterme, die verwendet werden, um die Winkel- bzw. Torsionspotentiale zu optimieren. V_{UB} berücksichtigt die Wechselwirkung aufgrund des Abstands zwischen dem ersten und dritten Atom eines kovalent gebundenen Atom-Triplets und $V_{\text{Torsionen}}^{\text{verbotene}}$ verhindert so genannte verbotene Torsionen, also Bewegungen von Atomen aus einer Ebene heraus, die aufgrund der Molekülgeometrie verboten sind. Zu den nicht-gebundenen (externen) Wechselwirkungen zählen der Coulomb-Term V_{Coulomb} , der die elektrostatische Wechselwirkung zwischen geladenen Atomen beschreibt, und der Energieterm für Van der Waals-Wechselwirkungen (V_{vdw}), die zwischen nicht gebundenen Atomen auftreten. Die funktionale Form des Kraftfelds ist gegeben durch

$$\begin{aligned}
 V(\vec{R}) = & \sum_{\text{Bindungen}} K_d (d - d_0)^2 + \sum_{\text{Winkel}} K_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{\text{Urey-Bradley}} K_{\text{UB}} (s - s_0)^2 \\
 & + \sum_{\text{Torsionen}} A_n \left[1 + \cos(n\omega - \gamma) \right] + \sum_{\text{Torsionen}}^{\text{verbotene}} K_\varphi (\varphi - \varphi_0)^2 \\
 & + \sum_{\substack{i \neq j \\ \text{Van der Waals} \\ \text{u. Coulomb}}} \left(4\varepsilon_{ij} \left[\left(\frac{r_{ij}^{\text{min}}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{r_{ij}^{\text{min}}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{1}{4\pi\varepsilon_0} \frac{q_i q_j}{r_{ij}} \right). \tag{2.3}
 \end{aligned}$$

Die in Gleichung (2.3) eingeführten Parameter beinhalten Referenzgrößen für Bindungslängen d_0 , d_{UB} , Bindungswinkel θ_0 und verbotene Torsionen φ_0 , sowie die dazugehörigen Kraftkonstanten k_d , k_{UB} , k_θ und k_φ . Weitere Parameter sind der Phasenwinkel γ , die Multiplizität n und die Barrierenhöhen A_n für die Torsion; die Partialladungen der Atome q_i für die Elektrostatik, die Tiefe ε_{ij} , die Breite σ_{ij} und der Abstand des Minimums im Potential r_{ij}^{min} für die Van der Waals-Wechselwirkung. Die Korrekturterme V_{UB} und $V_{\text{Torsionen}}^{\text{verbotene}}$ werden nicht für alle Atome des Systems verwendet, sondern auf ein Minimum beschränkt. Genau genommen müssen für jede denkbare Kombination aus Atomen Parameter bestimmt werden. Dies führt zu einem erheblichen Aufwand bei der Berechnung. Aus diesem Grund wurden so genannte

Atomtypen eingeführt. Dabei handelt es sich um eine Zusammenfassung chemisch ähnlicher Atome zu einem einzelnen Atomtyp, wodurch sich die Anzahl der notwendigen Parameter um ein Vielfaches verkleinert.

Optimierung bzw. Anpassung der Kraftfeldparameter

Die für das Kraftfeld notwendigen Parameter werden so an das System angepasst, dass sie experimentelle Daten aus der Röntgenstrukturanalyse, der IR-Spektroskopie oder der NMR, sowie Ergebnisse aus *ab initio* quantenmechanischen Berechnungen möglichst genau wiedergeben. Die Parametrisierung erfolgt in der Regel für kleine Bausteine, für die strukturelle, dynamische und thermodynamische Daten zur Verfügung stehen oder berechnet werden können. Die Parameter werden so gewählt, dass sie sich auf andere Moleküle bzw. Molekülfragmente übertragen lassen. So ist es möglich, mit einer einzigen funktionalen Form des Kraftfeldes und einem begrenzten Parametersatz eine Vielzahl von Molekülen zu behandeln. Die Parametersätze werden kontinuierlich weiterentwickelt bzw. optimiert und erlauben die Simulation von Proteinen, DNA und organischen Molekülen in einer Reihe von Lösungsmitteln oder in einer Lipidumgebung. Für die Simulation solcher biologischer Systeme gibt es eine ganze Reihe unterschiedlicher Kraftfelder, die nur geringfügig in ihrer funktionalen Form voneinander abweichen (z.B. CHARMM [8], AMBER [6], GROMOS [26]). Die verwendeten Strategien zur Bestimmung der Parametersätze sind jedoch in der Regel von Kraftfeld zu Kraftfeld unterschiedlich. Parameter der jeweiligen Kraftfelder sind aus diesem Grund nicht beliebig untereinander austauschbar. Eine Kombination unterschiedlicher Kraftfelder innerhalb einer Simulation, beispielsweise zur Behandlung unterschiedlicher Bestandteile des Systems, ist aber bedingt möglich.

Eine weitere Eigenschaft, die eine schnelle Berechnung der einzelnen Energieterme erlaubt, ist die mathematisch einfache Form der Kraftfeldfunktion. Das CHARMM-Kraftfeld ist ein so genanntes Klasse I-Kraftfeld. Dies bedeutet, dass die Kopplung interner Freiheitsgrade, wie z. B. der Einfluss einer Winkeländerung auf die Bindungslänge der beteiligten Atompaare nicht berücksichtigt wird und für die gebundenen Wechselwirkungen, mit Ausnahme der Torsionen, nur harmonische Terme zum Einsatz kommen. Aus diesem Grund sind Simulationen von mesoskopischen Systemen im Bereich von einigen 10^5 Atomen auf Zeitskalen im Nanosekundenbereich möglich.

In einigen Kraftfeldern werden alle Atome explizit berücksichtigt. Man spricht von so genannten *all-atom*-Kraftfeldern. Um die Anzahl an Atomen im System zu reduzieren und somit einen weiteren Gewinn an Rechengeschwindigkeit zu erhalten, werden in manchen

Kraftfeldern bestimmte Atomgruppen wie z. B. Wasserstoffatome, die an einem Kohlenstoffatom gebunden sind zu einem so genannten Verbundatom zusammengezogen. In diesem Fall spricht man dann von *united-atom*-Kraftfeldern. Den Geschwindigkeitsvorteil erkaufte man sich jedoch durch einen Verlust an Information und somit an Genauigkeit.

Mit heute vorhandenen Klasse I-Kraftfeldern sind bestimmte Limitierungen verbunden. So ist es nicht möglich, chemische Reaktionen zu simulieren oder die Verschiebung von Partialladungen zu berücksichtigen. Darüber hinaus ist keine genaue Beschreibung der Dynamik bei tiefen Temperaturen durchführbar. Das Hauptanwendungsgebiet liegt darin, Struktureigenschaften zu untersuchen, sowie die Beschreibung der Dynamik des untersuchten Systems bei Raumtemperatur korrekt wiederzugeben. Mit der ständig steigenden Rechenleistung ist auch die Komplexität der vorhandenen Kraftfelder in den letzten Jahren stetig angestiegen. In komplizierteren Kraftfeldern (Klasse II bzw. Klasse III Kraftfeldern) können Anharmonizitäten der gebundenen Wechselwirkungen, sowie Kopplungen interner Freiheitsgrade oder Polarisierbarkeit der Ladungsverteilung berücksichtigt werden [9, 27, 28]. Zur Simulation von chemischen Reaktionen steht eine Mischung aus MM-Kraftfeldern mit QM-Methoden (MM/QM) zur Verfügung; der interessante Bereich des Systems wird quantenmechanisch gerechnet und die Umgebung mittels klassischer Mechanik berücksichtigt [10]. Je nach Anwendungsgebiet bzw. Fragestellung, kann so aus einem sehr breiten Spektrum ein Kraftfeld zur effizienten Berechnung herangezogen werden, das optimal auf die Art des Systems, sowie die Messgröße des untersuchten Systems angepasst ist. In dieser Arbeit wurde ausschließlich mit dem CHARMM27 Kraftfeld gearbeitet [29]. Es handelt sich hierbei um ein *all-atom*-Klasse I-Kraftfeld, das primär für die Untersuchung biologischer Makromoleküle entwickelt wurde und das Standardkraftfeld des Simulationsprogramms NAMD [30] ist.

2.1.1.3. Die Newtonsche Bewegungsgleichung

Die dritte Vereinfachung besteht schließlich darin, dass die Dynamik der Atomkerne durch die klassische Newtonsche Bewegungsgleichung

$$-\frac{dV}{dr_i} = m_i \frac{d^2}{dt^2} \vec{r}_i, \text{ bzw. } \vec{F}_i(\vec{r}_j, t) = m_i \cdot a_i \quad (2.4)$$

beschrieben wird. In Gleichung (2.4) ist V die potentielle Energie des Systems, die aus der Kraftfeldfunktion (Gleichung (2.3)) berechnet werden kann, F_i ist die resultierende Kraft, m_i die Masse, a_i die Beschleunigung und r_i die Koordinate des i -ten Atoms. Durch zweimalige

numerische Integration pro Zeitschritt dt erhält man die Geschwindigkeiten und Koordinaten der Atomkerne.

Integrationsalgorithmus

Es existiert eine ganze Reihe an Algorithmen, mit denen die Newtonschen Bewegungsgleichungen numerisch integriert werden können. Wichtige Anforderungen sind, dass der verwendete Algorithmus energie- sowie impulserhaltend ist, sich zeitlich umkehren lässt und einen möglichst großen Integrationszeitschritt verwenden kann, ohne an Genauigkeit zu verlieren. Die Rechengeschwindigkeit bzw. die Speicheranforderungen sind in diesem Zusammenhang nicht von großer Bedeutung, da der eigentliche Integrationsschritt im Vergleich zur Kraftberechnung nicht ins Gewicht fällt. Viele der vorhandenen Algorithmen basieren auf der *Finite Differenz*-Methode. Dabei werden alle relevanten physikalischen Größen, wie Ort, Geschwindigkeit und Beschleunigung bzw. die Kraft in eine Taylorreihe entwickelt, was am Beispiel der Ortskoordinate in Gleichung (2.5) gezeigt ist.

$$r(t+dt) = r(t) + \frac{\partial r}{\partial t} dt + \frac{1}{2} \frac{\partial^2 r}{\partial t^2} dt^2 + \frac{1}{6} \frac{\partial^3 r}{\partial t^3} dt^3 + O(dt^4)$$

bzw.

$$r(t+dt) = r(t) + v(t) dt + \frac{1}{2} \frac{F(t)}{m} dt^2 + \frac{1}{6} \frac{\partial^3 r}{\partial t^3} dt^3 + O(dt^4)$$
(2.5)

$r(t)$ ist die Ortskoordinate zum Zeitpunkt t , $v(t)$ die dazugehörige Geschwindigkeit, $F(t)$ die Kraft zum Zeitpunkt t , m die Masse und dt der Integrationszeitschritt. Die Taylorentwicklung wurde im obigen Beispiel nach dem dritten Term abgebrochen. Der *Verlet*-Algorithmus [31] ist eine sehr verbreitete Methode, Bewegungsgleichungen in Molekulardynamik-Simulationen zu integrieren. Dazu muss in Gleichung (2.5) sowohl $r(t+dt)$ als auch $r(t-dt)$ entwickelt und beide Ausdrücke addiert werden. Die Rechenvorschrift des *Verlet*-Algorithmus lautet dann:

$$r(t+dt) = 2r(t) - r(t-dt) + \frac{F(t)}{m} dt^2.$$
(2.6)

Die Geschwindigkeiten sind in Gleichung (2.6) nicht mehr explizit enthalten, können aber mit $v(t) = [r(t+dt) + r(t-dt)]/2dt$ berechnet werden. Der *Verlet*-Algorithmus ist eine einfache Rechenvorschrift, die jedoch einige Nachteile mit sich bringt. So kann die Geschwindigkeit nicht zum selben Zeitpunkt berechnet werden, wie der Ort. Für eine Berechnung der

Geschwindigkeit $v(t)$ muss die Ortskoordinate des vorherigen Zeitschrittes $t-dt$ bekannt sein, sowie die des folgenden Zeitschrittes $t+dt$. Dazu kommt, dass die neuen Koordinaten durch die Addition eines sehr kleinen Terms $[F(t)/m]dt^2$ mit der Differenz zweier deutlich größeren Terme $2r(t)-r(t-dt)$ berechnet werden, was zu einem Verlust an Genauigkeit führen kann. Ein weiterer Punkt ist, dass der Algorithmus nicht „selbst startend“ ist. Zum Zeitpunkt $t = 0$ werden die Koordinaten des Zeitpunkts $t = -dt$ benötigt, die aber nicht vorhanden sind. Um diese Nachteile zu umgehen, werden heutzutage in den meisten Programmen Abwandlungen des *Verlet*-Algorithmus verwendet, wie beispielsweise der *Leap-Frog*-Algorithmus [32] oder der *Velocity-Verlet*-Algorithmus [33]. Der *Velocity-Verlet*-Algorithmus kommt im Programm NAMD zum Einsatz. Die Rechenvorschrift lautet

$$r(t+dt) = r(t) + v(t)dt + \frac{F(t)}{2m}dt^2$$

und

$$v(t+dt) = v(t) + \frac{1}{2m}[F(t) + F(t+dt)]dt \quad . \quad (2.7)$$

Der Ort $r(t)$, die Geschwindigkeit $v(t)$ und die Kraft $F(t)$ können mit Hilfe von Gleichung (2.7) für denselben Zeitpunkt berechnet werden. Der verwendete Zeitschritt dt ist so zu wählen, dass die höchstfrequenten Bewegungen im System ausreichend häufig abgetastet werden. Bei biologischen Systemen sind dies Streckenschwingungen mit Beteiligung eines Wasserstoffatoms, die im Bereich von einigen Femtosekunden liegen. Dies führt zu einer oberen Grenze des Integrationszeitschritts von 0.5 fs bis 1 fs. Durch Verwendung spezieller Rechenvorschriften, wie beispielsweise dem *Shake*-Algorithmus [5], der einem Einfrieren dieser Schwingungen gleich kommt, lässt sich diese obere Grenze auf einige Femtosekunden vergrößern, ohne die Genauigkeit der Simulation maßgeblich zu vermindern [34]. Als Ergebnis der numerischen Integration erhält man für jedes Atom Trajektorien von Ort und Geschwindigkeit, sowie Informationen über die einzelnen Energieterme aus der Kraftfeldfunktion zu jedem Zeitschritt.

2.1.2. Wichtige Parameter einer MD-Simulation

2.1.2.1. Lösungsmittel

Zur genauen Beschreibung der Dynamik von Biomolekülen oder biologischen Systemen sollte deren natürliche Umgebung berücksichtigt werden, um möglichst nahe an der „Wirklichkeit“ zu bleiben. Im Fall von Proteinen sollten daher Wasser, Lipide (bei membran-gebundenen Proteinen), Ionen und Cofaktoren, mit denen das Protein eine Wechselwirkung eingehen kann, in das Simulationssystem eingebaut werden. Die untersuchten Proteine werden gegebenenfalls in eine Doppellipidschicht eingebettet und in einer Wasserbox solvatisiert. Zusätzlich können Ionen oder andere Moleküle in das System eingebaut werden. Dies ist in **Abb. 2.2** an zwei Beispielen illustriert.

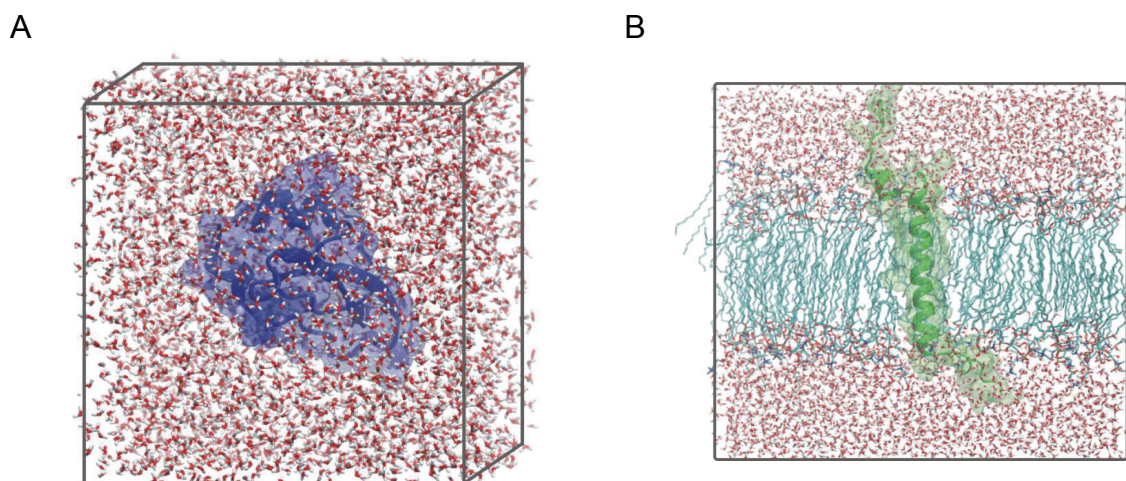


Abb. 2.2

Biologische Modellsysteme für die Durchführung von MD-Simulationen. (A) Protein-Wassersystem und ein (B) Protein-Lipid-Wassersystem. Das Protein ist in blau (Surface-Darstellung)(A) bzw. grün (Cartoon-Darstellung) (B) gezeigt.

Im linken Teil der Abbildung ist ein System gezeigt, das aus dem Protein *Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor* (BPTI) und einer Wasserbox besteht. Im rechten Teil der Abbildung ist eine Transmembranhelix in eine Doppellipidschicht eingebaut. Die Membran wird von Wasser umgeben. Dieses System stellt ein Beispiel für ein Protein-Lipid-Wassersystem dar. Der Großteil der simulierten Atome wird durch die Umgebung dargestellt, was bis zu 90% der gesamten Systemgröße ausmachen kann. Das Hauptinteresse besteht in der Regel jedoch an der Beschreibung der Dynamik des Proteins oder Biomoleküls und nicht an der Beschreibung der Dynamik des Lösungsmittels. Man ist daher bestrebt, möglichst wenig Rechenzeit für die Simulation einer unnötig großen Anzahl an Lösungsmittel aufzubringen.

2.1.2.2. Periodische Randbedingungen

Eine elegante Methode, die Anzahl der verwendeten Lösungsmittelatome und damit den Rechenaufwand gering zu halten und dennoch eine Simulation im *bulk* zu ermöglichen, ist die Verwendung von periodischen Randbedingungen. Dabei verwendet man ein minimales System, das in allen drei Raumrichtungen unendlich oft kopiert wird. Dies ist schematisch in **Abb. 2.3** zu sehen. Unerwünschte Artefakte durch Periodizität werden vermieden, indem Atome mit ihren Kopien aus benachbarten Zellen des Systems (in **Abb. 2.3** anhand der roten Punkte dargestellt) nicht direkt miteinander wechselwirken können oder diese Wechselwirkung zumindest vernachlässigbar klein ist. Dies wird durch eine ausreichend dimensionierte Einheitszelle erreicht, was einen genügend großen Abstand der Atome zu ihren jeweiligen Kopien in unterschiedlichen Zellen gewährleistet. Die Begrenzung der Einheitszelle kann jede raumfüllende Geometrie aufweisen.

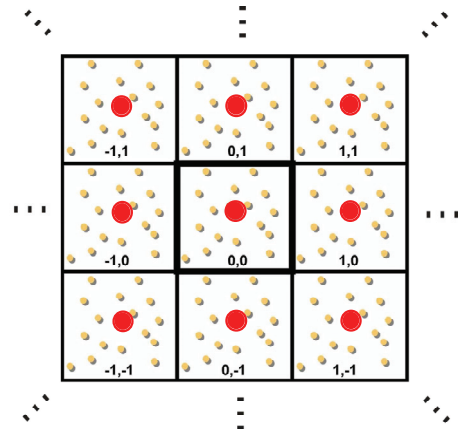


Abb. 2.3
Schematische Darstellung eines Systems mit periodischen Randbedingungen. $[0,0]$ ist die zentrale Einheitszelle. Diese wird in alle drei Raumrichtungen (hier in 2D) unendlich oft kopiert.

2.1.2.3. Elektrostatische Wechselwirkung

Zur Bestimmung der Trajektorie muss für jeden Zeitschritt einer MD-Simulation die Kraft berechnet werden, die auf jedes Atom im System wirkt. Anhand der Kraftfeldfunktion aus Gleichung (2.3) ist ersichtlich, dass die Berechnung der gebundenen Wechselwirkungen mit der Anzahl der Atome im System linear skaliert. Bindungen, Winkel und Torsionen sind gerichtete Wechselwirkungen, die nur zwischen kovalent gebundenen Atomen wirken. Der rechenintensivste Teil einer MD-Simulation ist die Evaluierung der nicht gebundenen Wechselwirkungen zu jedem Zeitschritt. Die Summation erfolgt über alle möglichen Wechselwirkungspaare und hat eine N^2 -Abhängigkeit von der Anzahl der Atome im System. Durch die Verwendung eines Abschneideradius (*Cutoffs*) werden alle Wechselwirkungen ab einem definierten Radius, typischerweise von 10 \AA bis 12 \AA , nicht mehr berücksichtigt und man erhält eine lineare Abhängigkeit mit der Anzahl der Atome im System. Für die Berechnung der Van der Waals-Wechselwirkung, die eine Abstandsabhängigkeit von r^{-6} hat, ist diese Vorgehensweise gerechtfertigt. Die auftretenden Wechselwirkungsenergien sind im Bereich des Abschneideradius bereits vernachlässigbar klein. Für das langreichweitige Coulombpotential mit einer Abstandsabhängigkeit von r^{-1} stellt sich die Situation anders dar: würde man hier

einen einfachen Abschneideradius verwenden, wäre dies mit Fehlern bzw. Artefakten verbunden.

Liegt ein System mit periodischen Randbedingungen vor, so hat die zu berechnende Coulombsumme folgende Form:

$$E_{EL} = \frac{1}{2} \sum_{|n|} \sum_{i,j=1}^N \frac{q_i q_j}{|r_i - r_j + n|}. \quad (2.8)$$

Für jedes Atom i in der zentralen Einheitszelle wird die Wechselwirkung mit jedem anderen Atom j in derselben Zelle ($n = 0$), sowie mit allen anderen Atomen j aus allen anderen Zellen ($n \neq 0$) berechnet.

Ewald-Summation

In der Ewald-Summation [35] wird die Berechnung der elektrostatischen Wechselwirkung in zwei Schritten durchgeführt. Jede Partialladung des Systems (Punktladung) wird mit einer Gaußförmigen Ladungsverteilung abgeschirmt. Die Wechselwirkung der nun abgeschirmten Punktladungen (= Summe aus Punktladungen + abschirmender Gaußförmiger Ladungsverteilung) wird durch eine direkte Summation mit einem Abschneideradius berechnet. Zusätzlich wird zur Kompensation der künstlichen, neutralisierenden Ladungsverteilung eine komplementäre Ladungsverteilung mit umgekehrtem Vorzeichen eingeführt. Der Anteil der Wechselwirkung, der durch die kompensierende Gaußförmige Ladungsverteilung entsteht, wird im Fourierraum berechnet.

In heute gängigen MD-Programmen wird zur Berechnung der Elektrostatik das so genannte *Particle Mesh Ewald* (PME)-Verfahren angewandt, welches die Ladungen auf einem Raster ausrichtet und so die reziproke Summe mit Hilfe einer *Fast Fourier Transformation* (FFT) berechnet werden kann. Dadurch skaliert der Algorithmus mit $N \log N$ [36]. Diese Vorgehensweise führt zu einem enormen Geschwindigkeitsvorteil, bei gleichzeitiger Berücksichtigung der langreichweitigen Wechselwirkungen.

2.1.2.4. Temperatur- und Druckkopplung

Mit dem bisherigen Wissen lässt sich eine MD-Simulation mit konstanter Teilchenzahl N , konstantem Volumen V und konstanter Energie E , also im mikrokanonischen (NVE) Ensemble durchführen. Ein Austausch von Energie mit der Umgebung wird nicht berücksichtigt. Dies ist bei Simulationen biologischer Systeme jedoch in den meisten Fällen

erwünscht. Um möglichst nahe am Experiment zu bleiben, soll ein biologisches System entweder bei einer konstanten Temperatur und einem konstanten Volumen (NVT, kanonisches Ensemble) oder einer konstanten Temperatur und einem konstanten Druck (NPT, isotherm-isobares Ensemble) untersucht werden.

Temperaturkopplung

Zur Temperaturkontrolle muss das System in der Lage sein, Wärme mit der Umgebung austauschen zu können. Es gibt eine Reihe von Methoden, die eine solche Kopplung in einer MD-Simulation realisieren. Im einfachsten Fall werden die Geschwindigkeiten der einzelnen Atome nach jedem Zeitschritt mit einem Faktor λ so skaliert, dass sich die gewünschte Geschwindigkeitsverteilung und damit die gewünschte Temperatur einstellt [37]. Eine weitere Methode zur Temperaturkontrolle stellt die Kopplung des Systems an ein Wärmereservoir dar [38]. Bei dieser Methode werden die Geschwindigkeiten ebenfalls nach jedem Zeitschritt skaliert, jedoch proportional zur Differenz zwischen der momentanen Temperatur und einer Referenztemperatur. Damit nähert sich die Temperatur exponentiell dem gewünschten Wert an.

In dieser Arbeit wurde die *Langevin*-Methode verwendet, bei der die Kopplung des Wärmebads an das Simulationssystem durch einen geschwindigkeitsabhängigen Reibungsterm $-\gamma \cdot m \cdot v$ und eine stochastische Kraftkomponente $R(t)$ berücksichtigt wird [22]. Die *Langevin*-Gleichung lautet

$$m_i a_i = F_i(r) - \gamma_i m_i v_i + R_i(t). \quad (2.9)$$

Hierbei ist m_i die Masse, a_i die Beschleunigung, $F_i(r)$ die wirkende Kraft, γ_i die Dämpfungskonstante, k_B die Boltzmannkonstante und $R_i(t)$ eine stochastische Kraft, die auf das i -te Atom wirkt. Der Reibungsterm entfernt kinetische Energie aus dem System: der stochastische Term bringt Energie in das System ein. Beide Terme sind über die Beziehung

$$\langle R_i(t) \cdot R_i(t') \rangle = 2k_B T m_i \gamma_i \delta(t-t') \quad (2.10)$$

miteinander verknüpft, wobei T die Referenztemperatur des Systems ist.

Druckkopplung

Zur Druckkontrolle werden analog zur Regulierung der Temperatur ähnliche Annahmen gemacht bzw. Verfahren verwendet [38, 39]. Eine Kopplung an ein Druckbad wird vorgenommen, indem das Volumen der Simulationszelle verändert wird, was durch Skalierung der Atomkoordinaten erfolgt. In dieser Arbeit wurde, entsprechend der Temperaturkontrolle, die *Langevin-Piston*-Methode verwendet [40]. Dabei wird das System um einen Freiheitsgrad, das Systemvolumen, erweitert. Dieser zusätzliche Freiheitsgrad wird ebenfalls mit einer *Langevin*-Gleichung beschrieben.

2.1.2.5. Strukturelle Abweichung

Zu Beginn einer MD-Simulation sind Größen wie Temperatur, Gesamtenergie und Volumen nicht im thermodynamischen Gleichgewicht. Dies gilt ebenso für die Struktur des untersuchten Biomoleküls. Im Allgemeinen sind Strukturdaten, die aus Röntgenstrukturanalysen, NMR-Untersuchungen oder einer Modellierung stammen, der Ausgangspunkt einer MD-Simulation. Zu Beginn der Simulation muss dem System Zeit gegeben werden, um sich zum einen auf die vorgegebenen Systemparameter einzustellen und zum anderen strukturell in einen Gleichgewichtszustand überzugehen. Eine der wichtigsten strukturellen Größen, um diesen Prozess zu verfolgen, stellt die Wurzel aus der mittleren quadratischen Abweichung (RMSD – *root mean square deviation*) der untersuchten Struktur bezüglich einer Referenzstruktur dar. Diese strukturelle Abweichung lässt sich mit Hilfe von Gleichung (2.11) bestimmen.

$$RMSD = \min \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_i - x_{i,0})^2 + (y_i - y_{i,0})^2 + (z_i - z_{i,0})^2} \quad (2.11)$$

In Gleichung (2.11) sind x_i , y_i , z_i und $x_{i,0}$, $y_{i,0}$, $z_{i,0}$ die Koordinaten der aktuellen Struktur und der Referenzstruktur, N ist die Anzahl der Atome im System. Das ‚min‘ unter dem Gleichheitszeichen deutet an, dass die Strukturen gegeneinander translatiert bzw. rotiert werden, bis der RMSD-Wert minimiert wird oder mit anderen Worten, bis sich beide Strukturen am ähnlichsten sind. Diese Größe wird während der Simulation dazu verwendet, die zeitliche Entwicklung der Struktur in Bezug auf die Referenzstruktur zu verfolgen. Von einer equilibrierten Struktur wird ausgegangen, wenn Observablen, wie beispielsweise der RMSD-Wert, einen stabilen Verlauf ohne erkennbare Drift zeigen.

2.2. Beschleunigte Simulationen

Mit der heute zur Verfügung stehenden Rechenleistung ist man in der Lage ein biologisches System, bestehend aus hunderttausenden Atomen, mit Hilfe von MD-Simulationen bis zu einige 10 Nanosekunden zu simulieren. Für die meisten biologischen Prozesse ist eine Simulationszeit im Nanosekundenbereich jedoch nicht ausreichend. Biologische Prozesse bewegen sich auf Zeitskalen von Mikrosekunden bis in den Sekundenbereich. Verglichen mit den simulierbaren Zeiten, ist die MD-Simulation um Größenordnungen zu langsam, um biologische Prozesse direkt zu simulieren. Einen Überblick einiger relevanter Zeiten ist schematisch in **Abb. 2.4** dargestellt.

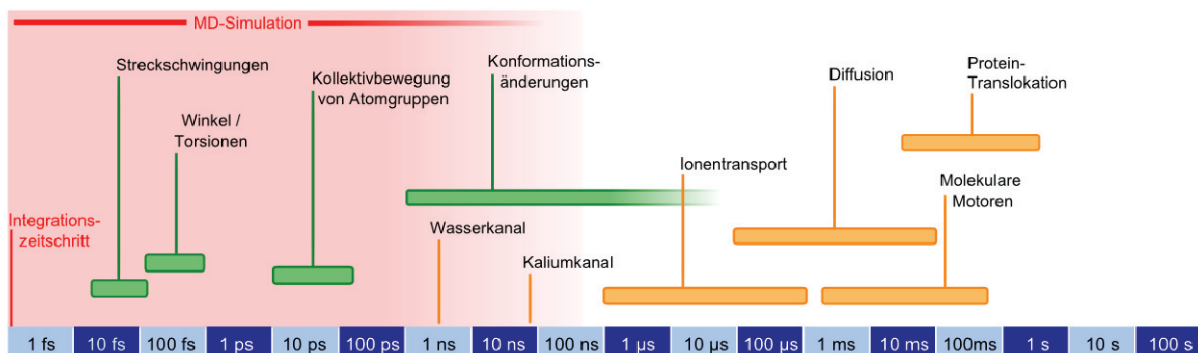


Abb. 2.4

Zeitskala unterschiedlicher chemischer und biologischer Prozesse. Intramolekulare Prozesse sind in grün, biologische Prozesse, die auch intermolekularer Natur sein können, sind in orange eingezeichnet. Heute realisierbare Simulationszeiten mit MD-Simulationen sind in rosa unterlegt. Der typische Integrationszeitschritt einer MD-Simulation ist in rot gekennzeichnet.

In **Abb. 2.4** sind intramolekulare (grün) sowie intermolekulare Wechselwirkungen und biologische Prozesse (orange) gemäß ihrer typischen Zeiten unterteilt. In rot ist der Integrationszeitschritt eingezeichnet, in rosa ist der mit heutiger Rechenleistung typischerweise simulierbare Bereich hinterlegt. Die Zeitachse verläuft logarithmisch und deckt einen Zeitraum von 1 fs bis 100 s ab. Alle intramolekularen Wechselwirkungen wie z. B. die Kollektivbewegungen von Atomgruppen oder Winkel bzw. Torsionsänderungen spielen sich im Bereich von 10 fs bis hin zu 100 ps ab. Größere Konformationsänderungen eines Proteins liegen bereits auf Zeitskalen, die bis in den μ s-Bereich reichen und nicht immer von MD-Simulationen erfasst werden können. Biologisch interessante Prozesse, wie beispielsweise die Proteintranslokation, die zwischen 100 ms und 1 s abläuft, sind mit der Methode der MD-Simulation nicht zu untersuchen, da hier zeitlich gesehen ca. fünf Größenordnungen fehlen. Ausnahmen bilden die Kanalproteine für den Transport von kleinen Molekülen. Hier verläuft

der Prozess zur Translokation von Wasser oder Kalium auf einer Zeitskala, die noch von MD-Simulationen erreicht werden kann.

Um diese Systeme dennoch mit den zur Verfügung stehenden Rechenressourcen untersuchen zu können, wurden verschiedene Methoden entwickelt, die zu einer Beschleunigung des untersuchten Prozesses führen [15-17]. Im Allgemeinen unterscheiden sich diese Methoden in ihrer Vorgehensweise. Sie besitzen aber auch eine Gemeinsamkeit: alle Methoden greifen von außen in die Simulation ein und bewegen das System aus einem Anfangszustand in einen Endzustand. Dadurch wird es möglich, Potentialbarrieren zu überschreiten, die in dem kurzen Simulationsfenster aufgrund von thermischer Aktivierung, in einer konventionellen MD-Simulation, nicht überwunden werden können. Um dies zu erreichen, wird in allen Methoden die verwendete Kraftfeldfunktion verändert bzw. um einen oder mehrere Terme erweitert, die einen Einfluss auf unterschiedliche Teile des Systems haben. Eine dieser Methoden, die *Steered Molecular Dynamics*-Methode [17], wurde in dieser Arbeit eingesetzt und wird im Folgenden näher beschrieben.

2.2.1. Steered Molecular Dynamics

Bei der *Steered Molecular Dynamics* (SMD)-Methode wird das System von einem Anfangs- in einen Endzustand bewegt, in dem eine Kraft von außen an einem Teil des untersuchten Systems angelegt wird. Diese Kraft wird mit Hilfe eines sich bewegenden harmonischen Potentials

$$V_{\text{SMD}} = \frac{1}{2} k_{\text{SMD}} [x - x_0 - vt]^2 \quad (2.12)$$

auf das System übertragen. In Gleichung (2.12) ist k_{SMD} die Kraftkonstante, x die Reaktionskoordinate, x_0 die Referenzposition und v die Geschwindigkeit, mit der sich das Potential bewegt. Die zugehörige Kraft berechnet sich somit zu

$$F_{\text{extern}} = k_{\text{SMD}} [x_0 + vt - x]. \quad (2.13)$$

Das Potential und damit auch die externe Kraft können je nach Bedarf nur auf bestimmte Atome bzw. Atomgruppen wirken. Dies entspricht einer Situation, bei der die Atome von einer Feder mit einer Federkonstanten k_{SMD} entlang einer Koordinate x gezogen werden. Die Feder bewegt sich dabei mit der Geschwindigkeit v .

Das Prinzip der SMD-Simulation ist am Beispiel von Dekalalanin, einem Peptid aus zehn Alanin-Resten, in **Abb. 2.5** schematisch dargestellt. Zur Visualisierung ist eine Feder eingezeichnet, die am C_α -Atom der letzten Aminosäure (blau) angreift und sich mit der Geschwindigkeit v in x -Richtung bewegt.

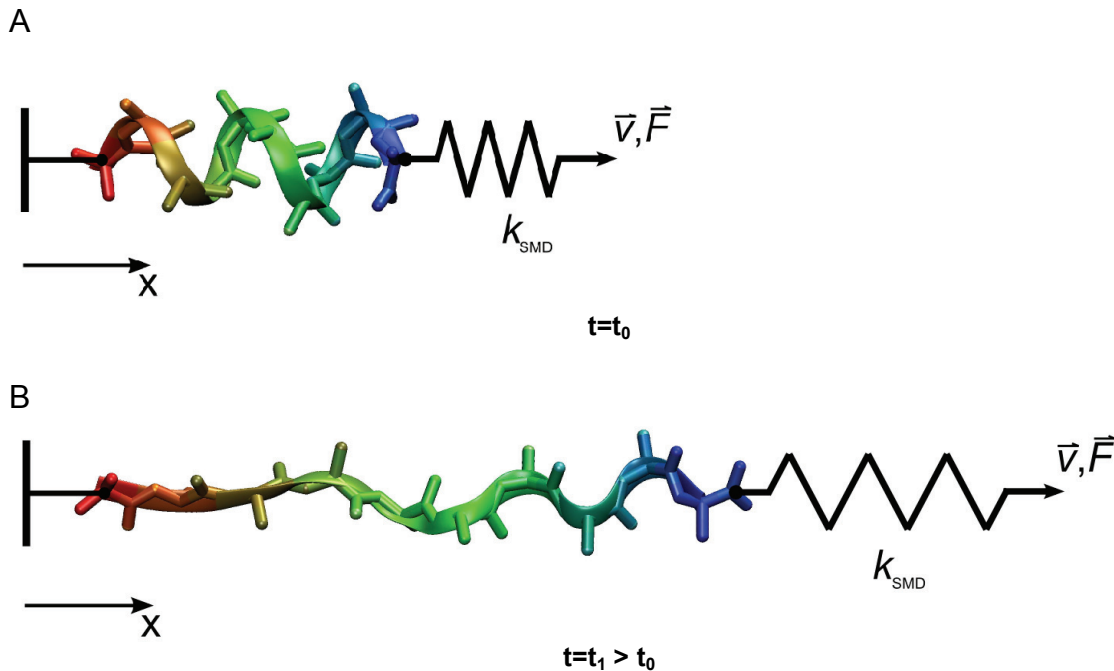


Abb. 2.5

Schematische Darstellung des Prinzips der SMD-Simulation am Beispiel des Peptids Dekalalanin. Die einzelnen Alanin-Reste sind in unterschiedlichen Farben eingezeichnet. Das C_α -Atom der ersten Aminosäure (rot) ist fest im Raum fixiert, das C_α -Atom der letzten Aminosäure (blau) ist mit einer Feder, also mit dem SMD-Potential verbunden. Bewegt sich das Potential in die x -Richtung, wird eine Kraft auf das C_α -Atom des letzten Alanin-Rests ausgeübt. Dies ist durch die Feder angedeutet. Zu Beginn der Simulation $t = t_0$ befindet sich das Dekalalanin in einem gefalteten Zustand (A), am Ende der Simulation $t = t_1$ in einer gestreckten Konformation (B).

Mit Hilfe der SMD-Simulation wird Dekalalanin von einer helikalen Struktur (**Abb. 2.5A**) in eine gestreckte Konformation überführt (**Abb. 2.5B**). Eine SMD-Simulation kann bei konstanter Geschwindigkeit v oder konstanter Kraft F ablaufen. Dies ist ähnlich einem AFM-Experiment, jedoch sind die Möglichkeiten der SMD-Methode weitaus umfangreicher [41]. So können gleichzeitig unterschiedliche Atome mit unterschiedlichen Kräften manipuliert werden. Darüber hinaus sind auch komplizierte Reaktionspfade mit verschiedenen Richtungsänderungen und variierenden Kraftkonstanten möglich. Durch Anlegen eines Drehmomentes an Teilen eines Proteins war es möglich, eine Rotationsbewegung bestimmter Domänen zu induzieren [42]. Die Informationen, die man durch SMD-Simulationen erhält, sind zum einen qualitativ, da man einen Einblick in die beschleunigten Prozesse erhält und zum anderen

quantitativ, da die externe Kraft als Funktion der Zeit bzw. der Reaktionskoordinate direkt zugänglich ist.

2.3. Freie Energie des Simulationssystems

Bei der Beschreibung von biologischen Prozessen ist die Kenntnis über die Freie Energie des Systems eine überaus nützliche Information. Aus ihr lassen sich sämtliche thermodynamischen Größen direkt oder aus einer Ableitung der Freien Energie bestimmen. Damit können beispielsweise Bindungskonstanten oder Reaktionskinetiken ermittelt werden, die zur Beschreibung vieler biologischer Prozesse erforderlich sind. Die Freie Energie lässt sich jedoch nicht direkt aus einer konventionellen MD-Simulation extrahieren. Für ein kanonisches Ensemble (NVT) kann die Freie Energie eines Zustandes gemäß

$$A = -k_B T \ln Z \quad (2.14)$$

berechnet werden, wobei A die Freie Energie, k_B die Boltzmannkonstante, T die Temperatur und Z die kanonische Zustandssumme ist. Die kanonische Zustandssumme kann folgendermaßen beschrieben werden

$$Z = \int e^{-\frac{1}{k_B T} E(\mathbf{R})} d\mathbf{R} \quad (2.15)$$

$E(\mathbf{R})$ ist die Energie des Systems, \mathbf{R} eine Konfiguration im Phasenraum und $\int d\mathbf{R}$ ist ein Integral über den Phasenraum. Bei Kenntnis der Zustandssumme, lässt sich die Freie Energie berechnen. Die Schwierigkeit bei der Bestimmung der Freien Energie ist es, den gesamten Phasenraum zu durchmustern, um einen genauen Wert der Zustandssumme zu erhalten. MD-Simulationen bewegen sich nur in einem sehr eingeschränkten Teil des Phasenraums. Dabei handelt es sich um Bereiche, die zu Zuständen mit niedriger Energie gehören. Größen, wie beispielsweise die Innere Energie, in deren Berechnung diese niederenergetischen Zustände mit großem Gewicht eingehen, lassen sich deshalb relativ genau abschätzen. Die Innere Energie U lässt sich gemäß

$$U = \int d\mathbf{R} E(\mathbf{R}) \cdot \rho(\mathbf{R}) \quad (2.16)$$

berechnen. Die Phasenraumdichte $\rho(\mathbf{R})$ ist definiert als

$$\rho(\mathbf{R}) = \frac{e^{-\frac{E(\mathbf{R})}{k_B T}}}{Z} \quad (2.17)$$

und gibt an, mit welcher Wahrscheinlichkeit ein Zustand mit zugehöriger Energie $E(\mathbf{R})$ eingenommen wird. Beiträge mit großer Energie $E(\mathbf{R})$ haben eine geringe Wahrscheinlichkeit und somit ein geringes Gewicht bei der Berechnung des Integrals in Gleichung (2.16) bzw. bei der Bestimmung der Inneren Energie U .

Durch Umformung und unter Verwendung der Gleichungen (2.15) und (2.17) lässt sich die Freie Energie als

$$A = k_B T \ln \left(\int d\mathbf{R} e^{-\frac{E(\mathbf{R})}{k_B T}} \cdot \rho(\mathbf{R}) \right) \quad (2.18)$$

in einer ähnlichen Form wie Gleichung (2.16) beschreiben. In Gleichung (2.18) sind Normierungsfaktoren der Einfachheit wegen vernachlässigt worden. Für eine genaue Bestimmung der Freien Energie und damit auch der Entropie müssen Zustände mit großer Energie $E(\mathbf{R})$, die durch den Exponentialterm $\exp(+E(\mathbf{R})/k_B T)$ eine große Gewichtung bei der Berechnung des Integrals haben, ausreichend oft eingenommen werden. Dies wird in der Praxis, selbst mit den längsten MD-Simulationen nicht erreicht.

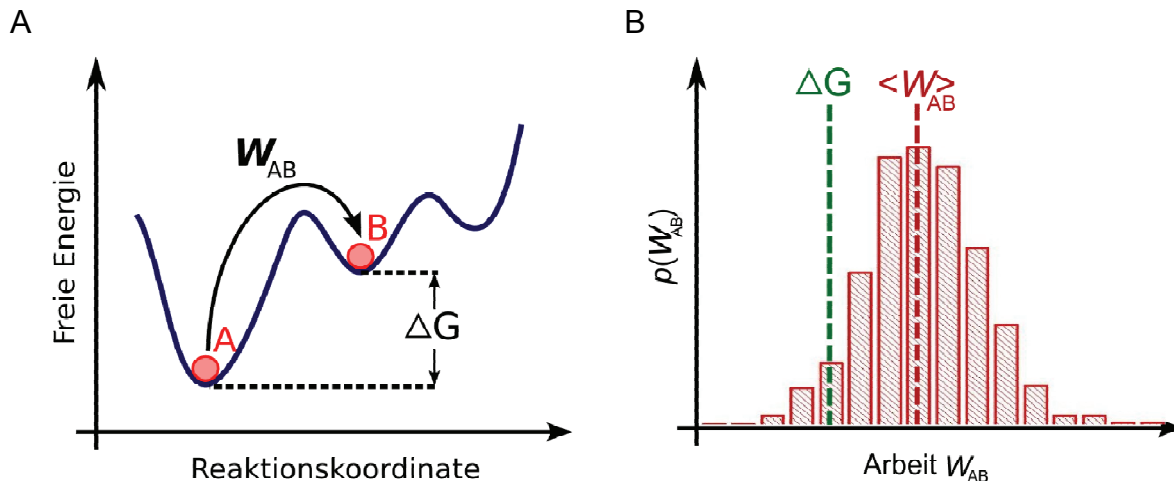
In der Regel ist jedoch nicht die genaue Kenntnis über die Freie Energie wichtig, sondern die Änderung der Freien Energie zwischen zwei Zuständen bzw. die Änderung der Freien Energie entlang eines definierten Weges, das so genannte *Potential of Mean Force* (PMF). Diese Größe lässt sich bestimmen, indem das System während der Simulation entlang einer Reaktionskoordinate aus einem Zustand A in einen Zustand B überführt wird. Die Änderung der Freien Energie selbst, kann wie die Freie Energie nicht direkt aus einer der klassischen MD-Simulation extrahiert werden. Alle Phasenraumbereiche, die beide betrachteten Zustände miteinander verbinden, müssen ausreichend häufig durchmustert werden. Um eine ausreichende Durchmusterung zu gewährleisten, wird die Methode des *Umbrella Sampling* eingesetzt [15]. Durch ein Zusatzpotential wird das System in definierten Bereichen entlang der gewählten Reaktionskoordinate gehalten. Diese Bereiche werden einzeln simuliert. Das Zusatzpotential garantiert, dass die zur Bestimmung des PMF notwendigen Punkte im Phasenraum ausreichend durchmustert werden. Aus den Aufenthaltswahrscheinlichkeiten kann das PMF mit Hilfe der Gewichteten Histogramm Analyse-Methode (*Weighted Histogram Analysis Method*) ermittelt werden [18]. Für einige praktische Anwendungen, bei denen entweder Systeme mit einer großen Anzahl an Atomen behandelt, oder eine große Anzahl an

Punkten entlang der Reaktionskoordinate berücksichtigt werden müssen, kann es aufgrund limitierter Rechenressourcen Schwierigkeiten geben, genügend Daten zu produzieren, um die ganze Reaktionskoordinate ausreichend genau abzutasten.

Eine Alternative, um in solchen Fällen das PMF zu bestimmen, ist die Verwendung von SMD-Simulationen, gekoppelt mit einer statistischen Analyse (Fluktuationstheoreme). Dies wird im Folgenden genauer erläutert.

2.4. Fluktuationstheoreme

Durch Beschleunigung der MD-Simulation lässt sich das untersuchte System auf simulierbarer Zeitskala vom Zustand A in den Zustand B überführen. In der makroskopischen Welt muss man bei jedem Prozess, der nicht quasistatisch ist, d.h. nicht im Gleichgewicht abläuft, mehr Arbeit in das System einbringen, als es durch die Änderung der Freien Energie erforderlich wäre. Wärme wird an das Wärmebad abgegeben, Energie wird dissipiert. Dieser Sachverhalt ist im zweiten Hauptsatz der Thermodynamik verankert, der besagt, dass $W_{AB} \geq \Delta G$ ist. W_{AB} ist die am System verrichtete Arbeit, die aus einem reversiblen Anteil W_{rev} und einem irreversiblen Anteil W_{diss} besteht ($W_{AB} = W_{rev} + W_{diss}$). Thermische Fluktuationen spielen in der makroskopischen Welt keine Rolle. Wird ein Prozess, bei identischer Prozessführung mehrfach durchgeführt, muss dabei jedes Mal dieselbe Arbeit $W_{AB} > W_{rev}$ geleistet werden. Anders verhält es sich in der mikroskopischen Welt und damit auch in der Welt der MD-Simulation. Die energetischen bzw. Größenverhältnisse liegen so vor, dass thermische Fluktuationen eine entscheidende Rolle spielen. Aufgrund von thermisch verursachten Atombewegungen bzw. Kollisionen können Übergänge zwischen Zuständen eines Systems behindert oder begünstigt werden, was sich in unterschiedlichen Arbeitswerten W_{AB} äußert. Dies ist schematisch in **Abb. 2.6** dargestellt. Das System wird vom Zustand A entlang einer Reaktionskoordinate in den Zustand B überführt. Zur Überwindung von ΔG muss die Arbeit W_{AB} aufgebracht werden (**Abb. 2.6A**). Führt man diesen Prozess mehrfach aus, so erhält man eine Verteilung $p(W_{AB})$ der Arbeitswerte (**Abb. 2.6B**).

**Abb. 2.6**

(A) Das System wird aus Zustand A entlang einer Reaktionskoordinate in einen Zustand B überführt. Die Änderung der Freien Energie ist ΔG , die hierfür notwendige Arbeit ist W_{AB} . (B) Histogramm der Arbeitswerte W_{AB} bei mehrfacher Durchführung des Prozesses. Eingezeichnet sind der Mittelwert der Arbeit $\langle W_{AB} \rangle$ (rot), sowie die tatsächliche Änderung der Freien Energie ΔG (grün).

In **Abb. 2.6B** ist die Änderung der Freien Energie in grün eingezeichnet. Hauptsächlich treten Ereignisse auf, bei denen $W_{AB} > \Delta G$ ist, was aufgrund der Prozessführung im Nichtgleichgewicht zu erwarten ist. Thermische Fluktuationen können den Übergang aber so weit begünstigen, dass $W_{AB} < \Delta G$ und die aufzubringende Arbeit kleiner als die Änderung der Freien Energie ist. Arbeitswerte einzelner Ereignisse, die kleiner als die Änderung der Freien Energie sind, stellen keine Verletzung des 2. Hauptsatzes dar, da dieser genau genommen für den Mittelwert der Arbeit W_{AB} definiert ist: $\langle W_{AB} \rangle \geq \Delta G$, wobei die spitzen Klammern das Ensemblemittel darstellen. Somit wird auch in mikroskopischen Systemen bei nicht-quasistatischer Prozessführung im Mittel Energie dissipiert. Aus einer einzelnen Trajektorie lässt sich die Änderung der Freien Energie nur für einen quasistatisch geführten Prozess direkt entnehmen. Dieser Sachverhalt kann aufgrund der Beschleunigung der SMD-Simulationen jedoch in den wenigsten Fällen als realistisch angenommen werden. Vielmehr arbeitet man in der Regel im Nichtgleichgewicht. Die thermischen Fluktuationen des Systems können herangezogen werden, um selbst bei einer Prozessführung im Nichtgleichgewicht Aussagen über die zugrunde liegende Änderung der Freien Energie machen zu können. Aus der statistischen Physik sind Fluktuationstheoreme bekannt, die für beliebig weit ins Nichtgleichgewicht getriebene Systeme gültig sind, und die es erlauben, Gleichgewichtsgrößen wie zum Beispiel die Änderung der Freien Energie aus einem Satz an Nichtgleichgewichtsdaten zu extrahieren. Im

Folgendes wird näher auf ein Fluktuationstheorem, der Jarzynski-Gleichung, und dessen Anwendung in der MD-Simulation eingegangen.

2.4.1. Die Jarzynski-Gleichung

Im Jahr 1997 wurde von Jarzynski eine integrale Version eines Fluktuationstheorems formuliert [19]. Diese Formulierung verknüpft die Änderung der Freien Energie mit einer exponentiellen Mittelung der am System verrichteten externen Arbeit. Hierbei wird ein System, das an ein Wärmebad gekoppelt ist, aus einem Gleichgewichtszustand A in einen beliebigen Zustand B überführt. Das Protokoll von A nach B ist beliebig; es muss jedoch für jede Simulation identisch sein. Typischerweise wird dieses Protokoll durch einen Kontrollparameter λ beschrieben, der von $\lambda(t_A)=0$ bis $\lambda(t_B)=1$ geschaltet wird. Die Wahl des Parameters λ ist beliebig. Die Arbeit, die entlang einer einzelnen Trajektorie am System verrichtet wird, ist dann

$$W = \int_{t_A}^{t_B} d\tau \dot{\lambda} \frac{\partial H(r(\tau))}{\partial \lambda}. \quad (2.19)$$

W ist die verrichtete Arbeit, $\lambda(t)$ ist das Protokoll und $H(r(\tau))$ ist die Hamiltonfunktion, die die Energie des Systems beschreibt. Für den Fall, dass das Protokoll $\lambda(t)$ gerade der Koordinate des SMD-Potentials entspricht, vereinfacht sich die Gleichung zu

$$W = \int_0^{z'} dz F(z), \quad (2.20)$$

dem Integral der Kraft F entlang der Reaktionskoordinate z . Für ein System, das sich durch die *Langevin*-Gleichung beschreiben lässt, gilt die Jarzynski-Gleichung

$$\exp\left[-\frac{\Delta G(z)}{k_B T}\right] = \left\langle \exp\left[-\frac{W(z, r)}{k_B T}\right] \right\rangle_N. \quad (2.21)$$

W ist die externe Arbeit entlang einer einzelnen Trajektorie, k_B die Boltzmannkonstante, T die Temperatur des Wärmebads und ΔG ist die Änderung der Freien Energie. Die spitzen Klammern beschreiben eine Mittelung über N Trajektorien. Im Grenzfall einer unendlichen Anzahl von Trajektorien ist Gleichung (2.21) exakt erfüllt; für eine endliche Anzahl an Trajektorien lässt sie eine Abschätzung von ΔG zu. Die Abschätzung ist stark davon

abhängig, wie genau sich die Arbeitsverteilung mit der vorhandenen Anzahl an Trajektorien beschreiben lässt. Die exponentielle Mittelung der Arbeitswerte in der Jarzynski-Gleichung wird vor allem durch Trajektorien mit kleinen Arbeitswerten bzw. Arbeitswerten, die sogar kleiner sind als die Änderung der Freien Energie ΔG , bestimmt.

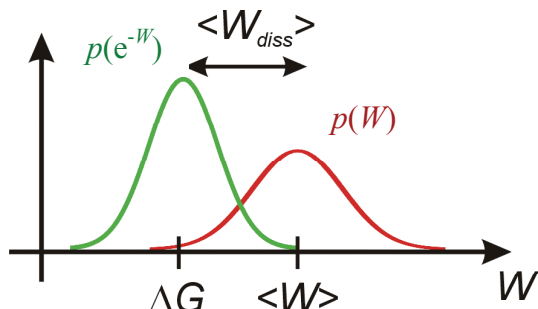


Abb. 2.7

Schematische Darstellung der Arbeitsverteilungen $p(W)$ (rot) und $p(e^{-W})$ (grün). Zur Berechnung von ΔG aus den Arbeitswerten $p(W)$ ist der Bereich am linken Rand der Arbeitsverteilung wichtig, da dieser ein großes Gewicht in $p(e^{-W})$ hat. Das Ausmaß der Überlappung zwischen $p(W)$ und $p(e^{-W})$ wird durch die dissipierte Arbeit W_{diss} bestimmt.

Abb. 2.7 zeigt eine Arbeitsverteilung $p(W)$ in rot und die dazugehörige Verteilung $p(e^{-W})$ in grün. Die Verteilung $p(W)$ wird in diesem Beispiel als Gaußförmig angenommen, kann aber prinzipiell jede beliebige Form einnehmen. Die Verteilung $p(e^{-W})$ ist zu kleineren W verschoben. Gerade der Bereich $W \approx \Delta G$ ist für eine korrekte Evaluierung der Jarzynski-Gleichung notwendig, da dieser mit großem Gewicht in das exponentielle Mittel eingeht. Trajektorien sind in diesem Bereich sehr selten, da sie am Rand

der Arbeitsverteilung $p(W)$ liegen. Das Ausmaß der Überlappung zwischen $p(W)$ und $p(e^{-W})$ hängt vom Betrag der dissipierten Arbeit W_{diss} ab. Für Systeme, die weit ins Nichtgleichgewicht getrieben werden, ist dieser Überlapp sehr klein und daher ist eine sehr große Anzahl an Trajektorien notwendig, um die Arbeitsverteilung an den Rändern ausreichend gut zu beschreiben und damit eine Abschätzung von ΔG zu ermöglichen.

2.4.2. Rekonstruktion des Freien Energieprofils aus SMD-Simulationen

Um die Anwendbarkeit der Jarzynski-Gleichung in SMD-Simulationen zu untersuchen, wurden an einem Testsystem SMD-Simulationen durchgeführt und die Änderung der Freien Energie aus den Nichtgleichgewichtsdaten rekonstruiert. Als Testsystem kam das in Unterkapitel *Steered Molecular Dynamics* eingeführte System, das Dekalanin, zum Einsatz. Dekalanin wurde mit Hilfe von SMD-Simulationen aus einem gefalteten in einen gestreckten Zustand überführt. Die Simulationen erfolgten im Vakuum, wodurch die Gesamtgröße des Systems nur aus 104 Atomen bestand. Drei unterschiedliche SMD-Geschwindigkeiten ($v = 10 \text{ \AA/ns}$, 50 \AA/ns und 100 \AA/ns) kamen zum Einsatz. Als Reaktionskoordinate wurde der Abstand zwischen dem ersten und dem letzten C_α -Atom von Dekalanin gewählt. Im gefalteten Zustand beträgt dieser Abstand 13 \AA , im gestreckten Zustand

33 Å. Für jede Geschwindigkeit wurden 500 Trajektorien erzeugt. Aus den Kraft-Daten wurde die Arbeit berechnet und mit Hilfe der Jarzynski-Gleichung das Potential bzw. die Änderung der Freien Energie rekonstruiert. Zum Vergleich erfolgte die Bestimmung des Potentials mit Hilfe einer SMD-Simulation, bei der sich das System ständig im Gleichgewicht befand. Die Geschwindigkeit dieser Simulation betrug 0.1 Å/ns; sie war also 100-mal langsamer als die langsamste Geschwindigkeit, die in den Simulationen des Systems im Nichtgleichgewicht zum Einsatz kam. Die Simulation wurde aus der gefalteten in die gestreckte Konformation und umgekehrt durchgeführt. Aus der Übereinstimmung der Potentialverläufe beider Richtungen kann gefolgert werden, dass sich das System während der gesamten Simulation im Gleichgewicht befand. Dieses Potential kann deshalb als Referenzpotential verwendet werden. In **Abb. 2.8** sind die Ergebnisse der Rekonstruktion der Potentialverläufe für die drei Geschwindigkeiten gezeigt.

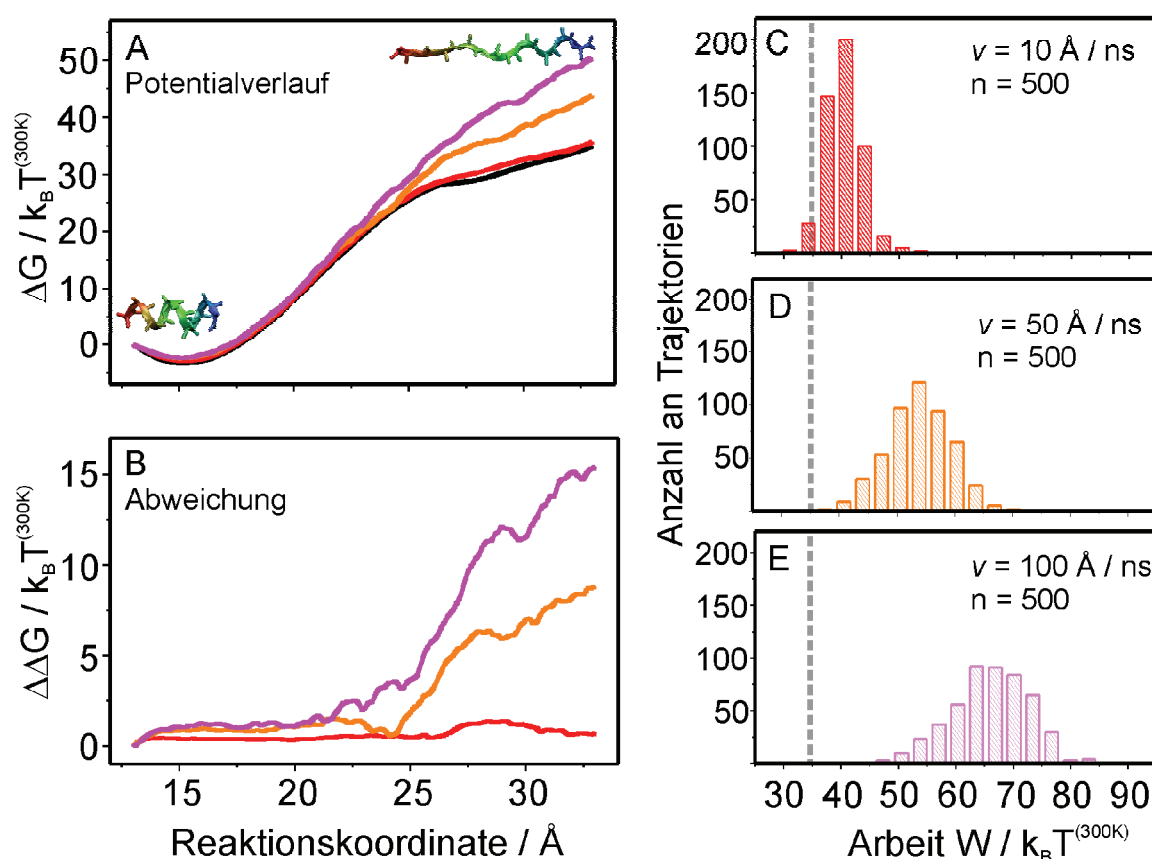


Abb. 2.8

SMD-Simulationen an Deka-Alanin zur Überprüfung der mit der Jarzynski-Gleichung rekonstruierten Potentiale. Deka-Alanin wurde mit Hilfe einer SMD-Simulation aus dem gefalteten (helikalen) Zustand in einen gestreckten Zustand überführt. (A) Potentialverlauf ΔG rekonstruiert mit der Jarzynski-Gleichung für unterschiedliche Geschwindigkeiten aus je 500 Trajektorien. Dabei ist $v = 10 \text{ \AA} / \text{ns}$ in rot, $v = 50 \text{ \AA} / \text{ns}$ in orange und $v = 100 \text{ \AA} / \text{ns}$ in lila gezeigt. In schwarz ist das Referenzpotential eingezeichnet. (B) Abweichung $\Delta\Delta G$ der drei Potentialverläufe vom tatsächlichen Potential. (C) bis (E) Arbeitsverteilungen am Endpunkt (33 Å) der Reaktionskoordinate. Die graue gestrichelte Linie zeigt die Änderung der Freien Energie des Referenzpotentials am Ende der Reaktionskoordinate.

Die rekonstruierten Potentialverläufe sind in **Abb. 2.8A** zu sehen. Der Verlauf des Referenzpotentials ist in schwarz, und die rekonstruierten Potentialverläufe der Simulationen mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten in rot ($v = 10 \text{ \AA/ns}$), orange ($v = 50 \text{ \AA/ns}$) und lila ($v = 100 \text{ \AA/ns}$) dargestellt. In **Abb. 2.8B** ist die Abweichung des jeweiligen Potentialverlaufes vom Referenzpotential eingezeichnet. Aus den Diagrammen folgt, dass mit Hilfe der Jarzynski-Gleichung nur der Potentialverlauf aus den Daten der SMD-Simulationen mit der Geschwindigkeit von $v = 10 \text{ \AA/ns}$ richtig rekonstruiert werden kann. Bei einer Geschwindigkeit von $v = 50 \text{ \AA/ns}$ beträgt die Abweichung am Ende der Reaktionskoordinate $8 k_B T^{(300K)}$, bei $v = 100 \text{ \AA/ns}$ sind es $15 k_B T^{(300K)}$. Der Grund für die Überschätzung des Potentials bei höheren Geschwindigkeiten wird bei Betrachtung der Arbeitsverteilungen, die in **Abb. 2.8C-E** dargestellt sind, deutlich. Die Arbeitsverteilungen sind jeweils für den Endpunkt der Reaktionskoordinate abgebildet. Die Änderung der Freien Energie ΔG beträgt an diesem Punkt $34.5 k_B T^{(300K)}$ und ist in den Histogrammen als graue, gestrichelte Linie eingezeichnet. Nur für die Geschwindigkeit $v = 10 \text{ \AA/ns}$ finden sich Arbeitswerte, die im Bereich von ΔG bzw. darunter liegen. Die Arbeitsverteilungen der anderen Geschwindigkeiten sind aufgrund größerer Dissipation verbreitert und zu höheren Arbeitswerten verschoben. Bei diesen Geschwindigkeiten liegen alle 500 Arbeitswerte deutlich oberhalb von ΔG . Eine exakte Bestimmung der Änderung der Freien Energie ist somit nicht möglich und das Potential wird überschätzt. In diesen beiden Fällen ist es notwendig, die Zahl an simulierten Trajektorien zu erhöhen, um die Arbeitsverteilungen im Bereich um ΔG ausreichend genau beschreiben zu können.

Eine Näherung der exponentiellen Mittelung findet sich, wenn die rechte Seite von Gleichung (2.21) in eine Kumulantenreihe entwickelt wird. Für die Änderung der Freien Energie ΔG ergibt sich folgender Ausdruck

$$\Delta G = -k_B T \ln \left\langle \exp \left[-\frac{W(z, r)}{k_B T} \right] \right\rangle_N = -k_B T \sum_{n=1}^{\infty} \frac{\left(-\frac{1}{k_B T} \right)^n}{n!} C_n(z). \quad (2.22)$$

In Gleichung (2.22) sind $C_n(z)$ die Kumulanten, die die Form der Arbeitsverteilung beschreiben. So hat beispielsweise die erste Kumulante $C_1 = \langle W \rangle$ die Bedeutung des Mittelwerts; die zweite Kumulante steht für die Varianz der Arbeitsverteilung $C_2 = \langle W^2 \rangle - \langle W \rangle^2$. Im speziellen Fall einer Gaußförmigen Arbeitsverteilung ist die Kumulante dritter Ordnung und alle darüber liegenden Kumulanten gleich Null. Lediglich die ersten beiden Terme müssen somit in der Entwicklung berücksichtigt werden. Das bedeutet, dass die Änderung der Freien Energie nicht mehr aus der Beschreibung der Ränder der Verteilung hervorgeht, sondern aus

der Bestimmung des Mittelwertes und der Varianz. Betrachtet man unter diesem Aspekt erneut das Testsystem Deka-Alanin, dann können die simulierten Arbeitsverteilungen mit einer Gaußkurve gefittet (C-E) bzw. der Mittelwert und die Varianz bestimmt werden. Damit lässt sich der Potentialverlauf unter Verwendung der Kumulantenentwicklung bis zur zweiten Ordnung erneut rekonstruieren. Das Ergebnis ist in **Abb. 2.9A,B** dargestellt. Die Potentialverläufe der Simulationen mit drei verschiedenen Geschwindigkeiten sind in **Abb. 2.9A**, die Abweichungen vom Referenzpotential sind in **Abb. 2.9B** zu sehen. Die Farbgebung entspricht der in **Abb. 2.8**.

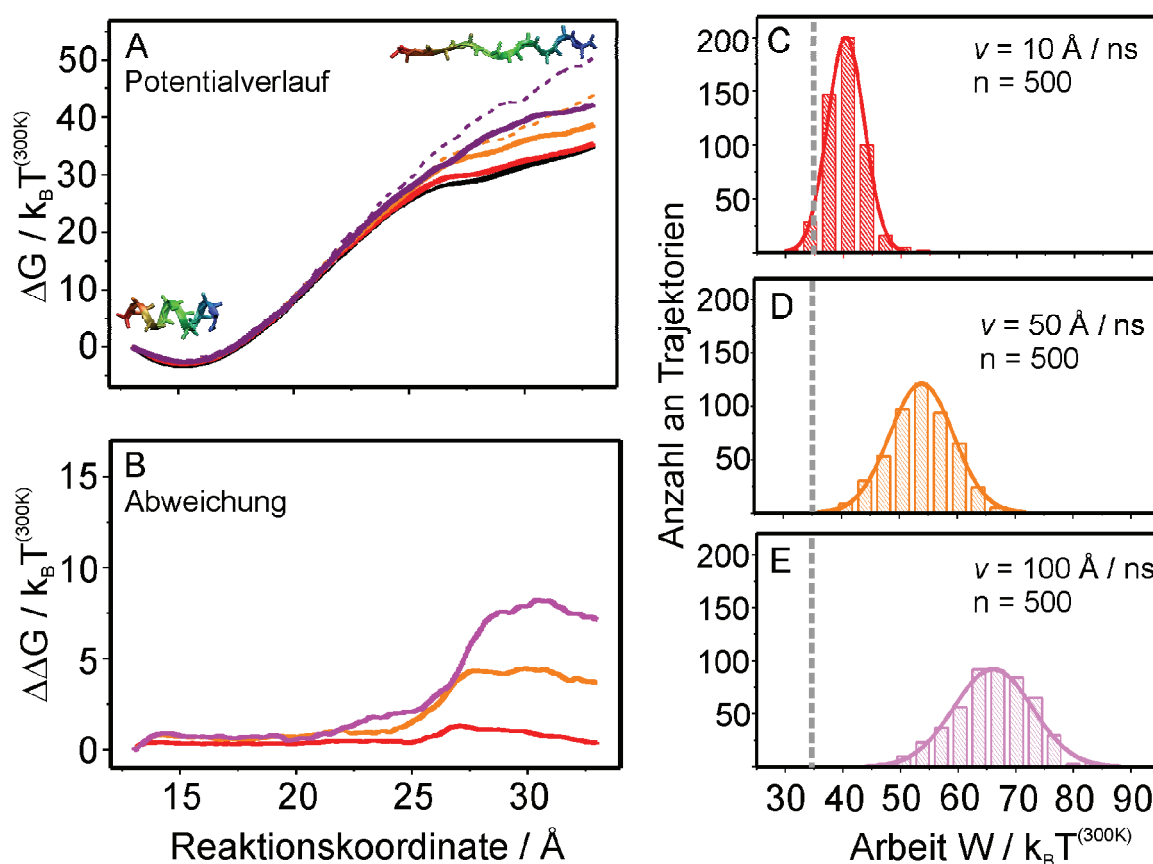


Abb. 2.9

SMD-Simulationen an Deka-Alanin zur Überprüfung der mit der Kumulantenentwicklung bis zur zweiten Ordnung rekonstruierten Potentiale. Deka-Alanin wurde mit Hilfe einer SMD-Simulation aus dem gefalteten (helikalen) Zustand in einen gestreckten Zustand überführt. (A) Potentialverlauf ΔG rekonstruiert mit der Kumulantenentwicklung bis zur zweiten Ordnung für unterschiedliche Geschwindigkeiten aus je 500 Trajektorien. Dabei ist $v = 10 \text{ \AA/ns}$ in rot, $v = 50 \text{ \AA/ns}$ in orange $v = 100 \text{ \AA/ns}$ in lila gezeigt (Der mit der Jarzynski-Gleichung rekonstruierte Verlauf ist gestrichelt dargestellt). In schwarz ist das Referenzpotential eingezeichnet. (B) Abweichung $\Delta\Delta G$ der drei Potentialverläufe vom tatsächlichen Potential. (C) bis (E) Arbeitsverteilungen am Endpunkt (33 Å) der Reaktionskoordinate. Die graue gestrichelte Linie zeigt die Änderung der Freien Energie des Referenzpotentials am Ende der Reaktionskoordinate.

Der Potentialverlauf kann aus den Daten der Simulationen mit der Geschwindigkeit $v = 10 \text{ \AA/ns}$ korrekt rekonstruiert werden. Die Potentialverläufe der höheren Geschwindigkeiten überschätzen das Potential. Die entsprechenden Kurven der Jarzynski-Gleichung sind gestrichelt

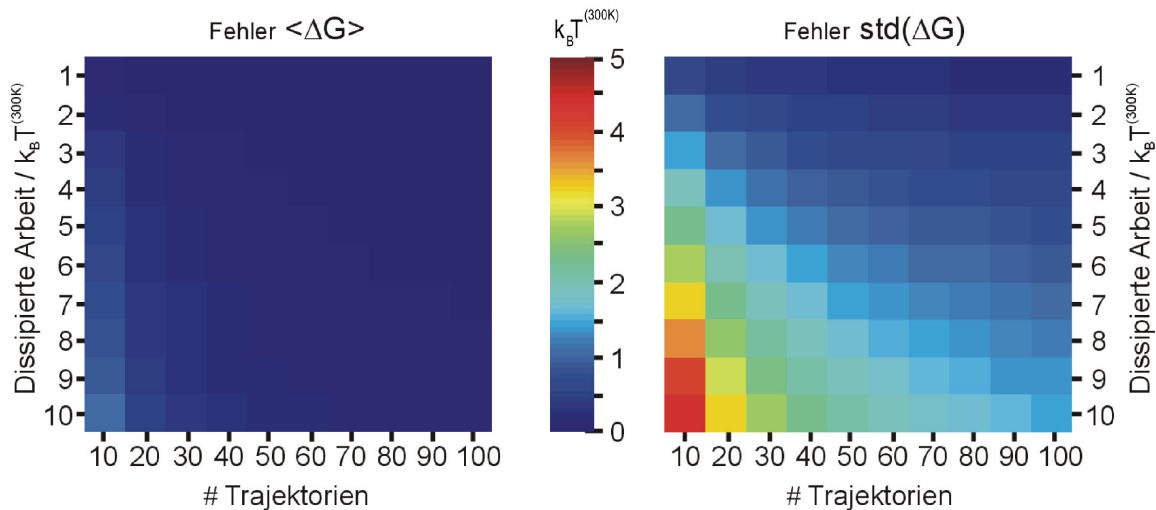
eingezeichnet (Abb. 2.9A,B). Es ist deutlich zu erkennen, dass mit der Kumulantenentwicklung bis zur zweiten Ordnung bessere Ergebnisse erzielt werden, als mit der Jarzynski-Gleichung. Bei $v = 50 \text{ \AA/ns}$ beträgt die Abweichung am Ende der Reaktionskoordinate $3.5 k_B T^{(300K)}$, bei $v = 100 \text{ \AA/ns}$ sind es $7.5 k_B T^{(300K)}$. Die Abweichung stammt nicht von einer ungenügenden Beschreibung der Arbeitsverteilung an den Rändern, sondern von der Ungenauigkeit mit der Mittelwert und Breite bestimmt werden können und der Abweichung von einer Gaußförmigen Arbeitsverteilung. Eine Gaußförmige Arbeitsverteilung kann genau genommen nur dann angenommen werden, wenn sich das System in der Nähe des Gleichgewichts befindet - die Dissipation also im Bereich von einigen $k_B T^{(300K)}$ liegt. Interessanterweise lässt sich eine Gaußförmige Arbeitsverteilung durch die Wahl der Kraftkonstanten des SMD-Potentials beeinflussen. Wählt man die Federkonstante hart genug (*Stiff spring approximation*), so erhält man auch bei stärkerer Dissipation bzw. höheren Geschwindigkeiten eine Gaußförmige Arbeitsverteilung [43, 44]. Im Fall der langsamsten Geschwindigkeit von $v = 10 \text{ \AA/ns}$ liegt die dissipierte Arbeit am Ende der Reaktionskoordinate bei $5.5 k_B T^{(300K)}$, was in einem Bereich liegt, der sich in der Nähe des Gleichgewichts befindet. Beide Methoden können mit den 500 Trajektorien den Verlauf des Potentials bei einer Geschwindigkeit von 10 \AA/ns gleich gut rekonstruieren. Im Fall von $v = 50 \text{ \AA/ns}$ liegt die dissipierte Arbeit bei $19.5 k_B T^{(300K)}$ und beide Methoden überschätzen das Potential. Die Kumulantenmethode liegt mit einer Abweichung von $4 k_B T^{(300K)}$ deutlich unterhalb der Jarzynski-Gleichung, die eine doppelt so große Abweichung vom tatsächlichen Potential hat. Die Arbeitsverteilung kann als Gaußförmig angenommen werden; kein Arbeitswert liegt dabei aber im Bereich um ΔG . Für den Fall von $v = 100 \text{ \AA/ns}$ liegt die dissipierte Arbeit bei $31 k_B T^{(300K)}$, was bereits im Bereich der Potentialmodulation liegt. Das System ist weiter ins Nichtgleichgewicht getrieben worden und beide Methoden überschätzen den tatsächlichen Potentialverlauf deutlich. Mit $7.5 k_B T^{(300K)}$ liegt der Fehler der Kumulantenentwicklung aber immer noch deutlich unter dem Fehler der Jarzynski-Gleichung. Der Fehler Jarzynski-Gleichung liegt bei dieser Geschwindigkeit über $15 k_B T^{(300K)}$. Bei dieser Geschwindigkeit kann nicht mehr von einer Gaußförmigen Arbeitsverteilung ausgegangen werden.

Für Systeme, die nicht zu weit aus dem Gleichgewicht getrieben werden bzw. bei denen man von einer Gaußförmigen Arbeitsverteilung ausgehen kann (im hier angesprochenen Fall $W_{\text{diss}} < 19.5 k_B T^{(300K)}$), ist die Methode der Kumulantenentwicklung zur Rekonstruktion der Änderung der Freien Energie besser geeignet als die Jarzynski-Gleichung. Genau genommen gilt dies im Fall der Simulation von Dekalalanin auch für die schnellste verwendete SMD-Geschwindigkeit von 100 \AA/ns ($W_{\text{diss}} > 19.5 k_B T^{(300K)}$). Da hier aber die ermittelte Arbeits-

verteilung nicht mehr als Gaußförmig angenommen werden kann, ist die Verwendung der Kumulantenentwicklung bis zur zweiten Ordnung, wie sie in diesem Kapitel vorgestellt wurde, nicht mehr korrekt und wird daher nicht berücksichtigt.

Für die Untersuchung von großen Biomolekülen ist aufgrund der verfügbaren Rechenzeit üblicherweise nur die Simulation einer kleinen Anzahl an Trajektorien durchführbar. Im Folgenden werden die Fehler, mit denen die Methode der Kumulantenentwicklung bis zur zweiten Ordnung behaftet ist, in Abhängigkeit von der Anzahl an Trajektorien näher betrachtet.

Für eine beliebige Arbeitsverteilung treten ein systematischer und ein statistischer Fehler auf. Der systematische Fehler entsteht daher, dass die Kumulantenentwicklung nach dem zweiten Term abgebrochen wird und die weiteren Terme der Entwicklung vernachlässigt werden. Der Grund für den statistischen Fehler liegt in der Berechnung des Mittelwerts und der Varianz, für die nur eine geringe Anzahl an Datenpunkten zur Verfügung steht. Im Fall einer Gaußförmigen Arbeitsverteilung sind alle Entwicklungsterme außer den ersten beiden gleich Null und der systematische Fehler verschwindet. Eine Gaußförmige Arbeitsverteilung kann angenommen werden, wenn das System nicht zu weit aus dem Gleichgewicht getrieben wird. Dies kann durch die SMD-Geschwindigkeit gesteuert werden, die einen direkten Einfluss auf die Dissipation hat und möglichst klein gewählt werden sollte. Eine weitere Möglichkeit den Fehler zu minimieren, ist eine Unterteilung des untersuchten Reaktionsweges in mehrere Sektionen. An jeder Sektionssgrenze kann so das System neu equilibriert und wieder ins Gleichgewicht gebracht werden. Der Potentialverlauf der einzelnen Sektionen wird unabhängig voneinander rekonstruiert und im Anschluss zusammengesetzt. Zusätzlich kann durch den Einsatz einer harten Feder im SMD-Constraint (*Stiff spring approximation*) eine Gaußförmige Arbeitsverteilung auch bei größeren SMD-Geschwindigkeiten erreicht werden. Der statistische Fehler wirkt sich bei der Bestimmung der Änderung der Freien Energie in zweierlei Hinsicht aus. Neben einer Streuung der berechneten Potentialwerte, verschieben sich diese auch zu größeren Potentialwerten. Dies liegt daran, dass bei der Berechnung der Varianz aus einer endlichen Anzahl an Werten, diese tendenziell unterschätzt und damit die Änderung der Freien Energie überschätzt wird [45]. **Abb. 2.10** zeigt die Entwicklung der statistischen Fehler in Abhängigkeit von der Anzahl an Trajektorien und der Menge an dissipierter Arbeit.

**Abb. 2.10**

Statistischer Fehler bei der Bestimmung der Änderung der Freien Energie, der bei Verwendung der Kumulantenentwicklung bis zur zweiten Ordnung auftritt. Links ist die Abweichung des Mittelwertes von ΔG gezeigt, rechts die statistische Unsicherheit von ΔG . Der jeweilige Fehler ist in den 2D-Plots farbkodiert.

Zur Bestimmung der Fehler wird eine Gaußförmige Arbeitsverteilung mit dem Mittelwert Null und einer Varianz $\sigma^2 = 2k_B T \langle W_{\text{diss}} \rangle$, entsprechend dem Wert an dissipierter Arbeit, angenommen. Hieraus werden n Arbeitswerte ($n = \text{Anzahl an Trajektorien}$) extrahiert. Diese Arbeitswerte werden zur Berechnung der Änderung der Freien Energie ΔG mit Hilfe der Kumulantenentwicklung bis zur zweiten Ordnung verwendet. Dieser Vorgang wird 10000-mal wiederholt und im Anschluss kann die Verteilung der ermittelten ΔG -Werte untersucht werden. Dissipierte Arbeit in einem Bereich von $1 k_B T^{(300K)}$ bis $10 k_B T^{(300K)}$ wurde betrachtet. Im linken Teil der **Abb. 2.10** ist in einem 2D-Plot die Abweichung des berechneten Mittelwertes $\langle \Delta G \rangle$ der Verteilung gezeigt. Der 2D-Plot im rechten Teil von **Abb. 2.10** zeigt die Standardabweichung $\text{std}(\Delta G)$, d. h. die Breite der Verteilung der ermittelten ΔG -Werte. Wie man aus den 2D-Plots sehen kann, spielt bei einer dissipierten Arbeit bis zu $10 k_B T^{(300K)}$ die Verschiebung des Mittelwertes $\langle \Delta G \rangle$ zu höheren Potentialwerten und damit die tendenzielle Überschätzung der Änderung der Freien Energie keine große Rolle. Bei 10 Trajektorien beläuft sich der Fehler auf ca. $1 k_B T^{(300K)}$. Die statistische Unsicherheit der Änderung der Freien Energie ist die maßgebliche Fehlerquelle. Im ungünstigsten Fall von 10 Trajektorien und einer Dissipation von $10 k_B T^{(300K)}$ liegt dieser Fehler bei $\pm 5 k_B T^{(300K)}$.

3. Strukturelle Stabilität verschiedener Mutanten und Fragmente des Tumornekrosefaktor-Rezeptors 1

3.1. Einleitung

Eine Gemeinsamkeit allen Lebens ist die Tatsache, dass Organismen, egal ob Einzeller oder Vielzeller, sich gegenüber ihrer Umwelt abgrenzen und dabei mit dieser im Stoffaustausch stehen. Diese Abgrenzung erfolgt durch eine Zellmembran oder durch die Haut, die für die meisten hydrophilen Moleküle eine undurchdringliche Barriere darstellen. Höher entwickelte Organismen sind das Ergebnis der Zusammenlagerung und des Miteinanders vieler Zellen, die im Verbund das Leben des Organismus sicherstellen. Eine unumgängliche Voraussetzung hierfür, stellt die Kommunikation zwischen den einzelnen Zellen bzw. zwischen Zellen und ihrer Umgebung dar. Hierfür sind Zellen mit so genannten Rezeptoren ausgestattet, die Signale in der Zellmembran und innerhalb der Zelle erkennen und weiterleiten können (Signaltransduktion). Rezeptoren dieser Art sind Proteine, die nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip Moleküle oder Proteine (so genannte Liganden) über bestimmte Erkennungssequenzen binden. Membranrezeptoren sind Transmembranproteine, die die Zellmembran durchspannen und das Signal in die Zelle hinein weiterleiten. Durch die Bindung eines Liganden auf der extrazellulären Seite der Zelle, wird eine Konformationsänderung des Rezeptors

induziert, wodurch sich entweder der Oligomerisierungsgrad des Rezeptors verändert oder intrazellulär eine Enzymaktivität induziert wird. Es gibt eine Vielzahl verschiedener Zellrezeptoren, die einen oder mehrere Liganden binden können, was unterschiedliche Signalwege für die Zelle zur Folge hat. Hinzu kommt, dass sich verschiedene Signalwege gegenseitig beeinflussen können und der Zelle somit ein weiterer regulatorischer Mechanismus zur Verfügung steht. Das Resultat ist ein komplexes Signal-Netzwerk, mit der eine Zelle auf Reize aus der Umgebung reagieren kann.

Eine für höhere Organismen lebensnotwendige Zellreaktion ist der programmierte Zelltod, die Apoptose. Bei der Apoptose durchlaufen kranke, für den Organismus schädliche Zellen oder solche, die vom Organismus nicht mehr benötigt werden, ein Programm, an dessen Ende der Tod der Zelle steht.

Apoptose tritt während der embryonalen Entwicklung auf und stellt somit eine Voraussetzung für die normale Entwicklung des Organismus dar, und ist für die Kontrolle der Zellzahl unerlässlich. Die Apoptose kann aber auch durch äußere Einflüsse, wie beispielsweise UV-Strahlung oder Chemikalien induziert werden, indem eine Schädigung der DNA auftritt und somit Mutationen hervorgerufen werden. Lassen sich diese Schäden nicht mehr reparieren, ist es für den Organismus von Vorteil, diese Zellen durch Abtöten aus dem Gewebe zu entfernen. Eine Fehlfunktion dieses regulatorischen Mechanismus kann zu schwerwiegenden Krankheiten, wie beispielsweise Krebs führen, bei dem kranke Zellen nicht sterben, sondern sich unkontrolliert vermehren. Die Apoptose wird mittels Botenstoffe, so genannter Cytokine, eingeleitet.

Der Tumornekrosefaktor (TNF) ist ein Cytokin des Immunsystems und unter anderem für die Vermittlung der Apoptose verantwortlich [46].

TNF liegt als Homotrimer vor und kann mit den Zellrezeptoren Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1 (TNFR1) und Tumornekrosefaktor-Rezeptor 2 (TNFR2) wechselwirken [47, 48], die zur TNF-Rezeptor-Superfamilie (TNFR-Superfamilie) gehören. In der TNFR-Super-

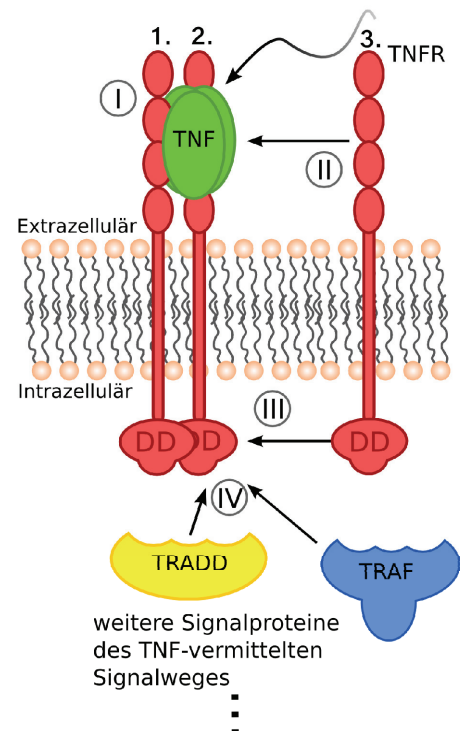


Abb. 3.1
Vereinfachte schematische Darstellung der ersten Schritte des TNF-vermittelten Signalwegs. (I) TNF (grün) bindet mehrere TNFR (rot). Zusammenlagerung von drei Rezeptoren (II) führt zu einer Aktivierung weiterer Bindungsstellen auf der intrazellulären Seite (III). Weitere Signalproteine, wie beispielsweise TRADD oder TRAF (gelb, blau) werden rekrutiert, was zur Initiierung der Signalkaskade führt.

familie werden Rezeptoren mit einem strukturellen Merkmal, dem so genannten *Cys-Repeat motif* (Cystein-Wiederholungs-Motif) zusammengefasst. Dabei handelt es sich um sechs Cysteine, die in einer bestimmten Abfolge Disulfidbrücken bilden und so Loop-Strukturelemente bedingen. Neben TNF-Rezeptoren gehören zu dieser Superfamilie Fas, der NGF-Rezeptor, CD27 und weitere Proteine. TNF ist in der Lage drei TNF-Rezeptoren zu binden. **Abb. 3.1** zeigt schematisch den initialen Schritt der TNF-vermittelten Signalkaskade. Er beinhaltet die Bindung eines TNFs an die extrazelluläre Domäne von TNFR1/2 (I). Durch Bindung von drei TNF-Rezeptoren (TNF-[TNFR]₃) (II) kommt es zur Zusammenlagerung der intrazellulären Domänen der TNFRs (III), was zur Aktivierung weiterer Bindungsstellen für folgende Signalproteine führt und damit zur Initiierung der Signalkaskade (IV).

Im Fall von TNFR1 handelt es sich bei der intrazellulären Bindungsstelle um die so genannte Todesdomäne (DD - *Death Domain*). Diese Domäne kann andere Proteine rekrutieren, die ebenfalls eine Todesdomäne besitzen, was zur Aktivierung weiterer Signalproteine und somit zur Apoptose führt [49].

Darüber hinaus kann TNFR1 über indirekte Rekrutierung von TRAF-Proteinen (TRAF – *TNF Receptor Associated Factor*) auch zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren führen und das Überleben der Zelle sichern.

Einzelne TNF-[TNFR1]₃-Komplexe sind jedoch nicht in der Lage eine ausgeprägte Zellantwort zu initiieren. Um ein Signal effizient in die Zelle weiterleiten zu können, müssen sich mehrere TNF-[TNFR1]₃-Komplexe zusammenlagern [50]. Im verwandten Fas-System wurden ähnliche Beobachtungen gemacht; auch hier müssen sich mehrere Ligand-Rezeptor-Komplexe zusammenlagern, um ein Signal in der Zelle auszulösen [51]. Hierfür ist ein Mechanismus notwendig, der eine Vernetzung mehrerer TNF-[TNFR1]₃-Komplexe zu einem stabilen Aggregat zulässt.

Eine Wechselwirkung zwischen Rezeptoren untereinander könnte eine solche Vernetzung ermöglichen. Basierend auf den vorhandenen Strukturdaten bzw. der Kenntnis über die *Cys-Repeat motifs* lässt sich der extrazelluläre Teil des TNF-Rezeptors 1 in vier Domänen unterteilen. Nicht alle Domänen sind dabei an der Bindung des Liganden beteiligt.

Durch die Entdeckung der so genannten *Pre Ligand binding Assembly Domain* (PLAD) im TNF-Rezeptor 1 und in anderen verwandten Rezeptoren wurde eine Region im Protein identifiziert, die für die Ausbildung stabiler Aggregate verantwortlich ist. Bei PLAD handelt es sich um die N-terminale Domäne des TNFR1, die sich im extrazellulären Bereich befindet und die eine Wechselwirkung zwischen Rezeptoren ermöglicht. Man nimmt an, dass über eine PLAD-PLAD Interaktion die Möglichkeit gegeben ist, Homo-Rezeptoraggregate bereits ohne

Zugabe des Liganden auszubilden, was in verschiedenen Experimenten mit unterschiedlichen Rezeptoren experimentell bestätigt werden konnte [52-55].

Damit stabile Aggregate aus mehreren TNF-[TNFR1]₃ entstehen können, sind zwei Arten von Wechselwirkungen notwendig: zum einen die Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung, mit der die Ausbildung initialer Signalkomplexe TNF-[TNFR1]₃ ermöglicht wird und zum anderen die homophile Rezeptor-Rezeptor-Wechselwirkung, vermittelt über PLAD, mit der die Vernetzung zu signalkompetenten, stabilen Aggregaten erfolgt.

Der genaue Wechselwirkungsmechanismus der PLAD-PLAD-Interaktion sowie die exakte Stöchiometrie signalkompetenter Aggregate sind bislang im Detail noch nicht geklärt. In den letzten Jahren haben zahlreiche Experimente aber bereits zu einem besseren Verständnis zur Rezeptor-Rezeptor-Wechselwirkung und zur Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung im Fall von TNF-TNFR1 beigetragen.

So konnte festgestellt werden, dass durch Zugabe der isolierten, löslichen PLAD, die die N-terminale Domäne des Rezeptors darstellt, Zellen vor einer TNF-induzierten Apoptose geschützt werden können und somit die Ausbildung signalkompetenter Aggregate gestört wird [52-55].

Wird PLAD durch Mutation des Rezeptors genetisch verändert oder ganz entfernt, so ist keine TNF-Bindung am Rezeptor mehr möglich [53, 54]. Dieses Ergebnis ist im ersten Moment erstaunlich, da es anhand der kristallographischen Daten sehr unwahrscheinlich ist, dass PLAD direkt an der Ligandenbindung beteiligt ist. Es wurde spekuliert, dass die monomere Rezeptorform keine ausreichend hohe Bindungsaffinität zu TNF besitzt; eine effiziente Bindung des Liganden also nur via PLAD-multimerisierter Rezeptoren zustande kommen kann. Erste Crosslinking-Experimente hierzu haben ergeben, dass es sich bei diesen Rezeptoren wahrscheinlich um Rezeptor-Komplexe handelt, die über PLAD-PLAD-Interaktion bereits ohne Ligand als Homotrimere vorliegen. Vor-Multimerisierung und das Sortieren der Rezeptoren in Homooligomere könnte die Spezifität und Geschwindigkeit, mit der die Zelle auf den Liganden reagiert, erhöhen; Komplexe mit gemischten Rezeptoren, die eine Signaltransduktion inhibieren, wären somit ausgeschlossen.

Eine experimentelle Studie, die unter anderem die Rolle der PLAD in den ersten Schritten der Signaltransduktion im TNF-TNFR1-System untersucht hat, wurde am Institut für Zellbiologie und Immunologie der Universität Stuttgart von Marcus Branschädel durchgeführt [56]. Ziel dieser Studie war es unter anderem, die extrazellulären Domänen des TNFR1 zu charakterisieren, die für eine effiziente Ligandenbindung und die Ausbildung signalkompetenter TNF-TNFR1-Komplexe notwendig sind. Als Basis dienten TNFR1-Fas-Chimäre [50]. Diese

bestehen aus der extrazellulären Domäne des TNFR1 und dem intrazellulären Teil des Fas-Rezeptors. Ein solches Proteinkonstrukt hat den Vorteil, dass sich eine mögliche Signaltransduktion leichter nachweisen lässt, als beim nativen TNF-Rezeptor 1. Zusätzlich wurden verschiedene Deletionsmutanten und Fragmente des extrazellulären Teils des TNFR1 untersucht, bei denen entweder eine oder mehrere Subdomänen entfernt, sowie die PLAD isoliert wurde.

Mit diesen Proteinen bzw. Proteinfragmenten wurden *in vivo* Bindungsstudien durchgeführt; Über Cytotoxizitätstests konnte die Überlebensfähigkeit der Zellen mit diesen genetisch veränderten Proteinen bzw. Proteinfragmenten untersucht werden. Mit diesen Experimenten konnte festgestellt werden, inwieweit sich die Bindungsaffinität zwischen den untersuchten Deletionsmutanten des TNFR1 zum Liganden TNF unterscheidet und ob diese Proteine noch in der Lage sind einen signalkompetenten Komplex auszubilden, um damit Apoptose einzuleiten. Zusätzlich wurde ein möglicher protektiver Effekt auf Zellen bei Zugabe von löslicher PLAD untersucht, da diese Domäne die Rezeptor-Rezeptor-Interaktion stören könnte.

In den folgenden Abschnitten dieses Kapitels werden MD-Simulationen am TNF-Rezeptor 1 und den davon „abgeleiteten“ Deletionsmutanten bzw. Fragmenten vorgestellt, die ergänzend zu der oben erwähnten experimentellen Arbeit durchgeführt wurden [56]. Ziel der Simulationen war es, ein grundlegendes Verständnis von Änderungen in der Konformation dieser Mutanten im Vergleich zum nativen Protein zu erlangen. Die Ergebnisse dienen darüber hinaus als Hilfestellung zur Interpretation der experimentellen Daten.

Das Hauptaugenmerk der Simulationen lag zum einen auf der strukturellen Stabilität von zwei Rezeptor-Deletionsmutanten und den damit verbundenen Veränderungen im Bindungsbereich des Liganden, zum anderen auf der strukturellen Stabilität von zwei isolierten Fragmenten des TNF-Rezeptors 1. Mit der aus den Simulationen erhaltenen molekularen Information kann eine Aussage bzw. Voraussage über mögliche funktionelle Störungen des Rezeptors in Bezug auf dessen Fähigkeit zur Ligandenbindung gemacht werden. Darüber hinaus geben die Ergebnisse der Simulationen, zusammen mit den experimentellen Daten und weiteren Arbeiten aus der Literatur einen ersten Einblick in die Verwendung bestimmter Fragmente des TNFR1 (in diesem Fall der PLAD) als potentiellen Wirkstoff bei der Entwicklung neuer Medikamente.

3.2. Untersuchte Systeme und Simulationsdetails

Ausgangspunkt aller in diesem Kapitel gemachten Simulationen ist die Kristallstruktur (pdb code 1TNR) der extrazellulären Domäne von TNFR1 im Komplex mit Lymphotoxin α (LT α , auch TNF β genannt). Lymphotoxin α ist ein zu TNF homologer Ligand, der ähnliche Aufgaben im Bereich der Immunantwort besitzt und an dieselben Rezeptoren wie TNF (TNFR1 und TNFR2) bindet. Trotz der geringen Homologie der Primärstruktur von 33% haben beide Liganden eine ähnliche Sekundärstruktur.

Die Kristallstruktur beinhaltet einen LT α -Homotrimer im Komplex mit drei TNFR1-Monomeren. Sie ist die einzige verfügbare Kristallstruktur eines TNF-Rezeptors gebunden an einen Liganden und besitzt eine Auflösung von 2.85 Å.

In allen gemachten Simulationen wurde nur die Rezeptorstruktur verwendet und dabei besonderes Augenmerk auf die Bindungsstelle zwischen TNFR1 und TNF bzw. LT α gelegt. Aufgrund der funktionalen und strukturellen Ähnlichkeit beider Liganden [57], wurde die Kristallstruktur von LT α -TNFR1 als Modellsystem verwendet. Im Folgenden werden die Struktur des Liganden, des Rezeptors, sowie des Liganden-Rezeptor-Komplexes kurz vorgestellt.

3.2.1. TNF / LT α

Der Ligand LT α ist ein Homotrimer mit jeweils 171 Aminosäuren pro Monomer. In der Kristallstruktur sind die ersten 26 Aminosäuren aufgrund ihrer Unordnung nicht aufgelöst. LT α ist ein Protein, das fast ausschließlich β -Faltblätter als Sekundärstrukturelemente aufweist (siehe **Abb. 3.2**).

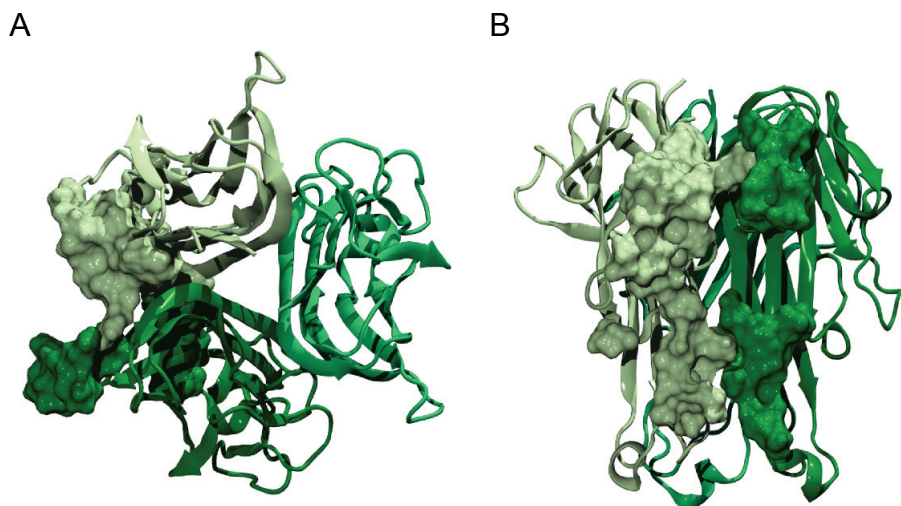


Abb. 3.2

LT α -Homotrimer. Die monomeren Untereinheiten sind in Cartoon-Darstellung gezeigt und verschieden angefärbt. Für die Rezeptorbindung relevante Bereiche sind zusätzlich in Surface-Darstellung gezeigt. (A) Aufsicht. (B) Seitenansicht.

LT α hat eine Höhe von 60 Å und einen Durchmesser von 30 Å an der schmalen und 50 Å an der breiten Seite. Die Gesamtstruktur ist kompakt, mit jeweils einer Mulde an der Grenzfläche zwischen zwei Monomeren (siehe **Abb. 3.2A**). Diese Mulden fungieren als Bindungsstellen für TNFR1 bzw. TNFR2. Ein Vergleich der Strukturen von TNF α und LT α (TNF β) ergibt, dass sich beide Proteine sehr ähnlich sind, identische Sekundärstrukturelemente, nämlich β -Faltblätter aufweisen und sich lediglich an der Oberfläche im Detail unterscheiden.

Nach struktureller Überlagerung von TNF α und LT α konnte eine mittlere Abweichung (*Root Mean Square Deviation* - RMSD) der C α -Atome des Proteinrückgrats von 0.65 Å für 99 strukturell äquivalente Aminosäuren der Protein-Monomere und 0.85 Å für alle 297 strukturell äquivalenten Aminosäuren der Homotrimere ermittelt werden. Beide Liganden lagern sich aufgrund ihrer Strukturen als Trimer in derselben Art und Weise zusammen [57].

3.2.2. TNFR1

Der TNF-Rezeptor 1 ist ein Transmembranprotein, das aus insgesamt 415 Aminosäuren besteht. In **Abb. 3.3A** ist der schematische Aufbau gezeigt. Der extrazelluläre Bereich des Rezeptors TNFR1 hat eine längliche Form und besteht aus 4 *Cys-Repeat motifs*, auch cysteinreiche Domänen (CRD1 bis CRD4 - *Cystein Rich Domains*) genannt. Die erste Domäne (CRD1) ist die PLAD. Jede der Domänen besteht wiederum aus zwei unterschiedlichen Subdomänen, die mit A1 bzw. B2 bezeichnet werden und in rot bzw. blau dargestellt sind. TNFR1 besitzt eine Transmembrandomäne (in orange dargestellt), die die Membran einmal

durchspannt. Im intrazellulären Bereich befindet sich eine Protein-Interaktionsdomäne, die so genannte Todesdomäne (*Death Domain* - DD), welche in gelb dargestellt ist.

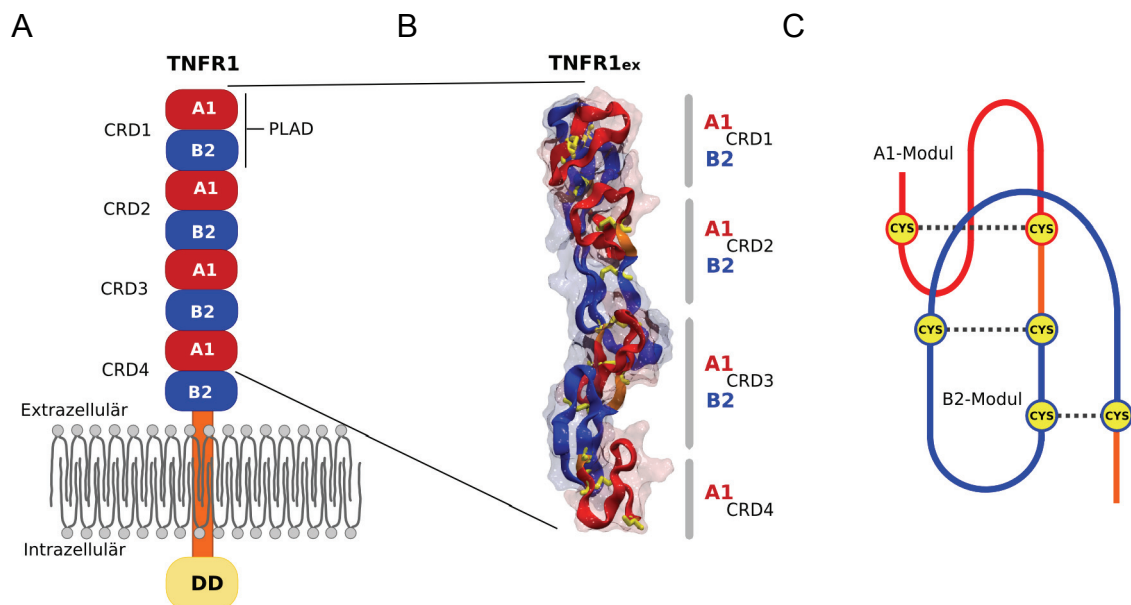


Abb. 3.3

TNF-Rezeptor 1. (A) Schematische Darstellung der vollständigen Proteinstruktur. (B) Kristallographisch aufgelöster extrazellulärer Teil (TNFR1_{ex}) in Cartoon-Darstellung. (C) Schematische Darstellung einer cysteinreichen Domäne (CRD) mit den Modulen A1 und B2 (adaptiert aus [49]).

Kristallographisch aufgelöst ist ein Großteil des extrazellulären Bereiches. **Abb. 3.3B** zeigt diesen Teil des TNFR1 in Cartoon-Darstellung. In rot bzw. blau sind die Subdomänen A1 bzw. B2 eingefärbt. Man erkennt deutlich eine längliche Form, die aufgrund der linearen Anordnung der CRDs entsteht. In gelb sind die Disulfidbrücken zwischen den Cystein-Resten zu sehen, die sich leiterartig durch die gesamte extrazelluläre Domäne ziehen. Eine cysteinreiche Domäne (CRD) besitzt insgesamt 3 Disulfidbrücken und besteht jeweils aus einer A1- und einer B2-Subdomäne. Man erkennt, dass die einzelnen Subdomänen einer CRD ineinander greifen. Eine schematische Darstellung einer einzelnen CRD (**Abb. 3.3C**) verdeutlicht dies. Die A1-Subdomäne (rot) besitzt eine S-Form und enthält eine Disulfidbrücke. Sie wird teilweise von einem Loop der größeren B2-Subdomäne (blau) überlagert, die zwei Disulfidbrücken besitzt.

In der für die Simulation verwendeten Kristallstruktur sind die Aminosäuren 15 bis 153 aufgelöst. Die ersten 14 Aminosäuren sowie der zweite Teil (B2) von CRD4 sind nicht aufgelöst. Der Transmembranbereich und die intrazellulären Domänen sind ebenfalls nicht in der Kristallstruktur enthalten. Zur Kristallisation wurde eine lösliche Form des TNFR1 verwendet, die nur den extrazellulären Teil beinhaltet [58]. Die fehlenden Aminosäuren wurden für die Simulationen nicht rekonstruiert, da in der vorhandenen Struktur alle wichtigen Bereiche für

die in diesem Kapitel gemachten Untersuchungen (im wesentlichen CRD1 bis CRD3) aufgelöst waren. Der für die Simulation verwendete Teil der extrazellulären Domäne hat eine Höhe von ca. 85 Å.

3.2.3. TNFR1-LT α -Komplex

Abb. 3.4A zeigt eine schematische Darstellung von TNFR1 im Komplex mit dem Liganden LT α . Der kristallographisch aufgelöste Bereich der Struktur ist in Seitenansicht sowie in Aufsicht in Abb. 3.4B bzw. Abb. 3.4C dargestellt.

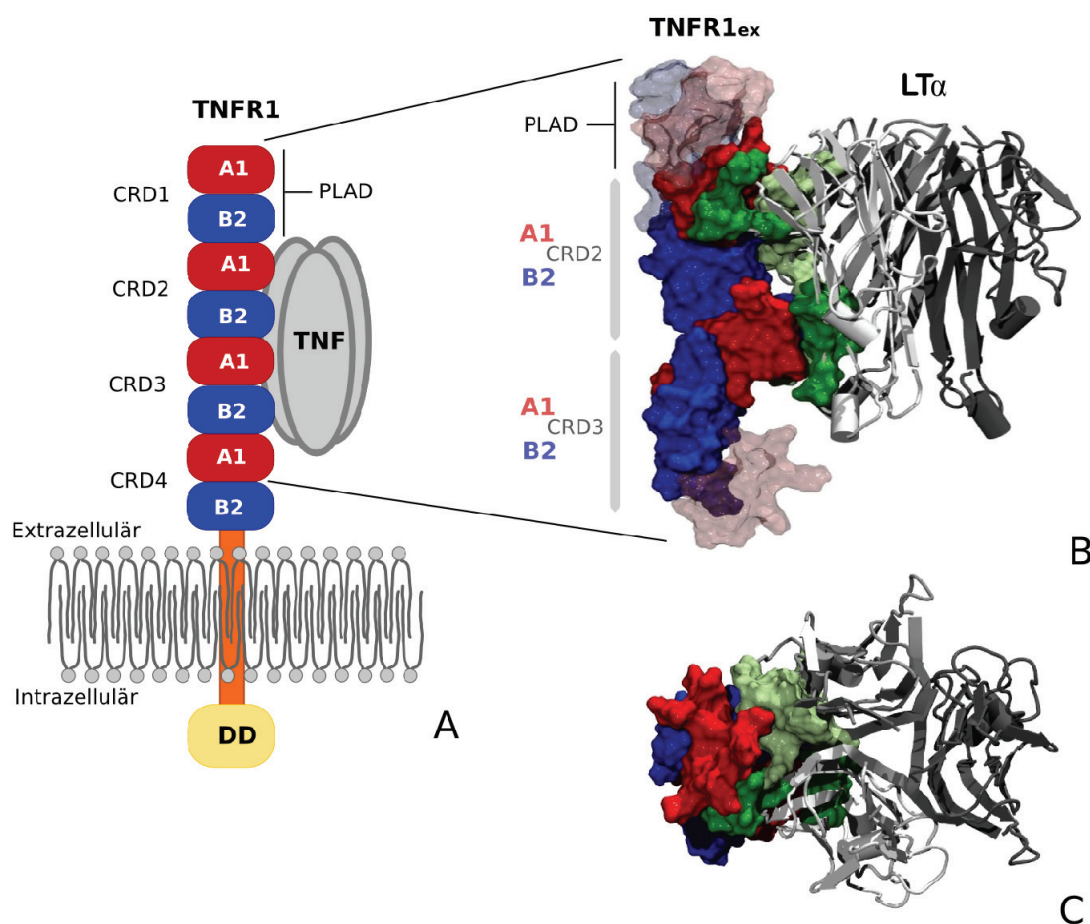


Abb. 3.4

TNFR1-LT α -Komplex. (A) Schematische Darstellung des Rezeptor-Ligand-Komplexes. (B) und (C) Kristallstruktur der extrazellulären Domäne von TNFR1 (=TNFR1_{ex}). TNFR1 ist in Surface-Darstellung, LT α in Cartoon-Darstellung gezeigt. Für die Rezeptorbindung relevante Bereiche von LT α sind zusätzlich in Surface-Darstellung gezeigt und grün eingefärbt. Für die Rezeptorbindung nicht relevante Bereiche von TNFR1 sind transparent dargestellt. (B) Seitenansicht, (C) Aufsicht.

Der Ligand ist in grau gezeigt, die Subdomänen der extrazellulären Domäne des Rezeptors A1 und B2 in rot bzw. blau. Es ist zu erkennen, dass sich die Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung nicht über alle CRDs erstreckt. In Abb. 3.4B,C ist der Rezeptor in Surface-Darstellung,

der Ligand in Cartoon-Darstellung gezeigt. Wichtige Bereiche für die Rezeptor-Ligandenbindung sind ebenfalls in Surface-Darstellung (grün) hervorgehoben. Die Bindung des Rezeptors erfolgt in der Mulde, die durch die Zusammenlagerung von zwei $LT\alpha$ -Monomeren entsteht (siehe **Abb. 3.4C** und **Abb. 3.2A**). In der Seitenansicht (**Abb. 3.4B**) ist deutlich zu sehen, dass sich die Rezeptor-Ligand-Interaktionsfläche nur über die Domänen CRD2 und CRD3 erstreckt [57] und die übrigen CRDs hierbei unbeteiligt sind.

3.2.4. Simulationssysteme und Simulationsdetails

Als Referenzsystem für alle Simulationen wurde der kristallographisch aufgelöste Teil der extrazellulären Domäne des Rezeptors (pdb-code 1TNR) verwendet. Diese Struktur wird im Folgenden mit $TNFR1_{ex}$ bezeichnet. Mit dem PSFGEN-Plugin des Programms VMD [59] wurden Wassertoffatome zur Struktur hinzugefügt und diese energieminimiert. Anschließend wurde das System mit dem SOLVATE-PLUGIN hydratisiert und danach equilibriert. Zusätzlich wurden Deletionsmutanten bzw. Rezeptorfragmente untersucht, bei denen Teile der Rezeptorstruktur, analog der Vorgehensweise von [56] für die TNFR1-Fas-Chimäre, entfernt wurden. Zur Herstellung der Deletionsmutanten und der Rezeptorfragmente wurde die equilibrierte Struktur des $TNFR1_{ex}$ als Ausgangspunkt verwendet.

Es wurden insgesamt zwei Deletionsmutanten und 2 Proteinfragmente von TNFR1 simuliert. Als System (I) wird die erste cysteinreiche Domäne CRD1 bezeichnet ($A1B2_{CRD1}$); System (II) besteht aus der ersten cysteinreichen Domäne $A1B2_{CRD1}$ und dem ersten Teil, der Subdomäne A1, von CRD2; d. h. System (II) kennzeichnet das Fragment $A1B2_{CRD1}A1_{CRD2}$. System (III) und (IV) sind Deletionsmutanten von $TNFR1_{ex}$, bei denen jeweils Teile der ersten Domäne deletiert wurden; Im Fall von System (III) die erste Subdomäne von CRD1 ($\Delta A1_{CRD1}$ - $TNFR1_{ex}$) und im Falle von System (IV) die komplette erste Domäne CRD1 ($\Delta CRD1$ - $TNFR1_{ex}$).

Die unterschiedlichen Systeme und eine schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs der Simulationen sind in **Abb. 3.5** zusammengestellt.

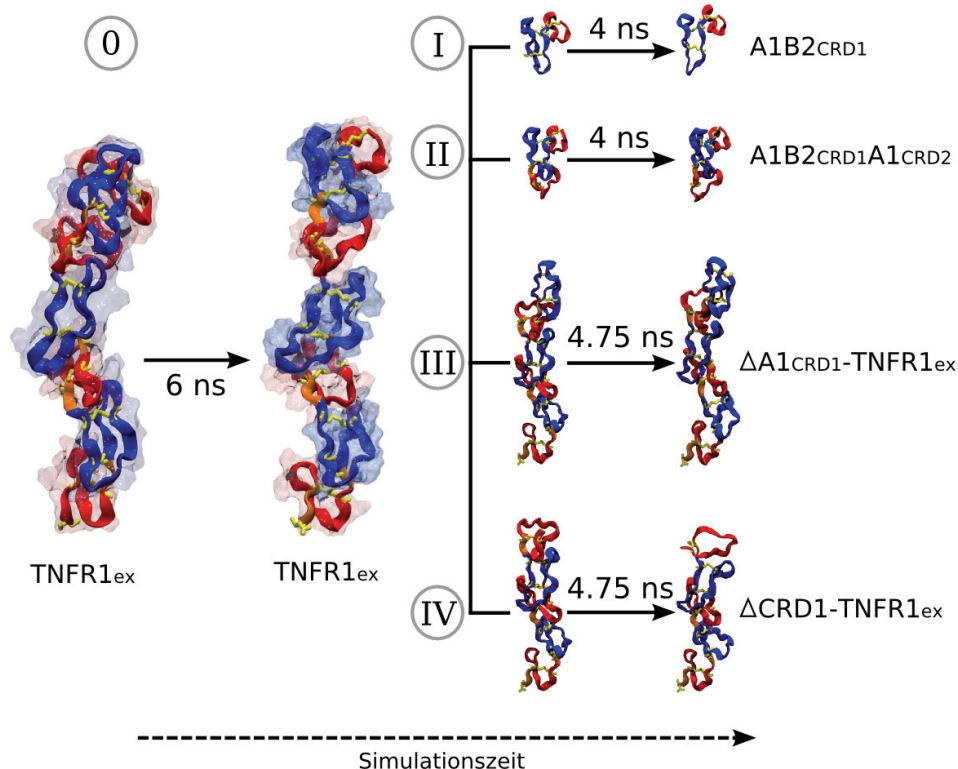


Abb. 3.5

Simulationszeitplan. Nach Equilibrierung des extrazellulären Teils des TNFR1 (TNFR1_{ex}) wurden vier Systeme (zwei Deletionsmutanten + zwei Proteinfragmente) aufgesetzt, gekennzeichnet mit römischen Zahlen (Näheres siehe Text).

Zunächst wurde TNFR1_{ex} für 6 ns equilibriert, um eine Ausgangsstruktur für die weiteren Simulationen zu haben (System 0). Mit Hilfe dieser Struktur wurden dann die entsprechenden Systeme (siehe Abb. 3.5) konstruiert, in dem verschiedene Teile der Rezeptorstruktur entfernt wurden. Eine erneute Solvatisierung und anschließende Minimierung führte zu den Startstrukturen der Simulationssysteme (I) bis (IV).

Alle Simulationen wurden mit dem Programm NAMD [30] und dem CHARMM27 Kraftfeld [29] durchgeführt. Die Strukturen wurden mit dem TIP3P Wassermodell [4] hydratisiert, was zu Systemgrößen von ca. 17000 Atomen für System (I), 20000 Atomen für System (II), 27000 Atomen für System (III) und 30000 Atomen das System (IV) führte.

Folgendes Simulationsprotokoll wurde verwendet: Die C-terminale Aminosäure wurde in den Systemen (0), (III) und (IV) mit einem harmonischen Constraint in z-Richtung (entspricht der Längsachse des Rezeptors) mit einer Kraftkonstanten von 35 pN/Å fixiert, um den Einfluss der Verankerung in die Membran zu berücksichtigen. Die Systeme wurden für eine Dauer von 6 ns (TNFR1_{ex}), 4 ns (Systeme (I) und (II)) und 4.75 ns (Systeme (III) und (IV)) equilibriert. Ein Integrationszeitschritt von 1 fs wurde verwendet. Während der ersten Nanosekunde der Equilibrierung wurde ein harmonischer Constraint auf das Proteinrückgrat von 70 pN/Å auf

0 pN/Å gleichmäßig reduziert, um das Protein langsam an die Umgebung zu koppeln. Die Van der Waals-Wechselwirkungen wurden für jeden Zeitschritt mittels einer *Switching function* (weiche Schaltfunktion) und einem *Cutoff* von 10 Å berechnet. Zur Berechnung der Elektrostatik wurde die *Particle Mesh Ewald*-Methode (PME) [36] in Kombination mit einem Multiple Time Step-Algorithmus verwendet. Der *Cutoff* für die Summe im Realraum betrug 10 Å, der Abstand der Gitterpunkte für die reziproke Summe betrug 1 Å. Es wurden periodische Randbedingungen verwendet. Die Temperatur wurde bei 300 K, der Druck bei 1 bar mit Hilfe der *Langevin-Piston*-Methode [40] stabilisiert, unter Verwendung einer Oszillationsperiode von 200 fs und einer charakteristischen Dämpfungszeit von 100 fs. Zur Visualisierung und Datenanalyse kam das Programm VMD zum Einsatz.

3.3. Ergebnisse und Diskussion

3.3.1. System 0 - Referenzsystem TNFR1_{ex}

Ausgehend von der Kristallstruktur der extrazellulären Domäne von TNFR1 mit anschließender Energieminimierung wurde das System mittels MD-Simulation innerhalb von 6 ns in einen equilibrierten Zustand überführt. Für ein equilibriertes System sind Systemgrößen, wie beispielsweise Druck, Temperatur, Volumen und Gesamtenergie zeitlich konstant d. h. dass diese Parameter zeigen keine Drift. **Abb. 3.6A-D** zeigt Diagramme dieser Systemgrößen über den Verlauf der Simulation.

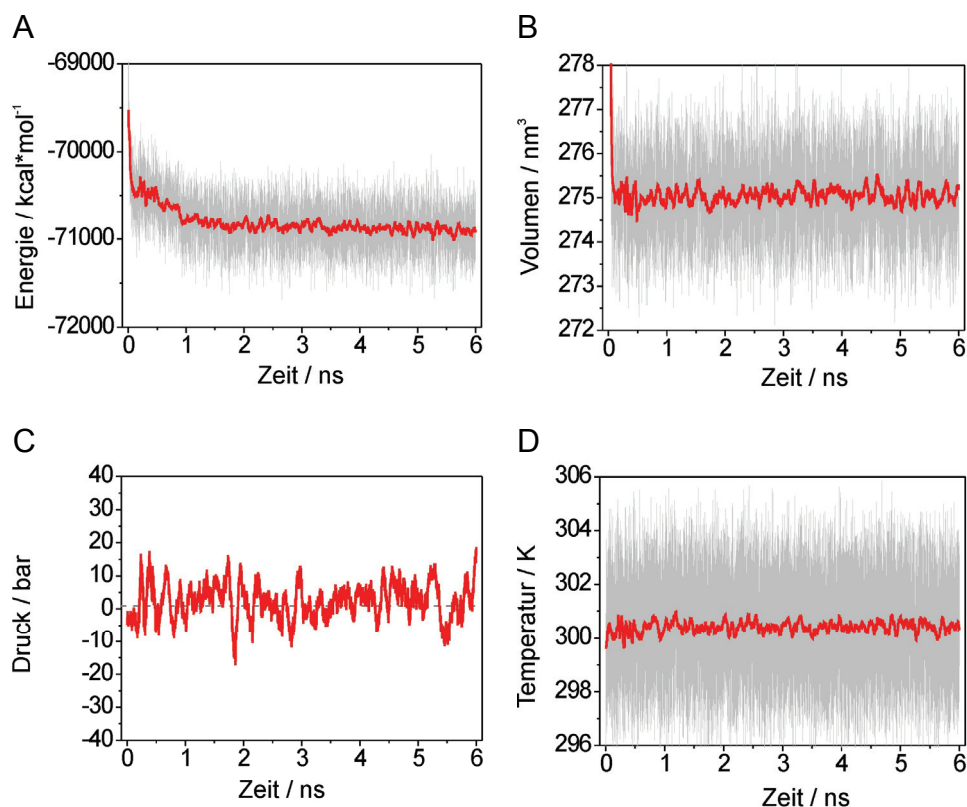


Abb. 3.6

Zeitlicher Verlauf wichtiger Systemgrößen während der Simulation. Die Rohdaten sind in grau, der zeitlich gemittelte Verlauf ist in rot dargestellt. (A) Gesamtenergie. (B) Volumen der Simulationszelle. (C) Druck. (D) Temperatur.

Der tatsächliche Verlauf ist in grau dargestellt, in rot ist eine zeitliche Mittelung über 25 Datenpunkte (50 ps) zu sehen. In **Abb. 3.6C** ist nur der gemittelte Verlauf des Drucks während der Simulation dargestellt. Man kann erkennen, dass in allen Diagrammen von Zeitschritt zu Zeitschritt Schwankungen der Systemparameter im Prozentbereich auftreten, im zeitlichen Mittel aber keine Drift im Verlauf der Simulationen zu erkennen ist, mit Ausnahme des Beginns der Simulation. Eine Sonderstellung nimmt der Systemdruck ein. Der Druck wird über die Kräfte, die auf die Begrenzungsflächen der Simulationszelle wirken, berechnet. Eine Druckregulierung erfolgt dann über eine Veränderung des Simulationsvolumens. Durch die geringe Kompressibilität von Wasser, kommt es hierbei zu sehr großen Druckschwankungen. Lediglich eine Mittelung des Druckverlaufs über lange Zeiten erlaubt eine realistische Aussage [60]. Über den gesamten Verlauf der Simulation gemittelt, erhält man einen Druck, der sehr nahe am Solldruck von 1 bar liegt.

Aufgrund des länglichen Aufbaus von TNFR1_{ex} aus mehreren Domänen (siehe **Abb. 3.3**) ist die zeitliche Entwicklung der Struktur nicht von vornherein ersichtlich. Der RMSD-Wert gibt Aufschluss über strukturelle Veränderungen entlang der Trajektorie (siehe Kapitel 2.1.2.5. *Strukturelle Abweichung*). **Abb. 3.7** zeigt den Verlauf des RMSD-Wertes für verschiedene

Substrukturen. Als Referenzstruktur soll im weiteren Verlauf immer die Kristallstruktur 1TNR dienen. Für jede Momentaufnahme der Trajektorie wurde die jeweilige Substruktur an der Referenzstruktur bestmöglich ausgerichtet und der RMSD-Wert mit Hilfe der Gleichung (2.11) bestimmt. Zur Berechnung wurden nur Atome des Proteinrückgrats der jeweiligen Substruktur verwendet.

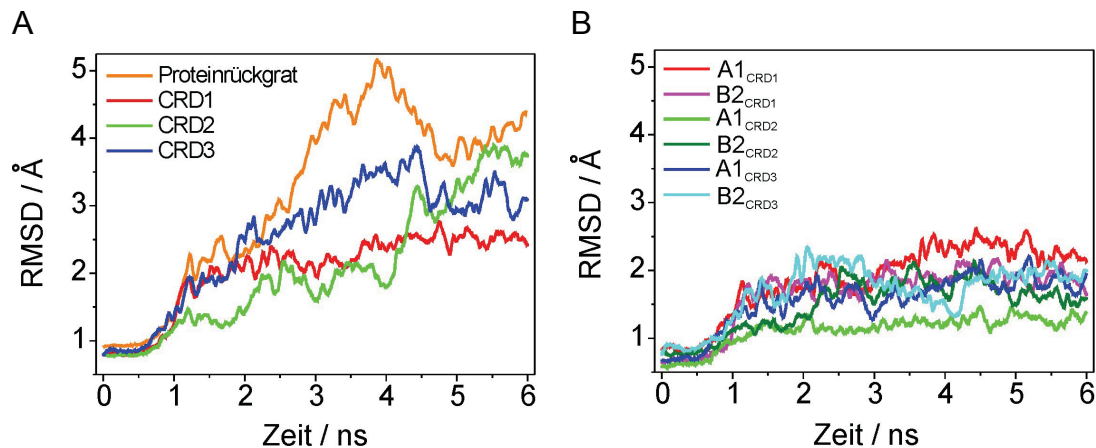


Abb. 3.7

RMSD-Verlauf verschiedener Substrukturen von TNFR1_{ex}. (A) Das Proteinrückgrat ist in orange, die cysteinreichen Domänen CRD1, CRD2 und CRD3 sind in rot, grün und blau dargestellt. (B) Gezeigt sind die Subdomänen der einzelnen CRDs. A1_{CRD1} ist in rot, B2_{CRD1} in magenta, A1_{CRD2} in grün, B2_{CRD2} in oliv, A1_{CRD3} in blau und B2_{CRD3} in cyan dargestellt.

In **Abb. 3.7A** ist das Proteinrückgrat in orange, die einzelnen cysteinreichen Domänen CRD1 bis CRD3 in rot, grün bzw. blau dargestellt. **Abb. 3.7B** zeigt die jeweiligen Subdomänen A1 und B2 der einzelnen CRDs. A1_{CRD1} ist in rot, B2_{CRD1} in magenta, A1_{CRD2} in grün, B2_{CRD2} in oliv, A1_{CRD3} in blau und B2_{CRD3} in cyan dargestellt. Die Betrachtung der strukturellen Abweichung (RMSD) der Equilibrierung zeigt, dass das Proteinrückgrat eine flexible Struktur darstellt, die im Verlauf der Simulation nicht nur signifikante Abweichungen von der Startstruktur (~ 5 Å), sondern auch Schwankungen im Verlauf der gesamten Simulation aufweist. Dieses Verhalten lässt sich durch den Aufbau aus einzelnen Domänen erklären. Der RMSD der CRDs zeigt, mit Ausnahme von CRD1, ebenfalls eine Flexibilität bzw. Schwankungen entlang der Trajektorie. Diese Schwankungen sind geringer als die des Proteinrückgrats. Im gesamten Verlauf kommt es bei CRD2 und CRD3 zu keiner deutlichen Stabilisierung der Domänen. Ein anderes Bild zeigen die Subdomänen, aus denen die einzelnen CRDs aufgebaut sind. Betrachtet man die strukturelle Veränderung von A1 bzw. B2 für die einzelnen Domänen (**Abb. 3.7B**), so sieht man, dass diese Komponenten entlang der Trajektorie keine Drift des RMSD-Wertes zeigen und sich eine Stabilisierung bereits nach ca. 2 ns einstellt.

Die Disulfidbrücken sind in TNFR1 entlang der gesamten Struktur leiterartig angeordnet (siehe **Abb. 3.3C**). Diese Tatsache wurde dazu verwendet, die strukturelle Entwicklung der Gesamtstruktur von TNFR1_{ex} entlang der Trajektorie qualitativ zu untersuchen. Die gesamte Proteinstruktur wurde lediglich durch die Position der Disulfidbrücken approximiert. Hierzu wurde, wie in **Abb. 3.8** gezeigt, für jede Momentaufnahme der Trajektorie der Schwerpunkt der Disulfidbrücken einzeln berechnet und eingezeichnet. Anschließend wurden die Punkte-Serien aller Schwerpunkte in zeitlicher Reihenfolge miteinander verbunden und in unterschiedlicher Farbe dargestellt. Man erhält dadurch die zeitliche Evolution der Bewegung der Schwerpunkte der Disulfidbrücken. Zusätzlich wurden alle Disulfidbrücken zu Beginn der Simulation (siehe **Abb. 3.8A**) sowie zum Ende der Simulation (siehe **Abb. 3.8B**) verbunden (blau), um die Gesamtstruktur besser zu visualisieren. Die zeitliche Entwicklung der so approximierten Proteinstruktur ergibt qualitativ, dass sich die Gesamtstruktur während der Simulationsdauer verändert. Die Struktur richtet sich auf, wirkt im Vergleich zur Startstruktur im oberen Teil mehr gestreckt. Dies bestätigt den Verlauf der RMSD-Daten des Proteinrückgrats und verdeutlicht die Flexibilität der extrazellulären Domäne von TNFR1.

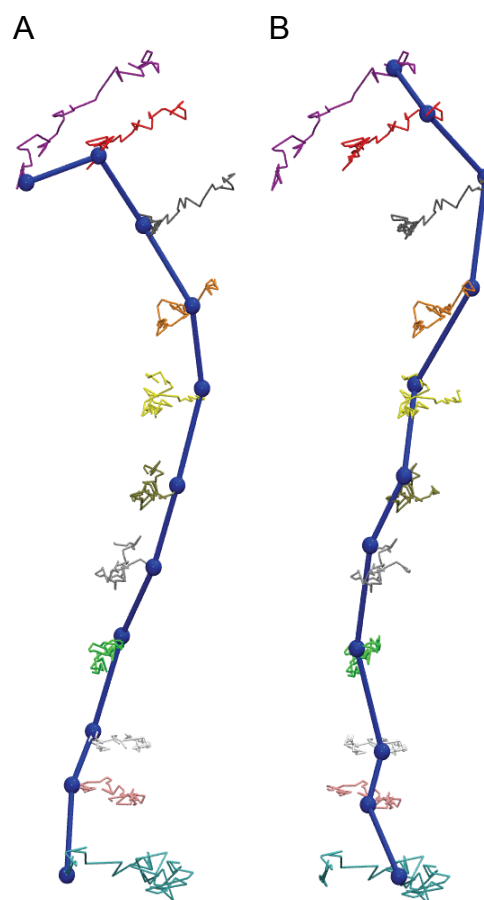


Abb. 3.8
Zeitliche Veränderung der Positionen der Disulfidbrücken. Die Schwerpunkte der einzelnen Disulfidbrücken sind farbig eingezeichnet und die Punkte-Serien sind in zeitlicher Abfolge miteinander verbunden. Zusätzlich sind zu Beginn der Simulation (A) und zum Ende der Simulation (B) die einzelnen Disulfidbrücken (blaue Kugeln) in struktureller Reihenfolge miteinander verbunden (blaue Linien).

Um die strukturellen Eigenschaften des modularen Aufbaus des TNFR1 besser zu verstehen, wurde die Flexibilität der einzelnen Domänen genauer untersucht. Laut Literatur [57] stellen die CRDs die elementaren Einheiten im extrazellulären Teil des TNFR1 dar. Jedoch sieht man im RMSD-Plot der CRDs strukturelle Veränderungen, die nicht auf die Flexibilität der Subdomänen A1 und B2 selbst zurückzuführen sind (**Abb. 3.7**). Die Subdomänen sind im gesamten Verlauf der Simulation strukturell sehr stabil. Es kann sich also nur um eine Relativbewegung zwischen den einzelnen Subdomänen einer CRD handeln. Um diesen Sachverhalt genauer zu untersuchen, wurde die Relativbewegung zwischen zwei aufeinander

folgenden Subdomänen A1 und B2, unabhängig davon, ob es sich um dieselbe CRD handelt, qualitativ analysiert. Zur Vereinfachung wurde dabei die zu untersuchende Struktur jeweils auf die Startstruktur einer der beiden Subdomänen ausgerichtet, so dass diese keine Translation und Rotationsbewegungen durchführen kann. Es wird somit die Bewegung einer beweglichen Subdomäne in Bezug auf eine raumfeste Subdomäne betrachtet.

Das Hauptaugenmerk lag darauf, das Ausmaß der Flexibilität zwischen den Subdomänen abzuschätzen und nicht die Bewegung im Detail zu untersuchen. Dazu wurde der Schwerpunktsabstand R_{ij} , die Rotation β der beweglichen Subdomäne als Ganzes um die raumfeste Subdomäne, sowie die Rotation der beweglichen Subdomäne um ihren Schwerpunkt (α_1 und α_2) betrachtet. **Abb. 3.9** zeigt eine schematische Darstellung der verwendeten Parameter.

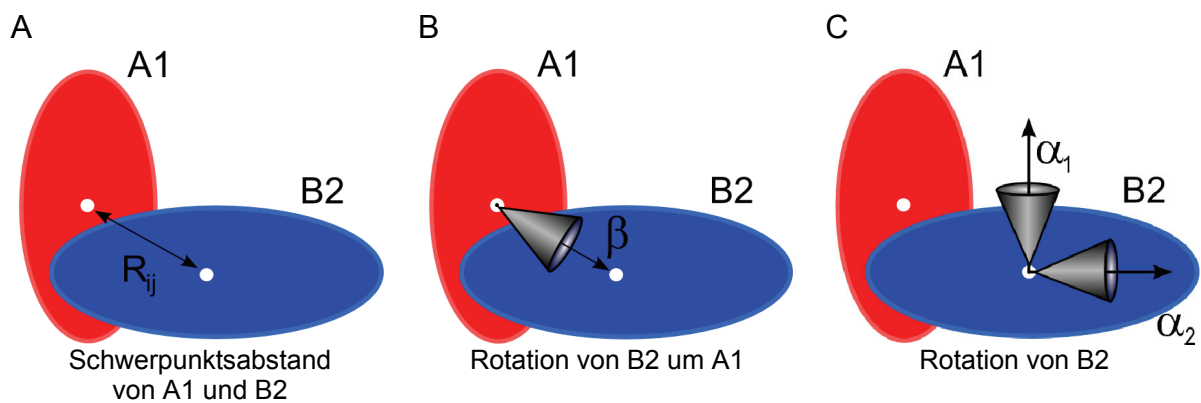


Abb. 3.9

Schematische Darstellung der untersuchten Flexibilität, hervorgerufen durch eine Relativbewegung der Subdomänen gegeneinander. In dieser Darstellung ist die Subdomäne A1 in rot, die Subdomäne B2 in blau dargestellt. Die Subdomäne A1 wird in allen drei Fällen als raumfest angesehen, Subdomäne B2 ist beweglich. (A) Änderung des Abstands R_{ij} der Schwerpunkte. (B) Rotation von B2 um A1. (C) Rotation der Subdomäne B2 um ihren eigenen Schwerpunkt.

Für jede Subdomäne und für jede Momentaufnahme der Simulation wurde eine Bestimmung der Hauptachsen der einzelnen Subdomänen, der Schwerpunktskoordinaten sowie der Verbindungslinie der Schwerpunkte durchgeführt. Für die raumfeste Subdomäne erhält man in Übereinstimmung mit den RMSD-Werten stabile Hauptachsen, die ihre Richtung während der Simulation nur wenig verändern und einen stabilen Schwerpunkt. Die Hauptachsen sind in **Abb. 3.10** beispielhaft für die Subdomäne B2_{CRD2} gezeigt. Das Proteinrückgrat ist in blau, die Disulfidbrücken in gelb dargestellt. Teile der angrenzenden A1-Subdomänen sind in rot gezeigt. Zwei Hauptachsen sind als grüne Pfeile zu sehen. Eine liegt entlang der langen Achse der Subdomäne, die andere senkrecht dazu. Durch Kenntnis des zeitlichen Verlaufs der in **Abb. 3.9** gezeigten Größen ist eine Abschätzung der Flexibilität der Subdomänen möglich.

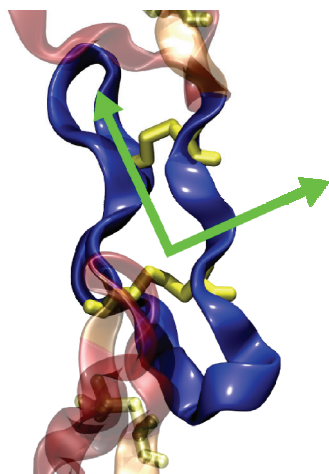
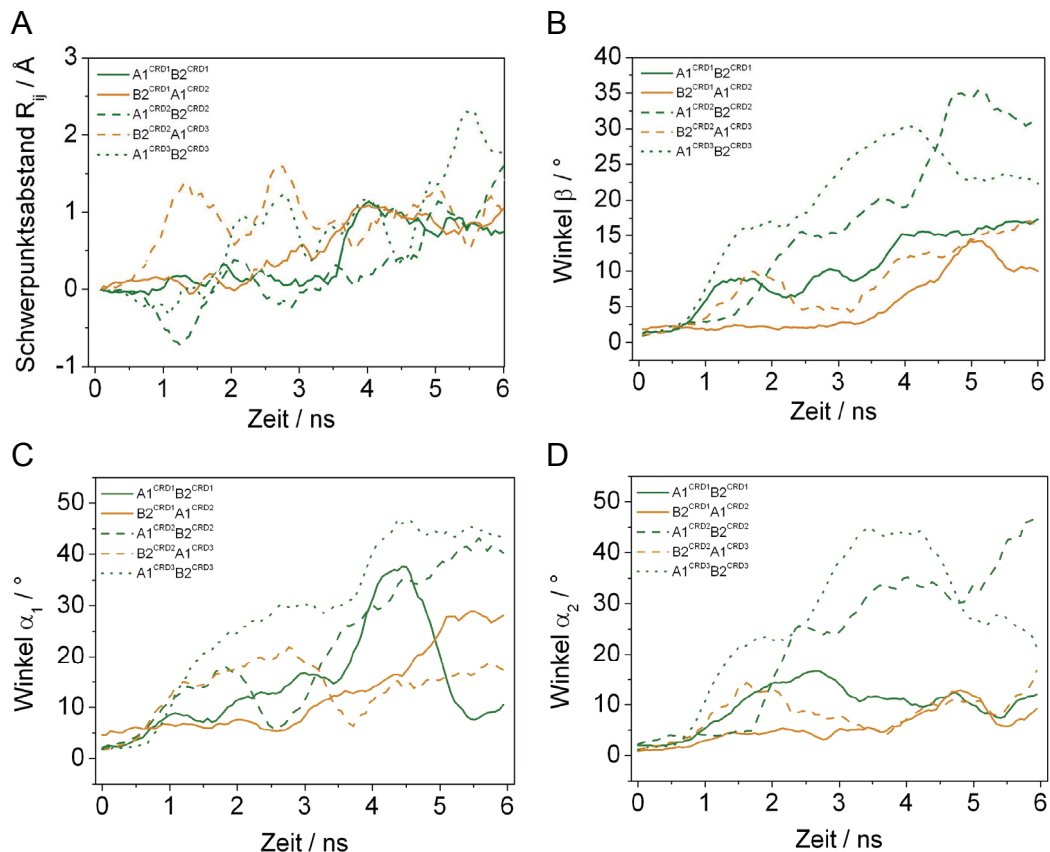


Abb. 3.10
 Subdomäne $B2_{CRD2}$ in Cartoon-Darstellung. Das Proteinrückgrat ist in blau gezeichnet, Disulfidbrücken sind in gelb dargestellt. Die angrenzenden A1-Subdomänen sind in rot (transparent) dargestellt. Zwei Hauptachsen der Subdomäne $B2_{CRD2}$ sind als grüne Pfeile zu sehen.

Hauptachsen der Startstruktur und der aktuellen Struktur (**Abb. 3.11C, D**). In orange sind Intra-Domänen-Paare, in grün Inter-Domänen-Paare dargestellt. Die Kurvenverläufe sind über 5 Datenpunkte (25 ps) gemittelt. Die Mittelung dient dazu, den generellen Verlauf hervorzuheben und eventuell auftretende schnelle Schwankungen der Orientierung der einzelnen Hauptachsen zu unterdrücken.

In **Abb. 3.11A** sieht man, dass es keine größeren Änderungen des Schwerpunktabstandes der einzelnen Subdomänen-Paare gibt. Die maximale Änderung liegt bei ca. 2 Å. Bei Betrachtung der Rotation der flexiblen Subdomäne um die raumfeste Subdomäne (**Abb. 3.11B**) sowie der Rotation der flexiblen Subdomäne um ihren Schwerpunkt (**Abb. 3.11C, D**) treten Schwankungen bis ca. 45° auf.

In **Abb. 3.11** ist ein Überblick über die Relativbewegung der einzelnen Subdomänen zueinander gezeigt. Es wurden jeweils zwei benachbarte Subdomänen betrachtet, sowohl intra-CRD ($A1_{CRDn}-B2_{CRDn}$), als auch inter-CRD ($B2_{CRDn}-A1_{CRDn+1}$). Aufgetragen sind die Änderung des Schwerpunktabstandes (**Abb. 3.11A**), die Rotation der beweglichen Subdomäne in Bezug auf die raumfeste, angegeben als eingeschlossener Winkel zwischen der Verbindungslinie beider Schwerpunkte der Startstruktur und der aktuellen Struktur (**Abb. 3.11B**) und die Änderung der Lage der Hauptachsen der beweglichen Subdomäne, angegeben als eingeschlossene Winkel zwischen den

**Abb. 3.11**

(A) Änderung des Schwerpunktsabstandes. (B) Rotation der beweglichen Subdomäne bezüglich der raumfesten Subdomäne. (C) und (D) Änderung der Lage der Hauptachsen der beweglichen Subdomäne in Bezug auf die Startstruktur. Gezeigt sind jeweils paarweise zwei Subdomänen der ersten drei CRDs (näheres siehe Text).

Das Ausmaß der Schwankungen für die untersuchten Größen ist dabei für die einzelnen Subdomänen-Paare verschieden. Es ist jedoch zu bemerken, dass sich ein Trend in den verschiedenen Rotationsbewegungen erkennen lässt. Die Inter-Domänen-Paare (in orange eingezeichnet) zeigen in allen Fällen eine geringere Relativbewegung als die Intra-Domänen-Paare (Abb. 3.11B-D).

3.3.1.1. Diskussion

Die MD-Simulation der solvatisierten extrazellulären Domäne (kristallographisch aufgelöster Teil) TNFR1_{ex} liefert ein stabiles System, bei dem sich nach ca. 2 ns ein Gleichgewichtszustand einstellt. Eine Analyse der strukturellen Stabilität der Proteinstruktur, bezogen auf die Referenzstruktur (Kristallstruktur) hat gezeigt, dass das Proteinrückgrat eine gewisse Flexibilität hat, was sich durch eine Änderung des RMSD-Wertes während der gesamten Simulationszeit bemerkbar macht (Abb. 3.7). Qualitativ lässt sich dies an der zeitlichen Entwicklung der Positionen der Disulfidbrücken, die zur Approximation der Gesamtstruktur herangezogen wurden, erkennen; im Verlauf der Simulation verändert sich die Position der

Disulfidbrücken wodurch das Protein eine Streckung entlang des Proteinrückgrats erfährt. Während der Simulationszeit von 6 ns war jedoch keine ausgeprägte Scharnierbewegung innerhalb der Struktur zu erkennen. Diese Flexibilität ist nicht verwunderlich, da der extrazelluläre Teil des TNFR1 eine längliche Form hat, mit einer Höhe von ca. 85 Å und einem Durchmesser von < 20 Å. Dazu kommt, dass sich dieser Teil des Rezeptors modular aus mehreren hintereinander geschalteten Struktureinheiten, den CRDs zusammensetzt. Jede dieser Domänen besteht wiederum aus zwei Subdomänen A1 und B2, die eine bzw. zwei Disulfidbrücken besitzen [57, 61]. Die RMSD-Plots der einzelnen CRDs, sowie deren Subdomänen zeigen, dass die CRDs ebenfalls flexibel sind und sich der RMSD-Wert und damit die strukturelle Abweichung im Verlauf der Simulation ändern. Der RMSD-Wert stabilisiert sich nur im Fall von CRD1. Die kleinsten strukturell stabilen Einheiten stellen die Subdomänen A1 und B2 dar. Hier stabilisiert sich der RMSD-Wert für alle Subdomänen bereits nach 2 ns bei ≤ 2 Å. Eine Überlagerung der gemittelten Endstruktur mit der Referenzstruktur verdeutlicht das, was in **Abb. 3.12** am Beispiel zweier Subdomänen gezeigt ist.

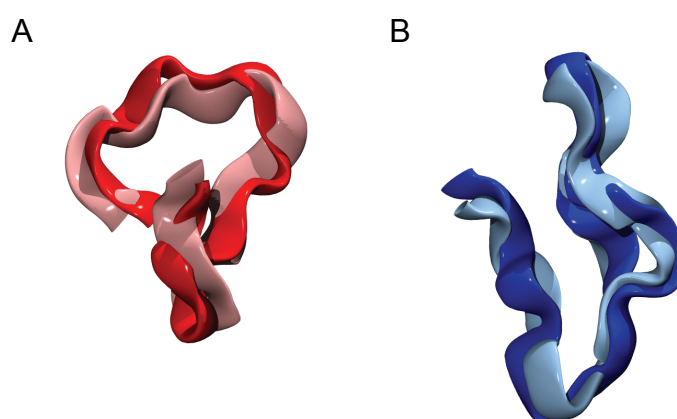


Abb. 3.12
Überlagerung der Strukturen zweier Subdomänen A1 (A) und B2 (B). Gezeigt sind die Kristallstruktur in rot bzw. blau und gemittelte Endstruktur der Simulation in rosa bzw. hellblau. Die Strukturen wurden überlagert, um eine bestmögliche strukturelle Übereinstimmung zu erhalten.

In **Abb. 3.12** ist die Referenzstruktur sowie die gemittelte Endstruktur der Simulation für eine A1-Subdomäne (**Abb. 3.12A**) und eine B2-Subdomäne (**Abb. 3.12B**) bestmöglich überlagert. Die Referenzstruktur ist in rot bzw. blau, die Endstruktur in rosa bzw. hellblau dargestellt. Man kann deutlich erkennen, dass die Loopstruktur des Proteinrückgrats auch nach 6 ns Simulationszeit in beiden Fällen gut erhalten ist. Die strukturelle Veränderung der CRDs kommt somit durch eine Relativbewegung der einzelnen Subdomänen zustande. Wenn es sich um einen hierarchischen Aufbau der extrazellulären Domäne handelt ($\text{TNFR1}_{\text{ex}} \rightarrow \text{CRDs} \rightarrow \text{A1}$

bzw. B2), dann würde man erwarten, dass die Relativbewegung der Subdomänen innerhalb einer CRD schwächer ausfällt als die Relativbewegung zwischen den Subdomänen benachbarter CRDs. Dies ist aber nicht der Fall. Die Intra-Domänenbewegung ist ausgeprägter als die Inter-Domänenbewegung. Die CRDs können daher von einem strukturellen Standpunkt aus betrachtet nicht als elementare Struktureinheit angesehen werden. TNFR1_{ex} ist eine längliche, flexible Proteinstruktur, bestehend aus einer alternierenden Abfolge zweier unterschiedlicher, strukturell stabiler Subdomänen A1 und B2.

Eine funktionale Bedeutung der erhöhten Flexibilität innerhalb einer CRD und damit auch der gesamten Proteinstruktur ist dennoch nicht auszuschließen. Es könnte sein, dass dies beispielsweise bei der Ligandenbindung eine Rolle spielt, da sich die Rezeptorstruktur dann besser an den Liganden TNF anpassen und kleinere „Fehler“ in der gegenseitigen Orientierung ausgleichen könnte.

Ein Vergleich der Proteinstruktur des Membranrezeptors TNFR1 mit einer Kristallstruktur des löslichen TNFR1 ohne Ligand [62] hat gezeigt, dass sich beide Strukturen ähneln [56]. Dies könnte zumindest darauf hindeuten, dass zur Ligandenbindung keine ausgeprägte Konformationsänderung notwendig ist.

Aber auch eine größere strukturelle Veränderung (beispielsweise eine Konformationsänderung in eine mögliche inaktive Form) ist anhand der MD-Simulationen und der verfügbaren Strukturdaten nicht gänzlich auszuschließen. Aufgrund der Zeitskalen ist eine Aussage diesbezüglich, anhand der durchgeführten MD-Simulationen nicht möglich, da größere Konformationsänderungen von Proteinen wesentlich langsamer ablaufen.

3.3.2. System I und II - A1B2_{CRD1}- und A1B2_{CRD1}A1_{CRD2}-Fragmente

Um eine mögliche protektive Wirkung von PLAD gegenüber Apoptose zu untersuchen, wurden MD-Simulationen an Protein-Fragmenten des TNFR1, die die PLAD enthalten, durchgeführt. Die Simulationssysteme wurden entsprechend der experimentellen Untersuchung von Marcus Branschädel gewählt [56]. Isolierte PLAD wurde mit Hilfe von Cross-linking-Experimenten auf die Fähigkeit zur Selbstassoziation überprüft, d. h. inwieweit eine PLAD-PLAD-Interaktion möglich ist.

In den MD-Simulationen wurde neben PLAD, d. h. A1B2_{CRD1}, auch ein Protein-Fragment der extrazellulären Domäne von TNFR1 simuliert, das zusätzlich die Subdomäne A1_{CRD2} beinhaltet (A1B2_{CRD1}A1_{CRD2}). Als Ausgangspunkt für die Simulationen der Systeme I und II (A1B2_{CRD1} und A1B2_{CRD1}A1_{CRD2}) wurde die equilibrierte Struktur von System 0 (TNFR1_{ex})

verwendet. Die damit erhaltenen Protein-Fragmente wurden für jeweils weitere 4 ns simuliert, um einen ersten Eindruck möglich auftretender struktureller Unterschiede in der zeitlichen Entwicklung der Proteinstruktur zu erhalten. In der Simulation von System 0 konnten solche Unterschiede bereits in den ersten Nanosekunden beobachtet werden. Hauptaugenmerk in beiden Systemen war die strukturelle Stabilität von CRD1 (PLAD) beziehungsweise ihrer Subdomänen. Da beide Systeme neu solvatisiert werden mussten, wurde zu Beginn der Simulation das Proteinrückgrat mit einem harmonischen Constraint stabilisiert. Der Constraint wurde dann innerhalb der ersten 300 ps auf Null reduziert.

System I

Abb. 3.13 zeigt die strukturellen Veränderungen der Subdomänen $A1_{CRD1}$ und $B2_{CRD1}$ im Verlauf der Simulation für das System I. In Abb. 3.13A ist der RMSD-Verlauf gezeigt, Abb. 3.13B,C zeigen jeweils die Überlagerung des Proteinrückgrats der Referenzstruktur (rot bzw. blau) mit der gemittelten Endstruktur der Simulation (rosa bzw. hellblau) in Cartoon-Darstellung.

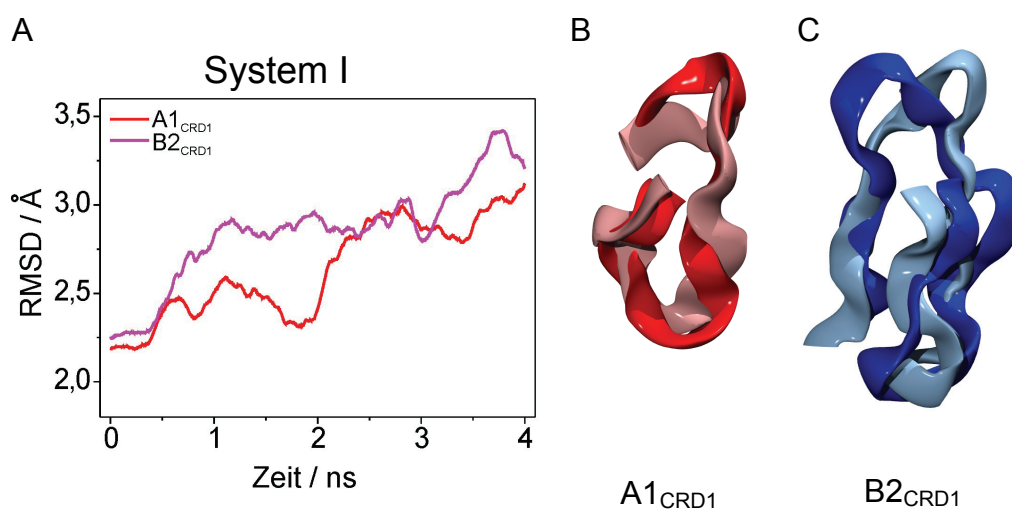


Abb. 3.13

System I: (A) RMSD-Verlauf verschiedener Substrukturen von $A1B2_{CRD1}$. Die Subdomänen $A1_{CRD1}$ und $B2_{CRD1}$ sind in rot und magenta dargestellt. (B),(C) Überlagerung der Strukturen beider Subdomänen $A1_{CRD1}$ (B) und $B2_{CRD1}$ (C) mit der entsprechenden Subdomäne der Referenzstruktur. Gezeigt sind die Referenzstruktur in rot bzw. blau und die gemittelten Endstrukturen der Simulation in rosa bzw. hellblau. Die Strukturen wurden bestmöglich überlagert.

Eine strukturelle Stabilität der Subdomänen A1 und B2 von CRD1 ist in diesem System nicht mehr gegeben, was an einer Erhöhung des RMSD-Wertes zu sehen ist. Die Struktur beider Domänen verändert sich im Verlauf der Simulation. In der Überlagerung ist dies durch eine Veränderung der Loop-Struktur beider Subdomänen zu erkennen (Abb. 3.13B,C).

System II

Die Ergebnisse der Simulation von System II sind in **Abb. 3.14** dargestellt. Hier sind analog zu **Abb. 3.13** der RMSD-Verlauf (A) sowie die Überlagerung von Referenz- und gemittelter Endstruktur für die beiden Subdomänen von CRD1 gezeigt. Für die Überlagerung wurde der Klarheit wegen ein anderer Betrachtungswinkel als in **Abb. 3.13B** gewählt. Die Subdomäne A1_{CRD2} ist nicht gezeigt, da man die Auswirkung der benachbarten Subdomäne A1_{CRD2} auf strukturelle Veränderungen der Subdomänen A1 und B2 von CRD1 untersuchen möchte; die strukturelle Veränderung von A1_{CRD2} selber in diesem Zusammenhang aber nicht interessiert.

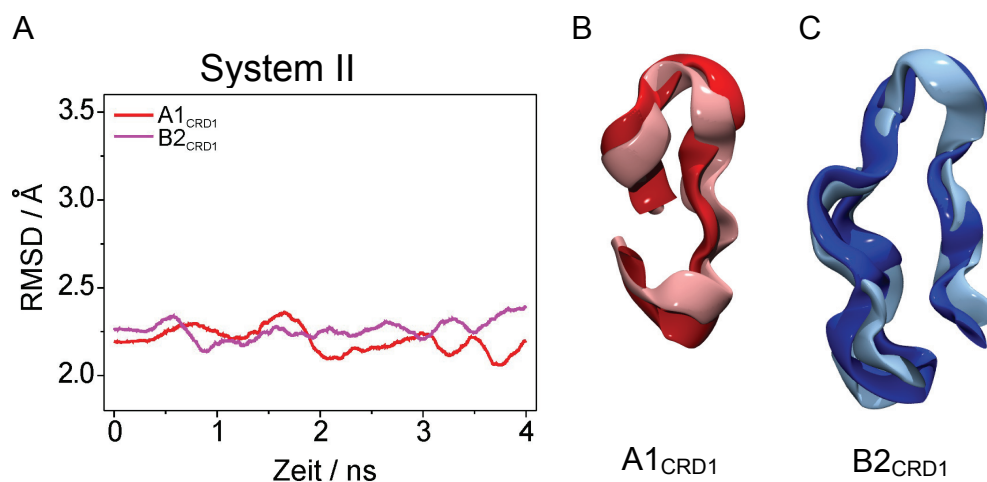


Abb. 3.14

System II: (A) RMSD-Verlauf verschiedener Substrukturen von A1B2_{CRD1}A1_{CRD2}. (A) Die Subdomänen A1_{CRD1} und B2_{CRD1} sind in rot und magenta dargestellt, die Subdomäne A1_{CRD2} ist nicht gezeigt. (B),(C) Überlagerung der Strukturen beider Subdomänen A1_{CRD1} (B) und B2_{CRD1} (C) mit der entsprechenden Subdomäne der Referenzstruktur. Gezeigt sind die Referenzstruktur in rot bzw. blau und die gemittelten Endstrukturen der Simulation in rosa bzw. hellblau. Die Strukturen wurden bestmöglich überlagert. Es wurde ein anderer Betrachtungswinkel verwendet wie in Abb. 3.13B,C.

Es ist deutlich zu sehen, dass der RMSD-Wert für beide Subdomänen im gesamten Verlauf der Simulation nahezu konstant bleibt und es keine Veränderung der Ausgangsstruktur der Subdomänen von der Referenzstruktur gibt. Diese Stabilität ist qualitativ in der Überlagerung von Referenzstruktur und gemittelter Endstruktur für die Subdomänen zu sehen. In beiden Fällen ist die gesamte Loopstruktur des Proteinrückgrats noch gut erhalten (**Abb. 3.14A,B**).

3.3.2.1. Diskussion

Im Folgenden werden die vorgestellten Ergebnisse der MD-Simulationen an den TNFR1-Fragmenten (System 1, (A1B2_{CRD1}) und System II, (A1B2_{CRD1}A1_{CRD2})) in Kombination mit den experimentellen Ergebnissen aus [56] und weiteren Arbeiten aus der Literatur diskutiert. Es konnte gezeigt werden, dass CRD1 (PLAD) allein strukturell nicht stabil ist und im

Verlauf der Simulation die Struktur der Subdomänen A1 und B2 von der Referenzstruktur abweichen (Abb. 3.13). Dies kann dadurch erklärt werden, dass die Subdomäne B2_{CRD1} in System I keine stabilisierende Wechselwirkung mehr durch die angrenzende Subdomäne A1_{CRD2} erfährt. Dies führt zu einer Erhöhung der Flexibilität bzw. zu einer Destabilisierung und damit zur einer strukturellen Veränderung, die sich auch auf die Subdomäne A1_{CRD1} auswirkt. Es ist vorstellbar, dass sich dieser Vorgang negativ auf eine mögliche protektive Funktion von PLAD auswirken kann. Die Ergebnisse der MD-Simulationen geben jedoch keine Auskunft über die Fähigkeit der untersuchten Fragmente zur PLAD-PLAD-Interaktion und erlauben in diesem Zusammenhang lediglich eine Hypothese.

Unterstützt wird diese Hypothese durch Experimente, die am Institut für Zellbiologie und Immunologie der Universität Stuttgart von Marcus Branschädel am verwandten Rezeptor TNFR2 durchgeführt wurden. Um den möglichen protektiven Einfluss von CRD1 (PLAD) auf die TNFR2-Aktivierung durch TNF überprüfen zu können, wurden *in vitro* Crosslinking-Experimente mit der isolierten PLAD durchgeführt. Dabei wurde untersucht, inwieweit sich PLAD-Oligomere ausbilden können und es dadurch zur Selbstassoziation via einer PLAD-PLAD-Interaktion kommt. Die experimentellen Daten zeigen, dass es zu keiner starken Selbstassoziation kommt.

Die MD-Simulation an System II (A1B2_{CRD1}A1_{CRD2}) zeigte für CRD1 (PLAD), dass die Subdomänen A1 und B2 von CRD1 im Verlauf der Simulation strukturell stabil sind und somit der Referenzstruktur ähneln (Abb. 3.14). Bei diesem Fragment bewirkt die zusätzliche Domäne A1_{CRD2} eine Stabilisierung der Subdomänen A1 und B2 von CRD1. Bislang liegen für System II (A1B2_{CRD1}A1_{CRD2}) keine experimentellen Ergebnisse über einen möglichen protektiven Einfluss bzw. der Fähigkeit zur PLAD-PLAD-Interaktion vor.

Funktionelle Protein-Fragmente von CRD1 (PLAD) können in der Arzneimittelforschung von Bedeutung sein. So spielt der Ligand TNF, bei Vermittlung seiner Wirkung über TNFR1, bei der Pathogenese, der Entstehung eines Krankheitsbildes, wie beispielsweise bei verschiedenen Formen der Gelenkentzündung eine wichtige Rolle [63]. Existierende Arzneimittel, wie beispielsweise ETANERCEPT (lösliches TNFR2), oder INFLIXIMAB werden in diesem Bereich weit verbreitet eingesetzt. Als problematisch hat sich hierbei herausgestellt, dass die verwendeten Wirkstoffe direkt an den Tumornekrosefaktor binden und somit beide Signalwege, sowohl über TNFR1, als auch über TNFR2 blockiert werden. Eine Möglichkeit diesen Nachteil zu umgehen, besteht darin, direkt den Rezeptor TNFR1 zu blockieren, ohne dass das Arzneimittel an den Liganden bindet. Eine derartige Blockierung des TNFR1 könnte über die Bindung von löslichem CRD1 (PLAD) an TNFR1 möglich sein; Solche Bindungs-

studien waren bereits im Jahr 2005 Gegenstand einer experimentellen Untersuchung [64]. Im Rahmen dieser Studie wurde die CRD1 (PLAD) von TNFR1 mit dem Enzym Glutathion-S-Transferase (GST) verknüpft. Sowohl *in vitro* Experimente, als auch *in vivo* Studien an Mäusen haben gezeigt, dass PLAD-GST Fusionsproteine die Signalkaskade inhibieren, die normalerweise bei Zugabe von TNF ausgelöst wird. Das Fusionsprotein könnte dabei einen stabilisierenden Einfluss auf die CRD1 (PLAD) haben, stellvertretend für die Subdomäne A1 der nachfolgenden CRD2. Für den Einsatz am Menschen ist dieses Fusionsprotein jedoch aufgrund des GST-Proteins nicht geeignet. Durch die MD-Simulationen der beiden Protein-Fragmente A1B2_{CRD1} und A1B2_{CRD1}A1_{CRD2} konnte ein erster Eindruck gewonnen werden, wie sich kleine Teile der extrazellulären Domäne von TNFR1 strukturell verhalten. Eine genaue Aussage über die protektive Wirkung ist jedoch auf der Basis der gemachten MD-Simulationen nicht möglich. Aufgrund der vorhandenen experimentellen Daten und den durchgeführten MD-Simulationen lässt sich aber sagen, dass ein mögliches „PLAD-Protein“ nicht nur aus der CRD1 (PLAD) selbst bestehen kann, sondern einen weiteren Teil zur Stabilisierung beinhalten sollte.

3.3.3. System III und IV - $\Delta A1_{CRD1}$ -TNFR1_{ex}- und $\Delta CRD1$ -TNFR1_{ex}-Mutanten

Experimentelle Studien haben ergeben, dass eine Deletion der ersten cysteinreichen Domäne (PLAD) von mehreren Mitgliedern der TNFR-Superfamilie (unter anderem TNFR1 und TNFR2) dazu führt, dass die verbliebene Rezeptorstruktur nicht mehr in der Lage ist, ihre natürlichen Liganden zu binden [53]. Eine erste Erklärung führt dies darauf zurück, dass zur Ligandenbindung eine Präassoziation der Rezeptoren zu Trimeren notwendig ist, was durch die Deletion von PLAD verhindert wird.

MD-Simulationen der Deletionsmutanten $\Delta A1_{CRD1}$ -TNFR1_{ex} und $\Delta CRD1$ -TNFR1_{ex} wurden durchgeführt, um strukturelle und möglicherweise funktionale Konsequenzen der Deletion von PLAD auf molekularer Ebene zu untersuchen. Hierbei wurde nicht nur die CRD1 vollständig entfernt (System IV, $\Delta CRD1$ -TNFR1_{ex}), sondern eine weitere Rezeptorstruktur simuliert, bei der nur die Subdomäne A1 von CRD1 (PLAD) entfernt wurde (System III, $\Delta A1_{CRD1}$ -TNFR1_{ex}). Im Rahmen von Bindungsstudien erfolgte die Bestimmung der Bindungsaffinität von TNF an den entsprechenden Rezeptorstrukturen [56]. In Kombination mit den im Folgenden vorgestellten Ergebnissen der MD-Simulationen, sollen die experimentell beobachteten Veränderungen der Bindungsaffinität interpretiert werden.

Als Ausgangspunkt für die Simulationen der Systeme III und IV ($\Delta A1_{CRD1}$ -TNFR1_{ex} und $\Delta CRD1$ -TNFR1_{ex}) wurde die equilibrierte Struktur von System 0 (TNFR1_{ex}) verwendet. Von dieser Startstruktur wurde für das System III die Subdomäne $A1_{CRD1}$ entfernt, für das System IV die vollständige Domäne CRD1. Die damit erhaltenen Deletionsmutanten wurden jeweils für weitere 4.75 ns simuliert. Beide Systeme wurden Beginn der Simulationen neu solvatisiert und das Proteinrückgrat in den Simulationen mit einem harmonischen Constraint für 1 ns stabilisiert. Untersucht wurde in beiden Systemen die strukturelle Stabilität, der für die Ligandenbindung wichtigen Domänen CRD2 und CRD3, beziehungsweise die Stabilität der einzelnen Subdomänen von CRD2 und CRD3.

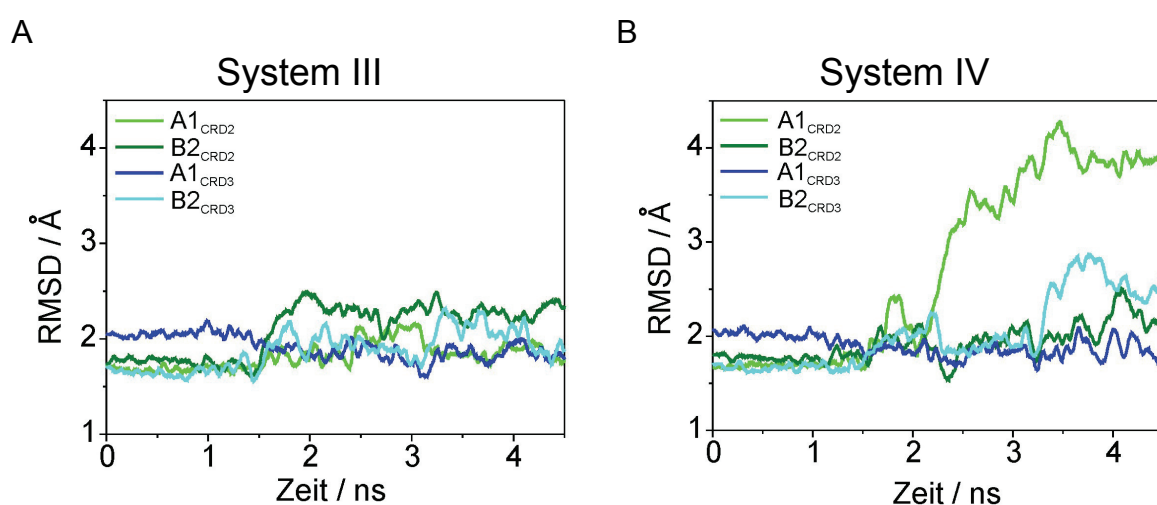


Abb. 3.15

(A) System III – $\Delta A1_{CRD1}$ -TNFR1_{ex}, (B) System IV – $\Delta CRD1$ -TNFR1_{ex}. RMSD-Verlauf der Subdomänen A1 und B2 von CRD2 und CRD3. $A1_{CRD2}$ ist in grün, $B2_{CRD2}$ in oliv, $A1_{CRD3}$ in blau und $B2_{CRD3}$ in cyan dargestellt.

Abb. 3.15 zeigt den Verlauf der strukturellen Abweichung bezogen auf die Referenzstruktur für die Systeme III und IV. Gezeigt sind die Subdomänen A1 und B2 aus CRD2 und CRD3. Dies sind die Domänen, die für die Bindung des Rezeptors mit TNF/LT α wichtig sind. Die Subdomänen aus System III, der Deletionsmutanten $\Delta A1_{CRD1}$ -TNFR1_{ex} zeigen über den gesamten Zeitraum der Simulation einen stabilen Verlauf (**Abb. 3.15A**). Erst nach 1.5 ns ist eine kleine Erhöhung des RMSD-Wertes der Subdomäne B2_{CRD2} (oliv) zu sehen. Die strukturelle Abweichung für alle Subdomänen bewegt sich bei ca. 2 Å, was mit der Simulation des kompletten TNFR1_{ex} vergleichbar ist. Dies ist auch in einer qualitativen Analyse der Struktur, durch visuelle Inspektion zu sehen (Daten nicht gezeigt). Die Loop-Struktur der einzelnen Subdomänen bleibt während der Simulation erhalten. Die in dieser Mutante N-terminale Subdomäne B2_{CRD1} ist in **Abb. 3.15A** nicht dargestellt, da sie nicht direkt an der Bindung des Liganden beteiligt ist. Sie zeigt einen, verglichen mit der Simulation von TNFR1_{ex},

flexibleren Verlauf, was sich in leicht erhöhten und stärker fluktuierenden RMSD-Werten bemerkbar macht; ein Einfluss auf Subdomänen aus CRD2 und CRD3 ist nicht erkennbar. Die Ergebnisse der Simulation von System IV (Δ CRD1-TNFR1_{ex}) zeigen ein anderes Bild. Hier sieht man deutlich, dass die Subdomäne A1_{CRD2} (grün) nach 2 ns eine große strukturelle Veränderung durchführt (Abb. 3.15B). Der RMSD-Wert steigt innerhalb der nächsten Nanosekunde auf ≈ 4 Å an und stabilisiert sich im weiteren Verlauf der Simulation auf einen Wert bei ca. 4 Å. Die Verzögerung im Anstieg der strukturellen Abweichung, wie auch schon im System III gesehen, ist auf die Verwendung eines harmonischen Constraint zur Stabilisierung zu Beginn der Simulation zurückzuführen. Innerhalb der ersten Nanosekunde wird der Constraint auf Null reduziert und alle Atome im System können sich frei bewegen.

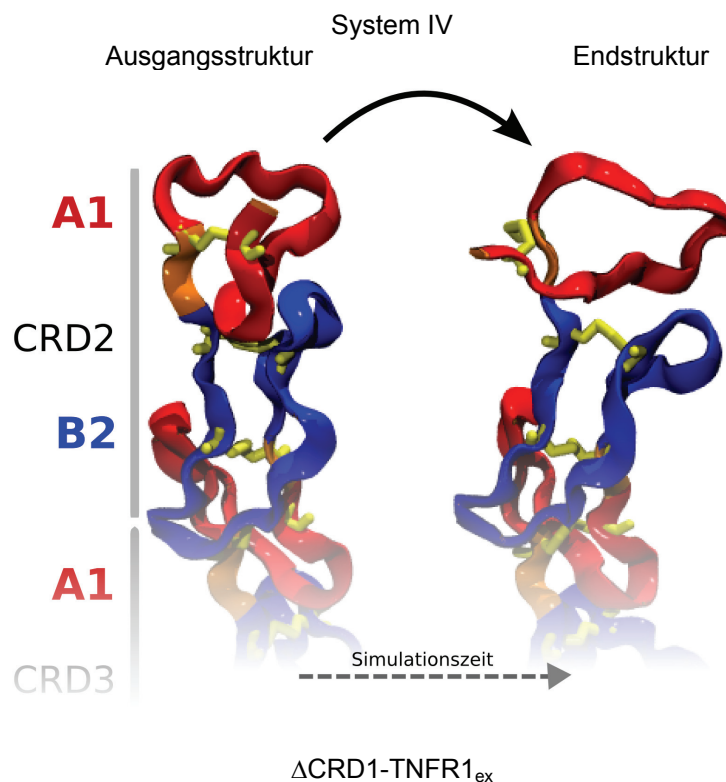


Abb. 3.16

System IV: Proteinrückgrat von CRD2 und A1_{CRD3} der Deletionsmutanten Δ CRD1-TNFR1_{ex} in Cartoon-Darstellung. Zu sehen sind zwei Strukturen; Links die Startstruktur, rechts eine gemittelte Struktur vom Ende der Simulation. Die Subdomänen A1_{CRD2} und A1_{CRD3} sind in rot, B2_{CRD2} ist in blau dargestellt.

Qualitativ lässt sich die strukturelle Veränderung von A1_{CRD2} in Abb. 3.16 erkennen. Hier sieht man die CRD2 in Cartoon-Darstellung zu Beginn (links) und zum Ende der Simulation (rechts). Gezeigt ist das Proteinrückgrat, mit A1_{CRD2} bzw. A1_{CRD3} in rot und B2_{CRD2} in blau. Deutlich zu erkennen ist eine Konformationsänderung in der Subdomäne A1_{CRD2}. Ein Auffalten der Loop-Struktur und eine Bewegung des N-Terminus weg vom Protein sind zu

erkennen. Die Konformationsänderung ist für den Anstieg des dazugehörigen RMSD-Wertes in **Abb. 3.15B** verantwortlich.

3.3.3.1. Diskussion

Die vorgestellten Ergebnisse der MD-Simulationen an den TNFR1-Deletionsmutanten $\Delta A1_{CRD1}$ -TNFR1_{ex} (System III) und $\Delta CRD1$ -TNFR1_{ex} (System IV) werden im Folgenden in Kombination mit den experimentellen Ergebnissen aus [56] diskutiert. Die Deletion der ersten cysteinreichen Domäne CRD1 (PLAD) führte in den Experimenten, in Übereinstimmung mit früheren Studien [53, 65, 66], zum Verlust der Bindungsaffinität von TNF an den Rezeptor. Die MD-Simulation der Deletionsmutante $\Delta CRD1$ -TNFR1_{ex} hat eine strukturelle Veränderung der ersten Subdomäne von CRD2 ($A1_{CRD2}$) ergeben (**Abb. 3.15B**).

Qualitativ hat sich der Loop dieser Subdomäne entfaltet (**Abb. 3.16**). In der Kristallstruktur ist zu erkennen, dass diese Subdomäne zahlreiche Kontaktstellen zum Liganden besitzt (**Abb. 3.4B,C**). Durch lokale Konformationsänderungen, wie sie in der Simulation für $A1_{CRD2}$ gezeigt werden konnten, kann eine Ligandenbindung durch sterische Hinderung erschwert oder wie in diesem Fall experimentell bestimmt, gänzlich unterbunden werden. Der Grund für die Konformationsänderung ist eine nicht mehr vorhandene Stabilisierung durch die abgeschnittene CRD1. Diese Domäne ist zwar nicht direkt an der Ligandenbindung beteiligt, hat jedoch Bereiche, vor allem in der Subdomäne $B2_{CRD1}$, die mit $A1_{CRD2}$ interagieren und zu einer Stabilisierung dieser Subdomäne führen. Dies wurde in einer weiteren MD-Simulation bestätigt, bei der nur ein Teil von CRD1, nämlich die Subdomäne $A1_{CRD1}$ deletiert wurde (System III, $\Delta A1_{CRD1}$ -TNFR1_{ex}). Diese Deletionsmutante besitzt noch die Subdomäne $B2_{CRD1}$ und ist in der Lage, die angrenzende Subdomäne $A1_{CRD2}$ strukturell zu stabilisieren, was die Ergebnisse der Simulation deutlich zeigen (**Abb. 3.15A**). Es kommt zu keiner ausgeprägten Erhöhung der strukturellen Abweichung und somit auch nicht zu einem destabilisierenden Effekt. Die in dieser Deletionsmutante N-terminale Subdomäne $B2_{CRD1}$ zeigte nur eine geringe Erhöhung der strukturellen Abweichung (Daten nicht gezeigt), was aber zu keiner Beeinträchtigung der stabilisierenden Wirkung führte und auf das Fehlen von $A1_{CRD1}$ zurückgeführt werden kann. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass diese Deletionsmutante in der Lage ist TNF zu binden, jedoch die PLAD-vermittelte Rezeptor-Rezeptor-Interaktion stark reduziert ist, bzw. völlig fehlt, da ein Teil der dafür verantwortlichen Domäne deletiert ist. Bindungsstudien bestätigen, dass diese Deletionsmutanten eine Ligandenbindung eingehen können, was auf strukturell intakte TNF-Bindungsdomänen CRD2 und CRD3 zurückzuführen ist. Eine Ausbildung von signalkompetenten Clustern und

damit eine Induzierung der Apoptose konnte hingegen nicht gezeigt werden. $B2_{CRD1}$ alleine scheint somit für eine effiziente Rezeptor-Rezeptor-Interaktion und damit für eine Vernetzung der Rezeptor-Ligand-Komplexe nicht ausreichend zu sein. Verwendet man hingegen anstelle von TNF, so genanntes *cys*TNF, wird die Apoptose eingeleitet. *Cys*TNF ist eine genetisch veränderte Form von TNF, bei der der C-Terminus jeder Untereinheit durch die Aminosäure Cystein erweitert ist. Über Disulfidbrücken ist eine Vernetzung mehrerer *cys*TNFs möglich. Diese künstliche Vernetzung via *cys*TNF und die vorhandene Rezeptor-Ligand-Bindung führen wieder zur Ausbildung signalkompetenter Cluster.

Ein Fehlen von struktureller Stabilität kann auch für die Interpretation der experimentellen Ergebnisse aus [65, 66] dienen. Eine Deletion von CRD4 hat keine Reduktion der Ligandenbindungsaffinität zur Folge. Auf den ersten Blick sollte diese Deletion zu einer Destabilisierung der angrenzenden CRD3 und somit zu einer Störung der Bindungsstelle des Liganden führen. Betrachtet man jedoch die Struktur des TNFR1-TNF-Komplexes (**Abb. 3.4A,B**), so erkennt man, dass die Subdomäne $B2_{CRD3}$ nicht maßgeblich mit dem Liganden interagiert. Die Deletion von CRD4 könnte dann zwar zu einer Destabilisierung von $B2_{CRD3}$ führen, was sich aber nicht direkt auf die Bindungsaffinität auswirken muss. Sollte $B2_{CRD3}$ trotz struktureller Abweichung noch in der Lage sein, $A1_{CRD3}$ in der richtigen Konformation zu stabilisieren, könnte damit die noch vorhandene Ligandenbindung erklärt werden.

Die MD-Simulation der Deletionsmutanten (System III, IV) kombiniert mit experimentellen Ergebnissen kann eine Erklärung für den Einfluss der CRD1 (PLAD) auf die Bindungsaffinität zu TNF geben. Die CRD1 besitzt eine Doppelfunktion. Ihre primäre Funktion besteht darin, Rezeptor-Rezeptor-Interaktion zur Ausbildung signalkompetenter Rezeptor-Ligand-Komplexe zu vermitteln. Darüber hinaus stabilisiert sie die benachbarte Domäne CRD2 in einer Konformation, die notwendig ist, um eine Ligandenbindung zu ermöglichen. Durch Deletion einer Subdomäne von CRD1 lässt sich diese primäre Funktion unterbinden, der stabilisierende Effekt auf CRD2 bleibt aber erhalten.

3.4. Zusammenfassung des Kapitels

In diesem Kapitel wurden MD-Simulationen von Fragmenten und Deletionsmutanten des extrazellulären Teils von TNFR1 vorgestellt. Es handelt sich dabei zum einen um zwei kleine Protein-Fragmente (System I bzw. II), die nur CRD1 ($A1B2_{CRD1}$) bzw. CRD1 und eine nachfolgende Subdomäne $A1_{CRD2}$ ($A1B2_{CRD1}A1_{CRD2}$) enthalten, zum anderen um zwei Mutanten (System III bzw. IV), bei denen eine Subdomäne von CRD1 ($\Delta A1_{CRD1}$ -TNFR1_{ex}) bzw. die komplette erste Domäne (Δ CRD1-TNFR1_{ex}) von TNFR1_{ex} deletiert wurden. In einer Vor-

untersuchung wurde eine MD-Simulation am gesamten extrazellulären Teil des Rezeptors (System 0, TNFR1_{ex}) durchgeführt. Diese Struktur diente gleichzeitig als Ausgangsstruktur für alle weiteren Simulationen.

Zu Beginn wurde eine MD-Simulation an TNFR1_{ex} durchgeführt. Die Proteinstruktur, die aus der Kristallstruktur des Komplexes TNFR1-LT α stammt, sollte auf diese Weise in einen equilibrierten Zustand überführt werden, um als Ausgangsstruktur für weitere Simulationen zu dienen. Die Daten aus den Simulation wurden auch dafür verwendet, die Flexibilität sowie eine mögliche hierarchische Anordnung der Substrukturen von TNFR1_{ex} zu untersuchen.

In TNFR1_{ex} bilden die Subdomänen A1 bzw. B2 der einzelnen CRDs die kleinste, strukturell stabile Einheit. Die Subdomänen sind als flexible Glieder in alternierender Reihenfolge zusammengesetzt und ergeben eine längliche, flexible Proteinstruktur, deren Proteinerückgrat, sowie das der einzelnen CRDs sich im Verlauf der Simulation strukturell verändern. Diese strukturelle Veränderung kann auf Relativbewegungen der stabilen Subdomänen zueinander zurückgeführt werden. Dabei ist die Flexibilität zwischen Subdomänen innerhalb einer CRD ausgeprägter als die Flexibilität zwischen Subdomänen benachbarter CRDs.

Die extrazellulären Domänen können anhand ihrer Funktion unterschieden bzw. charakterisiert werden. CRD1 (PLAD) ist für Rezeptor-Rezeptor-Interaktion verantwortlich, die Domänen CRD2 und CDR3 sind für Ligandenbindung notwendig. Diese Modularität allein kann nicht verwendet werden, um „funktionalisierte“ Mutanten zu erzeugen. Die Deletion einer vollständigen Domäne kann nicht nur zum Fehlen der dazugehörigen Eigenschaft führen, sie kann auch die Funktion der angrenzenden Domäne beeinträchtigen bzw. komplett unterbinden. Dies wurde in weiteren MD-Simulationen an Deletionsmutanten untersucht. Bei Deletion von CRD1 (PLAD) kann keine Rezeptor-Rezeptor-Interaktion mehr erfolgen und die Mutante ist nicht länger in der Lage TNF zu binden.

Ein Fragment, welches nur aus CRD1 besteht ist nicht in der Lage, mit CRD1s (PLAD) von intakten Rezeptoren zu interagieren, wodurch die Ausbildung signalkompetenter TNF-TNFR1-Cluster inhibiert wird. Der Grund liegt in der strukturellen Stabilität der Domänen und Subdomänen. Anhand von MD-Simulationen verschiedener Deletionsmutanten von TNFR1_{ex} konnte gezeigt werden, dass die Subdomänen im Verbund die kleinste strukturelle Einheit der Proteindomäne darstellen, aber diese Stabilität durch die angrenzenden Subdomänen bedingt wird. Die Deletion einer Domäne führt somit zu einer Destabilisierung der angrenzenden Subdomänen oder im Fall des Fragmentes A1B2_{CRD1} zu einer Destabilisierung des Fragmentes selber. Somit kann man den Domänen des extrazellulären Bereichs des TNFR1 nicht nur eine primäre Funktion, sondern auch eine sekundäre, stabilisierende

Funktion zuordnen. Im hier untersuchten Fall hat CRD1 (PLAD) neben der Funktion als Rezeptor-Rezeptor-Interaktions-Domäne eine weitere Funktion, nämlich die Stabilisierung von CRD2. Umgekehrt hat CRD2 eine stabilisierende Wirkung auf CRD1 (PLAD). Zur Stabilisierung von benachbarten Domänen ist nicht immer die komplette angrenzende Domäne notwendig; im Fall von CRD1 ist lediglich die Subdomäne $A1_{CRD2}$ notwendig, um den stabilisierenden Effekt aufrecht zu erhalten.

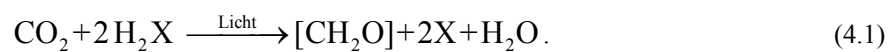
4. Untersuchung eines möglichen Diffusionspfades des Ubichinon-Moleküls durch den LH1-Ring im Purpurbakterium *Rhodospirillum rubrum*

In diesem Kapitel werden MD-Simulationen am so genannten Kernkomplex, bestehend aus dem Lichtsammelkomplex 1 (LH1) und dem Reaktionszentrum (RC), des Purpurbakteriums *Rhodospirillum rubrum* (*R. rubrum*) vorgestellt. In dieser Spezies liegt LH1 als geschlossener Ring vor, der das RC umschließt. Im Verlauf der Photosynthese überträgt der Elektronencarrier Ubichinon Ladungsträger vom RC in den Membranbereich und von dort zu einem weiteren Proteinkomplex der photosynthetischen Maschinerie. Dies wirft die Frage auf, wie das Ubichinon die strukturelle Barriere, die durch den LH1-Ring gegeben ist, überwindet. Mit Hilfe der MD-Simulation lässt sich ein möglicher Transportweg des Ubichinons durch den LH1-Ring auf molekularer Ebene untersuchen und somit klären, ob die Barriere durch den LH1-Ring ein unüberwindbares Hindernis für das Ubichinon darstellt. Dabei wird, ausgehend von einer Modellstruktur des Kernkomplexes aus *R. rubrum*, die Änderung der Freien Energie entlang einer Reaktionskoordinate durch den LH1-Ring bestimmt. Mit Hilfe von SMD-Simulationen wird das Ubichinon, beschleunigt auf die Nanosekunden-Zeitskala, durch den LH1-Ring gezogen. Eine statistische Analyse der Arbeitswerte erlaubt die Rekonstruktion der Änderung der Freien Energie entlang des Reaktionsweges. Um dieses Potential mit experimentell zugänglichen Daten, wie Turnover-Raten verschiedener Reaktionszentren in Bezug

zu setzen, wird eine mittlere Transferzeit abgeschätzt; das ist die Zeit, mit der das Ubichinon-Molekül im Mittel einmal durch den LH1-Ring diffundiert.

4.1. Einführung in die Photosynthese

Die Photosynthese spielt für das Leben auf der Erde eine essentielle Rolle. Sämtliche Nahrung und fossilen Brennstoffe sind letztlich das Produkt der Photosynthese, dem Prozess, der Sonnenenergie in chemische Energie umwandelt. Man kann zwischen der oxygenen und der anoxygenen Photosynthese unterscheiden. Bei der oxygenen Photosynthese wird Sauerstoff als Nebenprodukt zu dem eigentlichen Hauptprodukt, einem Zuckermolekül, gebildet. Dieser Sauerstoff hat sich über Millionen von Jahren in der Atmosphäre der Erde angereichert. Während die oxygene Photosynthese in Pflanzen, Algen und Cyanobakterien vorkommt, ist die Photosynthese von Bakterien anoxygen. Im Gegensatz zur oxygenen Photosynthese wird kein Sauerstoff produziert. Sowohl die oxygene, als auch die anoxygene Photosynthese kann mit folgender Grundgleichung beschrieben werden.



Kohlendioxid (CO_2) wird mit Hilfe von Lichtenergie in Kohlenhydrate ($[\text{CH}_2\text{O}]$) umgewandelt. Ein wesentlicher Unterschied oxygenener und anoxygener Photosynthese besteht darin, dass bei der oxygenen Photosynthese Wasser als Elektronen-Donor verwendet wird und Sauerstoff als Nebenprodukt entsteht. In der anoxygenen Photosynthese hingegen, wird anstelle von H_2O sowohl Schwefelwasserstoff, Wasserstoff sowie verschiedene organische Moleküle als Elektronen-Lieferanten verwendet. Bakterien, die anoxygene Photosynthese betreiben können, sind in der Evolution der Photosynthese weit vor den Pflanzen einzuordnen und lassen sich in zwei Gruppen unterteilen: die grünen Bakterien und die Purpurbakterien. Ein Hauptunterschied ist der unterschiedliche Aufbau des „Photosyntheseapparates“. Im Folgenden soll genauer auf die Photosynthese der Purpurbakterien bzw. auf die so genannte Lichtreaktion der Photosynthese eingegangen werden. In der Lichtreaktion wird Lichtenergie absorbiert und dazu verwendet, einen Protonengradienten über der Membran aufzubauen, um ATP zu bilden, das unter anderem in der folgenden Dunkelreaktion dazu benötigt wird, CO_2 zu binden und in Zucker umzuwandeln.

4.2. Photosynthese der Purpurbakterien

Die Organisation der photosynthetischen Einheit (PSU) von Purpurbakterien ist einfacher aufgebaut, als die in Cyanobakterien oder höheren Pflanzen. Bestandteile sind unter anderem die Lichtsammelkomplexe (LH1 und LH2), das Reaktionszentrum (RC), der Cytochrom bc_1 -Komplex (Cyt bc_1) und die ATP-Synthase (ATPase). Alle diese Bestandteile sind membranständige Proteinkomplexe. In manchen Spezies ist allerdings LH2 nicht vorhanden.

Der erste Schritt der Photosynthese ist die Absorption von Lichtenergie. Die absorbierte Energie wird zur Ladungstrennung verwendet. Dies ist in **Abb. 4.1** schematisch dargestellt. **Abb. 4.1A** zeigt den Elektronen-Protonen-Zyklus während des ersten Schrittes der Photosynthese, in **Abb. 4.1B** ist eine detaillierte Skizze der Reaktionen, die am RC und LH1 ablaufen, gezeigt.

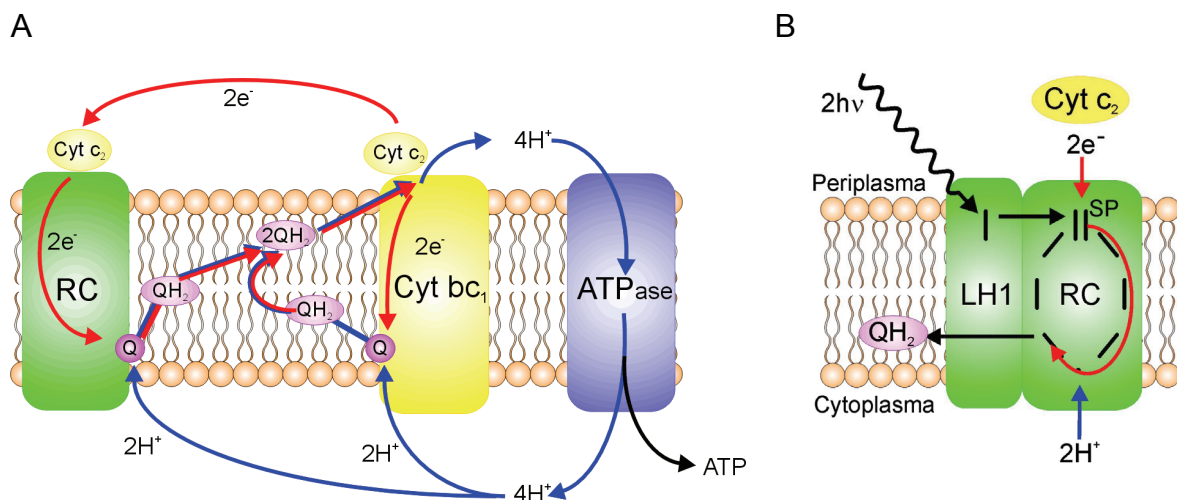


Abb. 4.1

Schematischer Ablauf der ersten Schritte der Photosynthese in Purpurbakterien. (A) Elektronen- bzw. Protonen-Zyklus in der Membran. (B) Innerhalb des RC (Elektronenzyklus).

Nach Absorption von Licht durch den LH1 Komplex wird die Anregungsenergie zum *Special Pair* (SP) im Reaktionszentrum geleitet, wo eine Ladungstrennung stattfindet. Entlang einer Elektronentransferkette, bestehend aus verschiedenen Donor-Akzeptor-Molekülen (Chlorophyllen, Pheophytin, etc.) wird das Elektron schließlich auf ein mobiles Transport-Molekül, einem Ubichinon, übertragen. Dabei wird ein Proton aus dem Cytoplasma aufgenommen. Das Ubichinon nimmt insgesamt zwei Elektronen und zwei Protonen auf, verlässt als Ubichinol (2-fach reduziertes Ubichinon) das RC und transportiert die Reduktionsäquivalente zum Cyt- bc_1 -Komplex. Hier werden die Protonen an die periplasmatische Seite der Membran abgegeben, was letztendlich einen Protonengradienten erzeugt, da zwei Protonen aus dem Cyto-

plasma in das Periplasma transportiert wurden. Durch den Protonengradient wird die Synthese von Adenosintriphosphat (ATP) angetrieben. Die Elektronen werden vom Cytochrom-bc₁-Komplex über den mobilen Elektronencarrier Cytochrom c₂ wieder zum RC zurück transportiert, um den „Elektronenmangel“ am *Special Pair* wieder auszugleichen (cyclischer Elektronentransport).

Neben diesem allgemeinen Verständnis zum Ablauf dieser Photosynthesereaktionen hat man in den vergangenen Jahrzehnten ein detailliertes Verständnis struktureller und funktioneller Eigenschaften der einzelnen Bestandteile der PSU in Purpurbakterien erhalten.

Die Struktur mehrerer Komplexe der photosynthetischen Einheit konnte entweder mit atomarer Auflösung (RC [67], LH2 [68, 69], Cyt bc₁ [70], und ATPase [71]) oder mit einer Auflösung bestimmt werden, die zumindest die Zuweisung von Sekundärstrukturen, wie α -Helizes oder von Pigmenten zulässt (LH1-RC-Komplex [72]). Darüber hinaus wurden eine Reihe von AFM-Untersuchungen an verschiedenen LH1-RC- bzw. LH1-Komplexen durchgeführt, die zum weiteren Verständnis der funktionalen Zusammenhänge dieser Pigment-Protein-Komplexe beigetragen haben [73-76]. Die Energietransferkinetik wurde für die meisten intra- bzw. intermolekularen Prozesse mittels transientser Absorption im Femtosekundenbereich experimentell bestimmt [77]. Mittels Einzelmolekülspektroskopie wurden die Wechselwirkungen zwischen LH1 und LH2 und dieser beiden Komplexe mit ihrer Umgebung untersucht [78-80].

Allen Lichtsammelkomplexen aus Purpurbakterien gemein ist der relativ ähnliche Aufbau bzw. die allgemeine strukturelle Organisation. LH1 und LH2 bestehen aus einer bestimmten Anzahl identischer Pigment-Protein-Untereinheiten. Stellvertretend ist in **Abb. 4.2** eine Untereinheit des LH1-Rings aus *R. rubrum* gezeigt. Jede dieser Untereinheiten besteht aus zwei separaten membrandurchspannenden α -Helizes, der α - und β -Untereinheit mit einer Länge von jeweils ca. 50 Aminosäuren, in denen Bakteriochlorophylle (grün) und Carotinoide (gelb) eingelagert sind. Im Detail bestehen aber große Unterschiede im Aufbau der einzelnen photosynthetischen Komplexe zwischen den einzelnen Spezies. In *Rhodobacter sphaeroides* (*Rb. sphaeroides*) beispielsweise besteht die β -Unter-

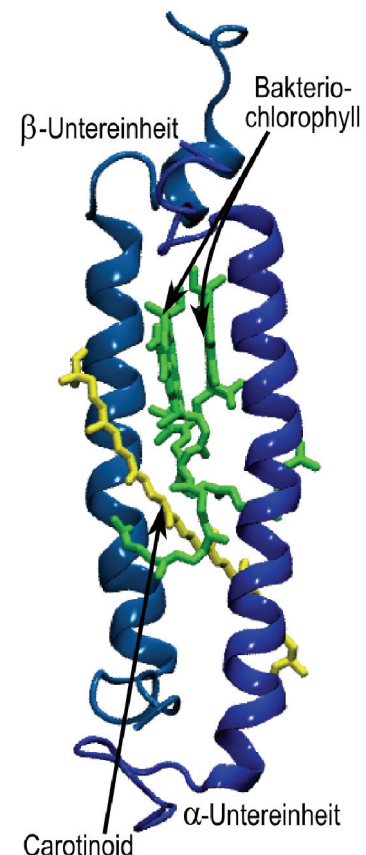


Abb. 4.2
Pigment-Protein-Untereinheit aus LH1 von *R. rubrum*. Die Protein-Untereinheiten sind in blau, die Chlorophylle in grün und das Carotinoid in gelb dargestellt.

einheit aus LH1 aus zwei helikalen Bereichen, die über eine Loop-Struktur miteinander verbunden sind. Dieselbe Untereinheit in *R. rubrum* hingegen, zeigt lediglich eine einzige helikale Domäne, die wiederum eine ähnliche Struktur aufweist, wie die kristallographisch aufgelösten β -Untereinheiten von LH2 aus *Rhodospseudomonas acidophila* und *Rhodospirillum molischianum*. Diese Beobachtungen wurden jedoch mit Hilfe von NMR in Lösung gemacht [81] und es bleibt zu klären, ob diese Unterschiede im Pigment-Protein-Komplex ebenfalls auftreten. Viel interessanter sind solche Differenzen, wenn es um die supermolekulare Organisation der Komplexe geht. Hier zeigt sich, dass der LH2 Ring in verschiedenen Spezies aus unterschiedlich vielen $\alpha\beta$ -Untereinheiten aufgebaut ist. In *R. rubrum* fehlt der LH2-Komplex sogar ganz.

Es stellt sich die Frage, ob sich diese strukturellen Unterschiede in der Funktionsweise widerspiegeln. Am offensichtlichsten ist eine Struktur-Funktions-Beziehung im Falle des Kernkomplexes (LH1-RC) des Photosyntheseapparates zu beobachten. Anhand der Kristallstruktur mit einer Auflösung von 4.8\AA [72] sowie mit den Daten hochaufgelöster EM-Untersuchungen [82-85] konnte ein unterschiedlicher Aufbau des Kernkomplexes in verschiedenen Spezies nachgewiesen werden. Eine hochaufgelöste Kristallstruktur eines LH1-RC-Komplexes gibt es bislang nicht. Ausgehend von den existierenden Daten, lässt sich jedoch für *Rb. sphaeroides* eine dimere Struktur des Kernkomplexes erkennen, in den ein zusätzliches Protein (PufX) eingebaut ist [83]. PufX verbindet zwei offene LH1-Ringe miteinander, welche zusammen einen großen s-förmigen Komplex bilden. In diesem Komplex sind zwei Reaktionszentren eingebettet.

In der Kristallstruktur des Kernkomplexes des Purpurbakteriums aus *Rhodospseudomonas palustris* konnte nachgewiesen werden, dass der LH1-Ring, der das Reaktionszentrum umgibt, aus lediglich 15 identischen $\alpha\beta$ -Untereinheiten besteht [72]. Anstelle der sechzehnten Untereinheit befindet sich eine weitere α -Helix (W-Protein), die eine Öffnung im LH1-Ring bildet. Diese Öffnung soll, ebenso wie die offene S-Form in *Rb. sphaeroides*, für den effizienten Transport des Ubichinons/Ubichinols in und aus dem Reaktionszentrum verantwortlich sein. Diese Möglichkeit, die oxidierte bzw. reduzierte Form des Ubichinons durch eine Öffnung im LH1-Ring zu schleusen, wurde in der Vergangenheit auch für die Spezies *R. rubrum* diskutiert [86]; bislang ist es aber noch nicht gelungen, ein PufX- bzw. W-Protein-Analogon zu identifizieren. Im Gegenteil, die verfügbaren EM-Daten deuten auf einen sehr symmetrischen Aufbau des Kernkomplexes mit 16 identischen $\alpha\beta$ -Untereinheiten hin [82]. Diese Untereinheiten des LH1-Rings bilden einen flexiblen, aber geschlossenen Ring um das Reaktionszentrum. Auch die Ergebnisse aus AFM-Untersuchungen deuten

darauf hin, dass das Reaktionszentrum im Falle des Purpurbakteriums *R. rubrum* komplett vom LH1-Ring umschlossen wird [74]. Vor diesem Hintergrund stellt sich die Frage, wie das Ubichinon-Molekül den LH1-Ring überwindet und aus dem Reaktionszentrum zum Cyt *bc*₁-Komplex und wieder zurück zum RC diffundieren kann. In **Abb. 4.3** sind denkbare Transportszenarien schematisch dargestellt. **Abb. 4.3A** zeigt den Fall eines geöffneten LH1-Rings, der die Diffusion zum RC erlauben würde. Für *R. rubrum* kommt dieser Fall aus den genannten strukturellen Gründen nicht in Frage. Eine weitere Möglichkeit zeigt **Abb. 4.3B**; hier verlässt das Ubichinon die Membran und umgeht das Hindernis LH1, in dem es aus dem Cytoplasma/Periplasma in das Reaktionszentrum diffundiert. Das Ubichinon-Molekül ist ein lipophiles (wasserunlösliches) Molekül, das aus einer Benzochinon-Kopfgruppe und einem lipophilen Isoprenoid-Schwanz besteht. Aufgrund der Hydrophobizität erwartet man daher, diese Moleküle eher in der Membran anzutreffen und nicht außerhalb der Membran. Dieser Sachverhalt wurde bestätigt; Ubichinon-Moleküle konnten im hydrophoben Bereich der Membran nachgewiesen werden [87, 88]. Die Diffusionskonstante von Ubichinon in einer Membranumgebung wurde dabei mit 10^{-8} cm²/s bis 10^{-7} cm²/s bestimmt [87, 89]. Aus diesem Grund wird die Möglichkeit, dass das Ubichinon-Molekül in die hydrophile Phase übergeht und nicht in der Membran verbleibt, ausgeschlossen.

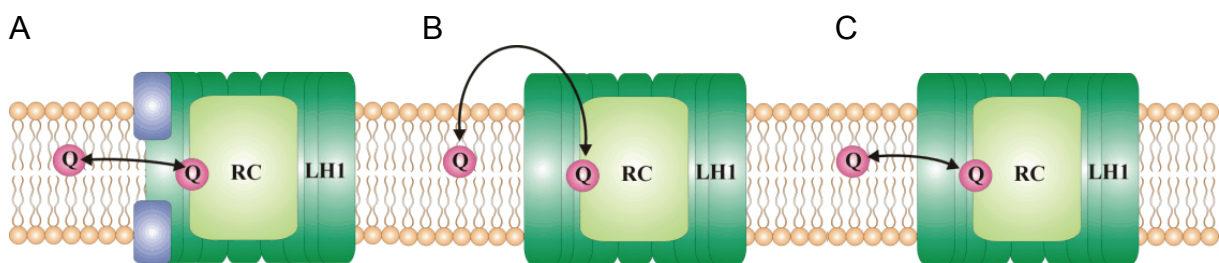


Abb. 4.3

Mögliche Transport-Szenarien. (A) Ubichinon kann durch eine Öffnung im LH1-Ring das RC erreichen. (B) Ubichinon muss die Membran verlassen, um vom Cytoplasma oder Periplasma aus das RC zu erreichen. (C) Ubichinon kann den LH1-Ring direkt durchqueren.

Folglich ist ein direkter Transportweg des Ubichinons durch den LH1-Ring, wie er in **Abb. 4.3C** dargestellt ist, nicht auszuschließen, und wurde bereits in der Literatur mehrfach diskutiert [74, 82, 85]. Experimente zur Bestimmung von *Turnover-Raten* des Reaktionszentrums aus *Rb. sphaeroides* an offenen, dimeren LH1-RC-Komplexen sowie an *Rb. sphaeroides*, bei denen das PufX-Gen fehlt und die somit einen geschlossenen LH1-Ring besitzen, haben gezeigt, dass sich die Raten im geschlossenen Fall um einen Faktor zwei reduzieren. Diese Verlangsamung lässt sich nicht auf Blockierung des Ubichinon-Transports

durch den nun geschlossenen LH1-Ring zurückführen, sondern auf eine möglicherweise nicht mehr optimale LH1-RC-Interaktion [90]. Ein Transport des Ubichinons durch einen geschlossenen LH1-Ring kann somit nicht ausgeschlossen werden.

Um die Möglichkeit eines direkten Transportweges des Ubichinons im Kernkomplex von *R. rubrum* zu untersuchen, wurden MD-Simulationen durchgeführt. Eine hochaufgelöste Kristallstruktur ist aber weder für das Reaktionszentrum noch für den LH1-Ring aus *R. rubrum* verfügbar, weswegen auf bereits vorhandene modellierte Strukturen zurückgegriffen wurde. Sowohl die Struktur des Reaktionszentrums als auch die Struktur des LH1-Rings wurden im Biologischen Institut der Universität Stuttgart in der Abteilung Bioenergetik (Prof. R. Ghosh) von Felix Authenrieth in Zusammenarbeit mit der Theoretical and Computational Biophysics Group an der University of Illinois at Urbana-Champaign (Prof. K. Schulten) entwickelt und stellten die Ausgangsstrukturen für diese Arbeit dar.

Die Modellstruktur des Reaktionszentrums aus *R. rubrum* basiert auf der Kristallstruktur des Reaktionszentrums aus *Rb. sphaeroides* und wurde mittels *Homology Modelling* adaptiert. Die Modellierung des LH1-Rings von *R. rubrum* erfolgte analog der Modellierung des LH1-Rings aus *Rb. sphaeroides* [91]. Aus den einzelnen Komponenten wurde ein Modell eines Kernkomplexes erstellt, das anschließend in einer MD-Simulation equilibriert wurde. Eine Equilibrierung ist notwendig, um eine stabile Ausgangsbasis (stabile Struktur des LH1-RC-Komplexes in physiologischer Umgebung) für weitere Simulationen zu haben.

4.3. Simulation des Kernkomplexes von *R. rubrum*

Zur Untersuchung des Ubichinon-Transports durch den LH1-Ring wurde aus den Modellstrukturen von LH1 und RC eine Struktur des LH1-RC-Komplexes konstruiert. Der entstandene Kernkomplex wurde in eine physiologisch sinnvolle Umgebung eingebettet. Ziel war es, ein equilibriertes System zu erzeugen, das als Ausgangsbasis für weitere Simulationen verwendet werden kann.

4.3.1. Simulationssystem und Simulationsparameter

Der LH1-RC-Komplex besteht aus 35 nicht-kovalent gebundenen Protein-Untereinheiten, in die 56 Pigmente eingelagert sind (siehe **Abb. 4.4**). Um eine stabile Struktur, die aus so vielen Untereinheiten und Pigmenten besteht, zu erhalten, wurde das System als erstes equilibriert. Eventuell auftretende Veränderungen des RC und vor allem des LH1, der im Hinblick auf mögliche Transitzpfade für das Ubichinon durch die Ringstruktur besonders wichtig ist, können während der Equilibrierung registriert werden.

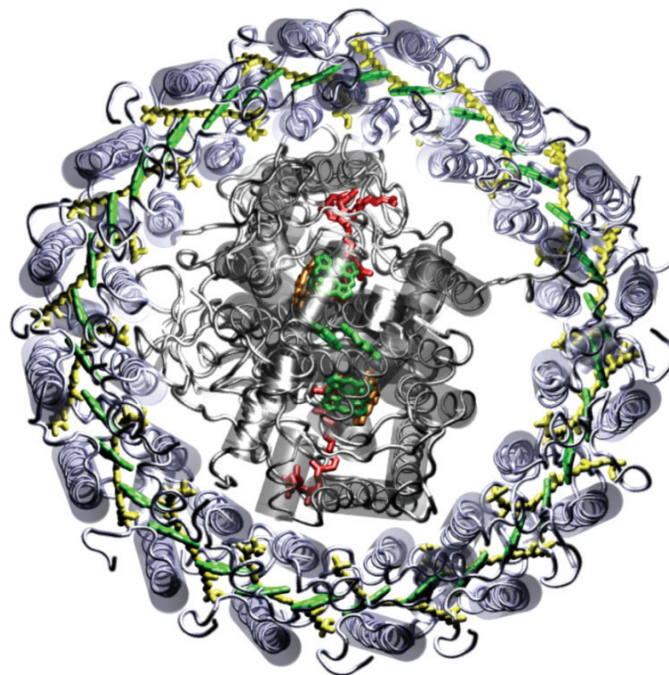
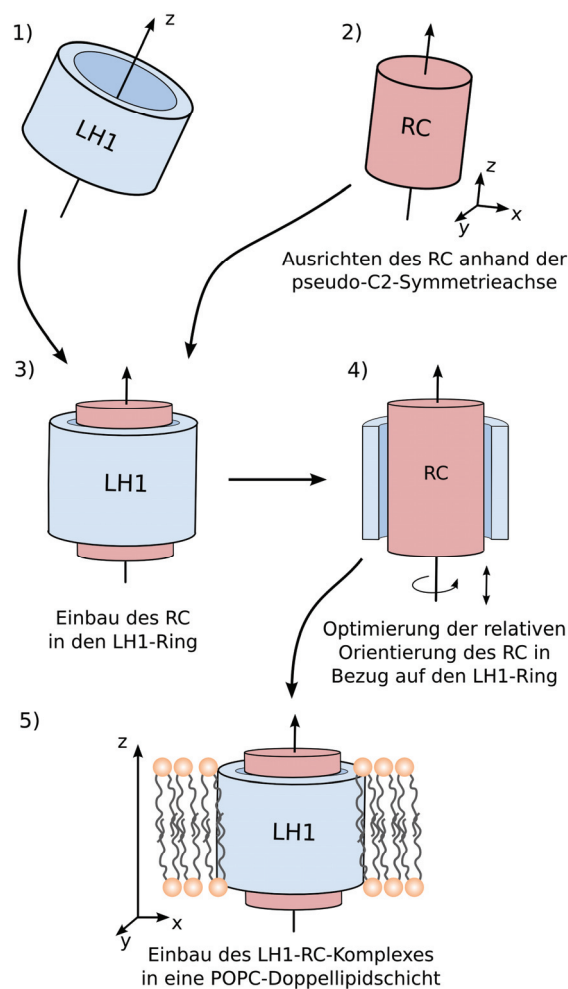


Abb. 4.4
*Aufsicht auf die Modellstruktur des LH1-RC-Komplexes des Purpurbakteriums *R. rubrum*. Die Proteinstruktur des LH1-Rings ist in blau, das RC ist in grau dargestellt. Chlorophylle sind in grün, Carotinoide in gelb und Ubichinon in rot gezeichnet.*

Der Zusammenbau von LH1 und RC aus *R. rubrum* und die anschließende Einbettung des Komplexes in eine Doppellipidschicht (Modellmembran aus POPC, β -Palmitoyl- γ -oleoyl- α -Phosphatidylcholin) wurden mit dem Programm VMD [59] durchgeführt. Die einzelnen Schritte sind in **Abb. 4.5** schematisch dargestellt. Beim Zusammenbau musste auf eine korrekte, gegenseitige Orientierung der beiden Komplexe geachtet werden. Der neu entstandene Kernkomplex wurde anschließend in die Modellmembran eingebaut.

**Abb. 4.5**

Schematische Darstellung des Zusammenbaus des LH1-RC-Komplexes, ausgehend von den Modellstrukturen LH1 und RC. 1) und 2) Ausrichten von LH1 und RC bezüglich ihrer Symmetrieachsen. 3) Einbau von RC in den LH1-Ring. 4) Optimierung der relativen Position von LH1 und RC. 5) Einbau des LH1-RC-Komplexes in eine Doppellipidschicht.

Als Referenz für das Koordinatensystem wurde die Doppellipidschicht gewählt. Die x- und y-Achse des Koordinatensystems liegen in der Membranebene, die z-Achse steht senkrecht dazu. Zunächst wurden die Strukturen von LH1 und RC anhand von Symmetrien in der Struktur im Raum ausgerichtet. Für den LH1-Ring ergibt sich die Ausrichtung des Systems aus der Ringstruktur, die durch 16 identische Untereinheiten gebildet wird. Der LH1-Ring wurde so orientiert, dass die Achse senkrecht zur Ringebene parallel zur z-Achse des Koordinatensystems liegt (siehe **Abb. 4.5-1**). Für das RC wurde zunächst, mittels Berechnung der Hauptachsen, die pseudo-C2-Symmetrieachse bestimmt und diese im Anschluss ebenfalls parallel zur z-Achse ausgerichtet (**Abb. 4.5-2**). Die pseudo-C2-Symmetrieachse spiegelt sich sowohl in

der Proteinstruktur (Abb. 4.6A,B), wie auch in den im RC eingelagerten Pigmenten wieder (Abb. 4.6C,D). Die Symmetrieachse ist in beiden Fällen grau eingezeichnet.

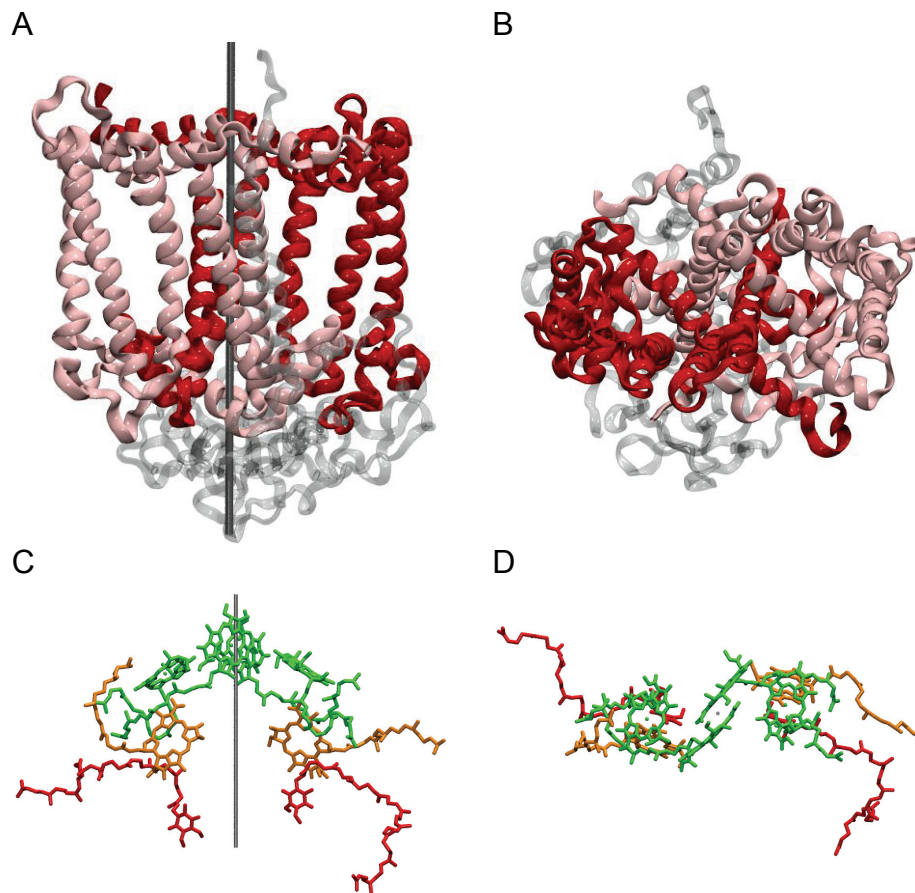


Abb. 4.6

Pseudo-C₂-Symmetrieachse des RC. (A) und (B) Darstellung der Symmetrie der Proteinstruktur in Seitenansicht bzw. Aufsicht. Die relevanten Proteinstrukturen sind in rot bzw. rosa (Cartoon-Darstellung) eingefärbt. (C) und (D) Darstellung der Symmetrie der Anordnung der Pigmente in Seitenansicht bzw. Aufsicht. Die Chlorophylle (BChl) sind in grün, die Pheophytin-Moleküle (Phe) sind orange und die Ubichinon-Moleküle sind in rot eingefärbt.

Der innere Durchmesser des LH1-Rings ist mit 70 Å groß genug, um ein komplettes Reaktionszentrum zu umschließen (siehe Abb. 4.5-3). Durch die Festlegung der Symmetrieachsen und deren relative Orientierung zur Membranebene sind für eine optimale Platzierung von RC und LH1 nur noch die vertikale Positionierung sowie die relative Orientierung des RC bezüglich des LH1-Rings festzulegen (siehe Abb. 4.5-4). Folgende Annahmen wurden der Ausrichtung zu Grunde gelegt. i) Es ist bekannt, dass sich in Transmembranproteinen an der Grenzfläche zwischen Wasser und Membran bestimmte Aminosäuren bevorzugt aufhalten [92]. Dazu zählt unter anderem die aromatische Aminosäure Tryptophan. Diese polare Aminosäure befindet sich im LH1-Ring und im RC sowohl auf der Ober- als auch auf der Unterseite der Proteinstrukturen und kann somit als Orientierungshilfe dienen. In Abb. 4.7 ist

der LH1-RC-Komplex in einer Cartoon-Darstellung gezeigt. Die Aminosäure Tryptophan ist in blau (LH1) und in rot (RC) hervorgehoben und zur besseren Visualisierung ist eine Hilfsebene eingezeichnet, die den Schwerpunkt der Tryptophan-Reste in z-Richtung darstellt.

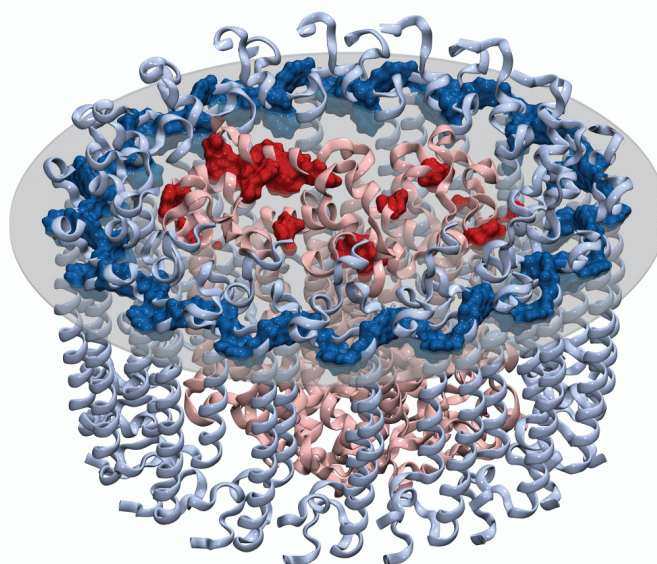


Abb. 4.7

*Anordnung der Tryptophan-Reste im Kernkomplex von *R. rubrum*. Die Proteine des LH1-Rings sind in hellblau, die Proteine des RC in rosa gezeigt (Cartoon-Darstellung). Tryptophane auf der Oberseite beider Strukturen sind in der jeweiligen Farbe in Van der Waals-Darstellung zu sehen (blau bzw. rot). Auf Höhe der Tryptophan-Schwerpunkte ist eine halbtransparente Ebene zur besseren Visualisierung eingezeichnet.*

Die relative Lage der beiden Strukturen wurde so gewählt, dass die Schwerpunkte der Tryptophane von LH1 und RC in derselben z-Ebene liegen. Zusätzlich kann der LH1-Ring um die z-Achse des RC rotiert werden. Aufgrund der Symmetrie des LH1-Rings ist $\frac{1}{16}$ der vollen Rotation ausreichend. ii) Um eine minimale strukturelle Überlappung zwischen LH1 und RC zu erhalten, wurden für 16 verschiedene Orientierungen von LH1 bezüglich RC die Anzahl der überlappenden Atome berechnet und die Orientierung mit der minimalen Anzahl gewählt. Die Berechnung erfolgte nicht für eine Überlappung von Seitenkettenatomen der Aminosäuren, da diese mit Hilfe einer Minimierung beseitigt werden kann. Es ging vornehmlich darum, eine Orientierung ohne große sterische Behinderungen der beiden Proteinrückgrate zu erhalten.

Der nächste Schritt beinhaltete den Einbau des LH1-RC-Komplexes in eine Doppellipidschicht (siehe Abb. 4.5-5). Durch die Ringstruktur und durch den hydrophoben Bereich der α -Helizes der $\alpha\beta$ -Untereinheiten des LH1-Rings, war eine optimale Positionierung vorgegeben. Der Einbau des LH1-Rings in die Membran erfolgte so, dass der hydrophobe

Bereich der $\alpha\beta$ -Untereinheiten maximal durch den hydrophoben Bereich der Membran abgedeckt war. Da das RC nicht den ganzen verfügbaren Platz im Inneren des LH1-Rings ausfüllt, wurden in diese verbleibenden Lücken weitere Lipide eingebaut. Durch den zusätzlichen Einbau von Lipiden lassen sich Hohlräume vermeiden, die in einer Simulation zu unerwünschten Deformationen aufgrund der Druckkopplung führen können. Anschließend wurde diese Struktur mit dem TIP3P Wassermodell hydratisiert, in dem eine ca. 30 Å dicke Wasserschicht auf der Oberseite und eine ca. 40 Å dicke Wasserschicht auf der Unterseite der Membran hinzugefügt worden ist. Zum Schluß wurde das System an den Rändern beschnitten, um eine hexagonale Simulations-Einheitszelle zu erhalten. Dies erlaubt es, das System mit einer möglichst geringen Anzahl an Atomen bei gleichzeitiger Verwendung periodischer Randbedingungen zu simulieren.

In **Abb. 4.8** ist das Gesamtsystem sowohl in einer Aufsicht (A) als auch in einer Seitenansicht parallel zur Membranebene (B) dargestellt.

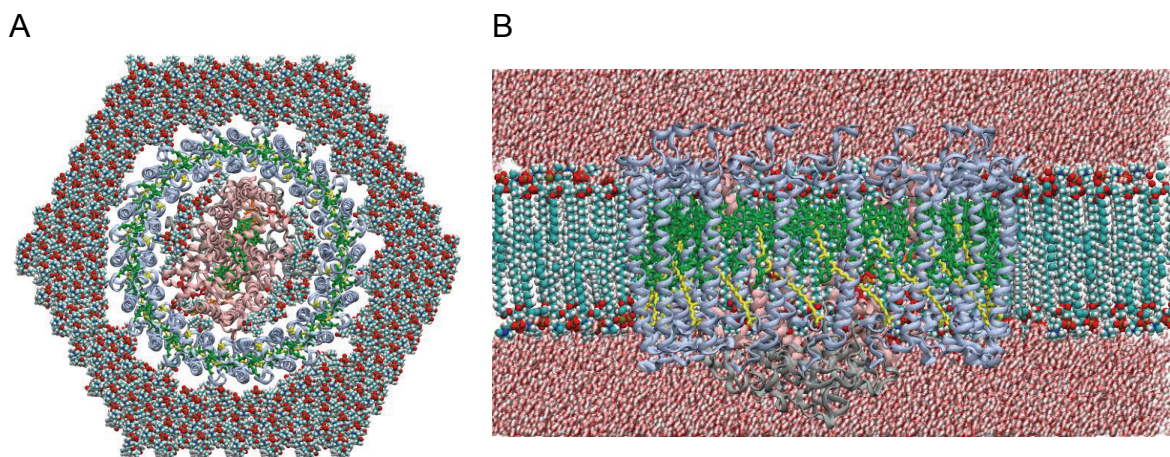


Abb. 4.8

LH1-RC-Komplex, eingebaut in eine Doppellipidschicht mit Wasserbox. Wasser- bzw. Lipidatome sind in beiden Abbildungen der Übersicht wegen nur zum Teil eingezeichnet. Die Proteinatome des LH1-Rings sind in hellblau, die Atome des RC in rosa (Cartoon-Darstellung), die BChl-Atome sind in grün und die Car-Atome in gelb gezeigt (Liccorice-Darstellung). (A): Aufsicht, (B): Seitenansicht.

Ein Teil der Wasseratome und Lipide wurde nicht abgebildet, um einen besseren Blick auf die Pigment-Protein-Struktur zu ermöglichen. Die Proteinatome des LH1-Rings sind in hellblau, des RC in rosa (Cartoon-Darstellung), die BChl- bzw. Car-Atome sind in grün bzw. gelb (Liccorice-Darstellung) eingezeichnet. Das Gesamtsystem umfasst insgesamt 243874 Atome, dabei entfallen 40838 Atome auf das Protein, 7210 Atome auf die Pigmente, 58156 Atome auf die Lipide und 137670 Atome auf die Wassermoleküle. Diese Startstruktur wurde einer Reihe von Minimierungs- und Equilibrierungsschritten unterzogen, um sie an die ge-

wünschten Umgebungsbedingungen, wie Temperatur und Druck anzupassen und um eine Gleichgewichtsstruktur zu erhalten.

Alle Simulationen sind mit dem Programm NAMD [30] unter Verwendung des CHARMM27 Kraftfelds [29] durchgeführt worden. Die Equilibrierungszeit betrug 4.25 ns, der Integrationszeitschritt 1 fs. Parameter für alle Moleküle, die nicht im Standard CHARMM-Kraftfeld enthalten sind, wurden aus Authenrieth et. al. [93, 94] bzw. Damjanovic et al. [95] übernommen. Van der Waals-Wechselwirkungen wurden für jeden Zeitschritt mit einem *Cutoff* von 10 Å und einer weichen Schaltfunktion berechnet. Zur Berechnung der elektrostatischen Wechselwirkung kam die *Particle Mesh Ewald* (PME)-Methode [36] mit einem Multi-Zeitschritt-Algorithmus zum Einsatz. Der Abschneideradius der Summe im Realraum betrug 10 Å, der Rasterabstand für die reziproke Summe im Fourierraum lag bei 1 Å. Das System wurde mit periodischen Randbedingungen bei einer Temperatur von 300 K und einem Druck von 1 bar unter Verwendung der *Langevin Piston*-Methode [40], mit einer Oszillationsperiode von 200 fs und einer Dämpfungszeit von 100 fs, simuliert.

Minimierung: Das Proteinrückgrat des LH1-RC-Komplexes wird mit einem harmonischen Constraint festgehalten, die übrigen Atome werden energieminimiert. Durch diese Vorgehensweise lassen sich potentielle „Energiespitzen“ eliminieren, die aufgrund der Van der Waals-Wechselwirkung überlappender, oder dicht beieinander liegender Atome entstehen. Dazu werden die Positionen der Atome gemäß dem Gradienten der potentiellen Energie verändert, bis ein lokales Minimum erreicht ist, oder ein festgelegter Grenzwert unterschritten wird. Zur Minimierung kamen sowohl die *Steepest Descent*-Methode, wie auch die *Conjugate Gradient*-Methode zum Einsatz.

Equilibrierung des Lösungsmittels: Der LH1-RC-Komplex wird mit einem harmonischen Constraint von 70 pN/Å festgehalten und nur die Lipide und Wassermoleküle werden equilibriert. Das System wird kontinuierlich von 0 K (entsprechend einer Temperaturrampe) auf 300 K aufgeheizt. Dabei kommt es zum Auftauen von Freiheitsgraden der Lipide, so dass die Lipidschwänze ihre anfängliche geordnete Struktur verlieren und Wasser in den hydrophilen Bereich um die Kopfgruppe der Lipide eindringen kann. Die Simulation erfolgte im NVT-Ensemble; die Simulationsdauer betrug 250 ps.

Equilibrierung der Aminosäure-Seitenketten: In einer weiteren Simulation wird der harmonische Constraint der Aminosäure-Seitenketten im Verlauf der Simulation von seinem

Anfangswert von 70 pN/Å auf 0 pN/Å reduziert, wodurch sich die Seitenkettenatome frei bewegen können. Die Simulation erfolgte im NPT-Ensemble bei einer konstanten Temperatur von 300 K. Die Simulationsdauer betrug 250 ps.

Equilibrierung des Gesamtsystems: Im letzten Schritt wird der Constraint auf die Atome des Proteinrückgrats des LH1-RC-Komplexes auf 0 pN/Å reduziert und das System kann frei equilibrieren. Die Simulation erfolgte im NPT-Ensemble bei einer konstanten Temperatur von 300 K und einem konstanten Druck von 1 bar. Die Simulationsdauer betrug 4 ns.

4.3.2. Ergebnisse

In **Abb. 4.9** ist das Gesamtsystem vor bzw. nach der Equilibrierung dargestellt. **Abb. 4.9A** und **C** zeigen die Startstruktur, **Abb. 4.9B** und **D** die equilibrierte Struktur in Auf- bzw. Seitenansicht. Die Wasseratome sind der Übersicht wegen nicht eingezeichnet.

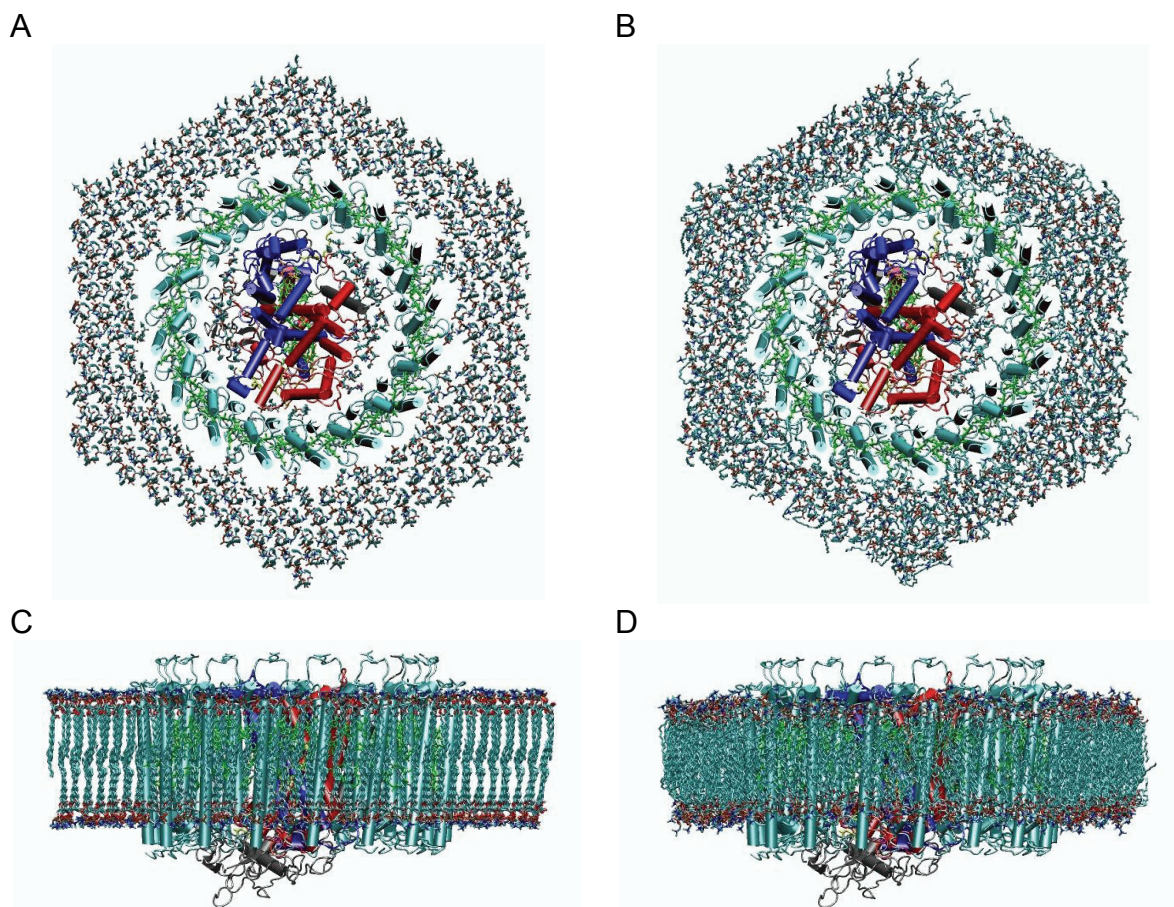


Abb. 4.9

Equilibrierung der Startstruktur des LH1-RC-Komplexes. (A), (C) Aufsicht bzw. Seitenansicht zu Beginn der Simulation; (B), (D) Aufsicht bzw. Seitenansicht nach Equilibrierung. Die Proteinstrukturen sind in Cartoon-Darstellung gezeigt (LH1 – cyan, RC – rot, blau und grau), die BChl-Atome sind in grün und Car-Atome in gelb eingefärbt.

Der LH1-Ring ist von Lipiden umgeben, die teilweise auch im Inneren des LH1-Rings zu finden sind. Man kann erkennen, dass sich die zu Anfang geordneten Lipide (Abb. 4.9A,C) im Laufe der Simulation an den LH1-Ring anpassen und eine kompaktere und chaotischere Struktur einnehmen (Abb. 4.9B,D). Eine quantitative Analyse der Lipidparameter ergab eine Membranhöhe von 38 Å im equilibrierten Zustand. Der hydrophobe Bereich ist damit ausreichend dick, um den Transmembranbereich des LH1-Rings einzuschließen; Dies stimmt mit Daten aus der Literatur überein [96]. Eine weitere interessante Größe zur Charakterisierung einer Membran, oder in diesem Falle, einer Doppellipidschicht ist die *Area per lipid*, d.h. die Fläche, die einem Lipid im Mittel zur Verfügung steht. Die Bestimmung erfolgt im Allgemeinen durch eine Voronoi-Analyse [97], gemittelt über mehrere Zeitschritte. Das Ergebnis dieser Analyse ergab, in Übereinstimmung mit Daten aus der Literatur, einen Mittelwert von 67 Å² pro Lipid [98]. Bei den Strukturen von LH1 und RC sind auf den ersten Blick keine merklichen Veränderungen festzustellen. Um den Equilibrierungsprozess des Kernkomplexes genau kontrollieren und bewerten zu können, wurde eine Reihe von Kenngrößen, wie Temperatur, Druck, Gesamtenergie und strukturelle Daten erfasst und analysiert. In Abb. 4.10 ist eine Zusammenstellung dieser Größen zu sehen. Für die Systemgrößen Gesamtenergie, Volumen, Temperatur und Druck sind die Ausgangsdaten in grau und die dazugehörige zeitliche Mittelung in rot eingezeichnet, um den generellen Verlauf des Systemparameters hervorzuheben. Die Gesamtenergie (Abb. 4.10A) sowie das Systemvolumen (Abb. 4.10B) nehmen im Verlauf der Equilibrierung ab und nähern sich zum Ende der Simulation einem konstanten Wert an. Die Temperatur des Systems zeigt während der Simulation keine merklichen Abweichungen und schwankt um den vorgegebenen Wert von 300 K (Abb. 4.10C); der Druck hat im Zeitmittel (rote Kurve) einen Wert von 1 bar (Abb. 4.10D). Zur Beurteilung der Equilibrierung sind eventuelle strukturelle Veränderungen des Systems entlang der Trajektorie ausschlaggebend. Hierzu wurden RMSD-Werte für verschiedene Substrukturen des Systems berechnet. In Abb. 4.10E ist die strukturelle Abweichung der Transmembrandomäne des Proteinrückgrats des RC bezüglich der Startstruktur gezeigt. Die strukturelle Abweichung steigt während der Simulation auf ca. 2.5 Å an und geht zum Ende der Equilibrierung in Sättigung. Im Fall des LH1 sieht der Verlauf des RMSD-Wertes ähnlich aus (Abb. 4.10F). Die RMSD-Werte des LH1-Rings sind im Vergleich zum den RMSD-Werten des RC leicht erhöht und liegen am Ende der Simulation bei 3.25 Å.

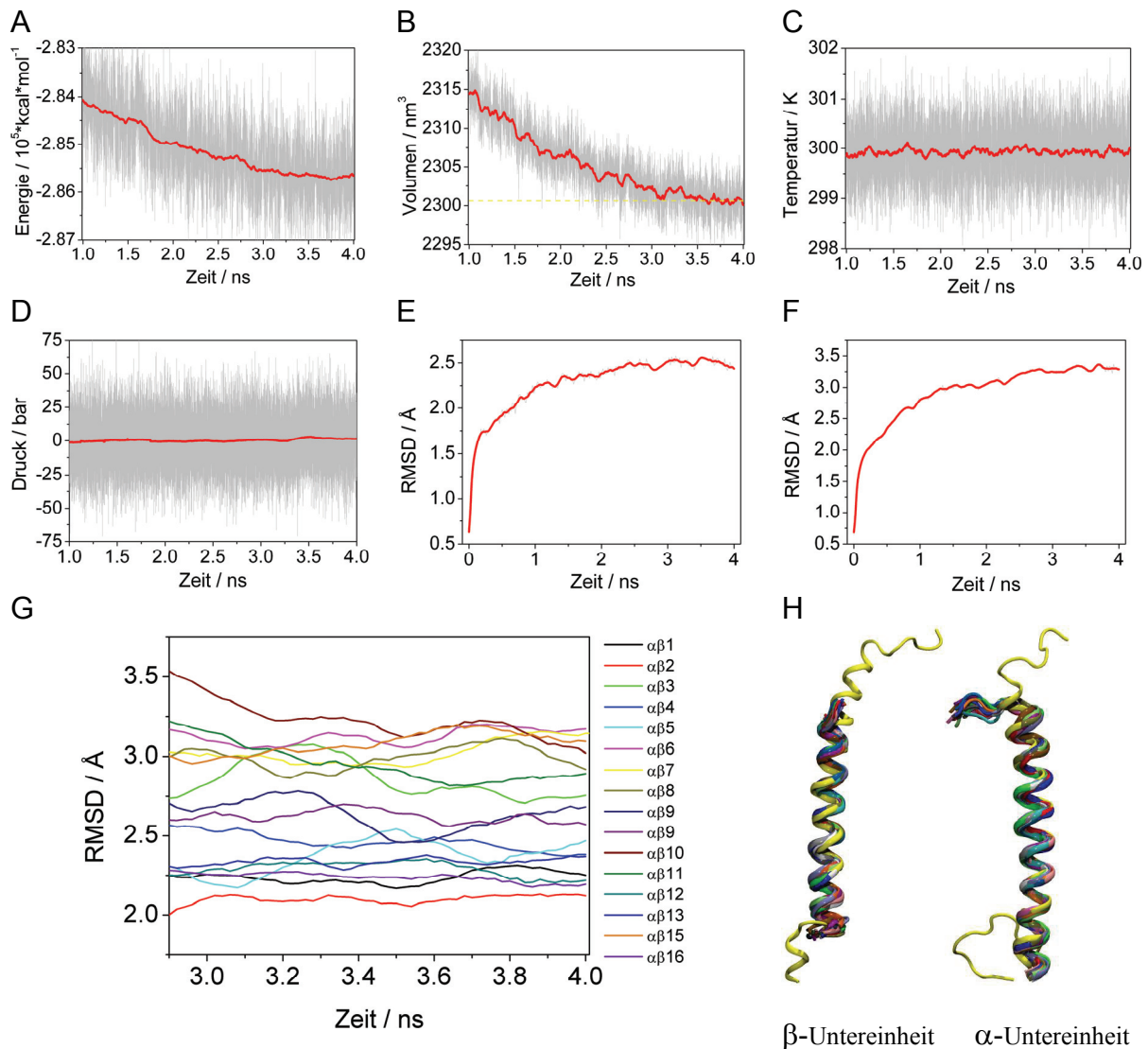


Abb. 4.10

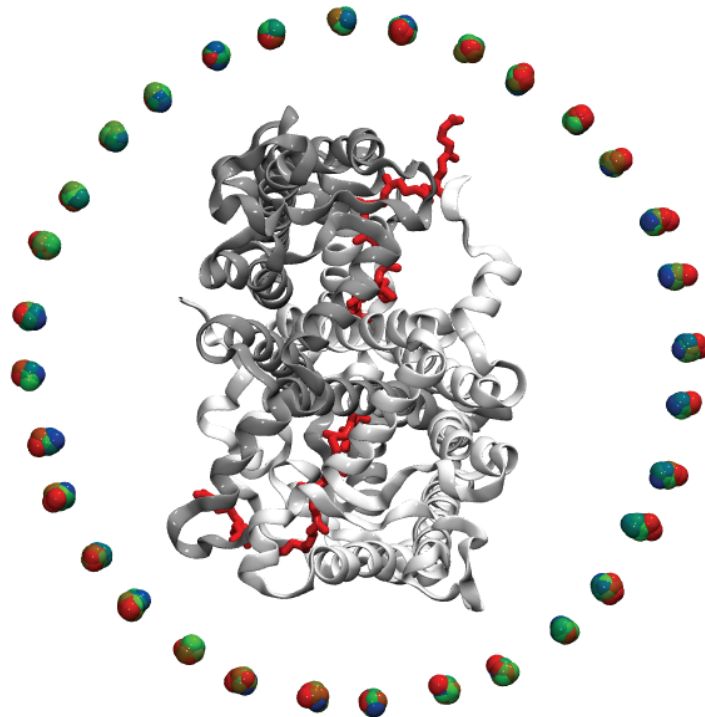
Equilibration des Kernkomplexes. (A) Gesamtenergie, (B) Volumen, (C) Temperatur, (D) Druck, (E) Strukturelle Abweichung des RCs (Proteinrückgrat) bezüglich der Startstruktur, (F) Strukturelle Abweichung der Transmembrandomänen des LH1-Rings (Proteinrückgrat) von der Startstruktur, (G) Strukturelle Abweichung der $\alpha\beta$ -Untereinheiten des LH1-Rings (Proteinrückgrat) von der Startstruktur. (H) Überlagerung der Strukturen der α - bzw. β -Untereinheit (Proteinrückgrat) mit den NMR-Strukturen. Die Farbgebung entspricht der Farbgebung in (G).

Um die strukturellen Veränderungen innerhalb des LH1-Rings noch genauer betrachten zu können, wurde der Verlauf des RMSD-Wertes für die letzte Nanosekunde der Simulation, für jede $\alpha\beta$ -Untereinheit getrennt berechnet (Abb. 4.10G). Die Nummerierung erfolgt für die 16 Untereinheiten von $\alpha\beta 1$ bis $\alpha\beta 16$; jede Untereinheit ist in einer anderen Farbe dargestellt. Abb. 4.10G zeigt eine Verteilung an RMSD-Werten für die einzelnen $\alpha\beta$ -Untereinheiten, die im Verlauf der letzten Nanosekunde schwanken, jedoch keine allgemeine Drift aufweisen. Die Verteilung und die Fluktuationen der RMSD-Werte sind darauf zurückzuführen, dass nicht nur die Transmembrandomäne berücksichtigt wird, wie in Abb. 4.10F, sondern das gesamte Proteinrückgrat der $\alpha\beta$ -Untereinheit. Die im Cyto- bzw. Periplasma befindlichen

terminalen Bereiche zeigen eine erhöhte Flexibilität. Eine Überlagerung der membranständigen α -Helizes, sowohl für die α - als auch für die β -Untereinheit mit den vorhandenen NMR-Strukturdaten ist in **Abb. 4.10H** dargestellt. Gezeigt ist jeweils das Proteinrückgrat in Ribbon-Darstellung. Die NMR-Struktur ist in gelb, die jeweilige Untereinheit aus dem LH1-Ring ist analog zu **Abb. 4.10G** eingefärbt. Im Bild links ist die β -Untereinheit, rechts die α -Untereinheit dargestellt. Alle Untereinheiten der equilibrierten Struktur zeigen eine gute Übereinstimmung im Transmembranbereich. Die teilweise ungeordneten Loopstrukturen der terminalen Regionen der Untereinheiten sind hier nicht gezeigt. Die verwendete NMR-Struktur beinhaltet 10 unterschiedliche Datensätze. Der Vergleich erfolgte mit einer gemittelten Struktur und berücksichtigte nur das Proteinrückgrat des Transmembranbereichs. Die durchschnittliche Abweichung der Untereinheiten von der NMR-Struktur beträgt ca. 1.5 Å für die α -Untereinheit und 1.7 Å für die β -Untereinheit.

4.3.3. Diskussion

Die Simulation des Kernkomplexes aus *R. rubrum* ergab nach einer Equilibrierungszeit von 4 ns ein stabiles System. Die charakteristischen Systemgrößen haben sich in dieser Zeit größtenteils stabilisiert und zeigen einen typischen Verlauf für eine MD-Equilibrierungssimulation. Die strukturellen Abweichungen des kompletten LH1-Rings und des RC zeigen einen Verlauf, der zum Ende der Simulation in Sättigung geht, aber dennoch eine leichte Drift zu höheren RMSD-Werten erkennen lässt. Da in beiden Fällen nur der Transmembranbereich untersucht wurde, kann diese Drift nicht auf die flexiblen terminalen Regionen zurückgeführt werden. Es ist anzunehmen, dass sich die einzelnen $\alpha\beta$ -Untereinheiten des LH1-Rings gegeneinander verschieben, was zu einer Veränderung der Ringstruktur und damit auch zu einer Veränderung der Struktur des RC führen kann. In **Abb. 4.11** sind die Veränderungen der Schwerpunkte der einzelnen Untereinheiten im Verlauf der Trajektorie dargestellt. Für jeden erfassten Punkt der Trajektorie ist eine Kugel am Schwerpunkt für jede Untereinheit gezeichnet. Die verschiedenen Zeitpunkte sind farblich kodiert. Der Farbverlauf geht von rot über grün nach blau. Im Zentrum des LH1 ist das RC in grau und weiß (Cartoon-Darstellung), die Ubichinon-Moleküle in rot (Liccorice-Darstellung) eingezeichnet.

**Abb. 4.11**

Abweichung des LH1-Rings von einer Kreisstruktur. Die Schwerpunkte der $\alpha\beta$ -Untereinheiten sind als Kugeln gezeichnet. Die zeitliche Abfolge ist farbkodiert (rot \rightarrow grün \rightarrow blau). Das RC ist in grau bzw. weiß, die Ubichinon-Moleküle sind in rot dargestellt.

In **Abb. 4.11** ist zu erkennen, dass sich innerhalb der Simulationsdauer von 4 ns einige Untereinheiten verschoben haben und somit die Kreisform des LH1-Rings gestört ist. Die Schwerpunkte der sich bewegenden Untereinheiten verschieben sich nach innen (blaue Färbung auf der Innenseite des Rings). Dies könnte zum einen an der länglichen Form des RC liegen, oder an einer nicht ausreichenden Füllung des LH1-Rings mit Lipiden und dadurch vorhandenen Hohlräumen. Da das RC aber einen Großteil des Innenraums des LH1 ausfüllt, kann sich der LH1-Ring in einem weiteren Verlauf einer Equilibrierung nicht mehr stark verzerren. Eine komplette Erfassung der strukturellen Veränderungen des LH1-Rings ist aufgrund der erwarteten langsamen Zeitskalen in einer MD-Simulation nicht möglich. Bei Betrachtung der Struktur des LH1-Rings nach erfolgter Equilibrierung zeigte sich, dass sich im LH1-Ring Lücken in der Pigment-Protein-Struktur ausgebildet haben. Diese verlaufen parallel zur Membranebene und sind zwischen den $\alpha\beta$ -Untereinheiten des LH1-Rings lokalisiert. **Abb. 4.12** zeigt einen Ausschnitt des LH1-Rings nach der Equilibrierung in einer Seitenansicht parallel zur Membranebene (van der Waals-Darstellung).

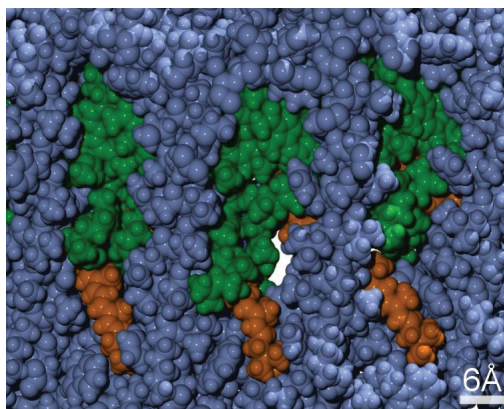


Abb. 4.12

Seitenansicht parallel zur Membranebene auf einen Teil des LH1-Rings nach der Equilibrierung. Die Struktur ist in Van der Waals-Darstellung gezeigt. Proteinatome sind in blau, BChl-Atome in grün und Car-Atome in orange dargestellt. In der Mitte der Abbildung ist ein Kanal durch den LH1-Ring zu erkennen.

Proteinatome sind in blau, BChl-Atome in grün und Car-Atome in orange dargestellt. Die restliche Struktur des LH1-Rings wurde nicht dargestellt. Im Pigment-Protein-Gerüst ist deutlich ein Kanal zu sehen. Diese Kanäle haben einen Durchmesser von $\sim 6\text{Å}$ und die Innenseiten werden größtenteils von Car-Molekülen, BChl-Schwänzen und bestimmten Aminosäuren wie Phenylalanin, Leucin, und Alanin ausgekleidet. Der Kanal besteht somit vor allem aus hydrophoben Molekülen – vorteilhaft für lipophile Moleküle, die sich einen Weg durch den LH1-Ring suchen.

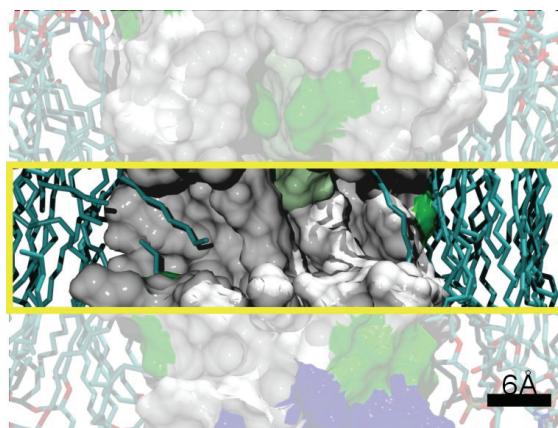


Abb. 4.13

Querschnitt durch einen Kanal im LH1-Ring nach der Equilibrierung. Seitenansicht parallel zur Membranebene. Die Kanalregion ist durch einen gelben Kasten hervorgehoben. Hydrophobe Bereiche sind in weiß, polare in grün und geladene Aminosäuren sind in blau bzw. rot eingefärbt. Die Lipide sind in Liccorice-Darstellung gezeichnet. Der hydrophobe Charakter des Kanals ist eindeutig sichtbar. Lipidschwänze ragen von beiden Seiten in den Kanaleingang.

Abb. 4.13 zeigt einen Querschnitt durch einen der Kanäle. Die Seitenansicht des Kanalbereichs ist durch einen gelben Kasten hervorgehoben. Hydrophobe Bereiche sind in weiß, polare Bereiche in grün und geladene Aminosäuren in blau bzw. rot eingefärbt (Surface-Darstellung). Lipid-Atome sind in Liccorice-Darstellung gezeichnet. Der hydrophobe Charakter des Kanals ist eindeutig sichtbar. MD-Simulationen, ausgehend von einer geordneten Lipidstruktur, bei der die Lipidschwänze senkrecht zur Membranebene liegen zeigen, dass sich die hydrophoben Lipidschwänze innerhalb von Nanosekunden in die Kanalöffnungen bewegen und die Eingangsbereiche auf beiden Seiten ausfüllen. Im Verlauf einer Simulation verändern sich die Kanalgeometrie, sowie der Durchmesser des Kanals zwischen den einzelnen $\alpha\beta$ -Untereinheiten. Dies kann auf die Flexibilität und den Aufbau des LH1-Rings aus nicht-kovalent gebundenen Protein- und Pigmentkomponenten zurückgeführt werden. Im Folgenden soll ein solcher Kanal als möglicher Pfad für die Diffusion des Ubichinons durch den LH1-Ring näher untersucht werden. Um ein optimales, d. h. kleines Modellsystem zu konstruieren wurde die Systemgröße reduziert.

4.4. Modellsystem

Um einen möglichen Diffusionsweg des Ubichinons durch den LH1-Ring untersuchen zu können, wurde ein Modellsystem erstellt, das einerseits alle notwendigen Komponenten beinhaltet um den Diffusionsprozess beschreiben zu können, und andererseits ein Minimum an Atomen besitzt, um eine effiziente Simulation durchführen zu können.

4.4.1. Simulationssystem und Simulationsparameter

Für die Bestimmung eines möglichen Transportwegs, der eine Diffusion des Ubichinons durch den LH1-Ring vorsieht, sind sowohl die Berücksichtigung des Reaktionszentrums, sowie eine Simulation der kompletten Ringsstruktur nicht notwendig. Die gefundenen Kanäle befinden sich zwischen aufeinander folgenden $\alpha\beta$ -Untereinheiten. Daher kann das Simulationssystem auf den eigentlichen Kanal und die Pigment-Protein-Struktur um den Kanal begrenzt werden.

Das Modellsystem besteht aus vier $\alpha\beta$ -Untereinheiten und einem Ubichinon-Molekül. Die Struktur des LH1-Segmentes stammt aus der equilibrierten Struktur des Gesamtsystems. Die vier $\alpha\beta$ -Untereinheiten zusammen mit den Pigmenten wurden in eine POPC-Doppel-

lipidschicht eingebaut und mit dem TIP3P-Wassermolekül solvatisiert. Die Struktur des Ubichinon-Moleküls wurde aus der Modellstruktur des Reaktionszentrums entnommen und dem System hinzugefügt. Die Platzierung des Ubichinons erfolgte vor dem LH1-Segment im hydrophoben Bereich der Lipide. Überlappende Lipid-Atome wurden anschließend entfernt.

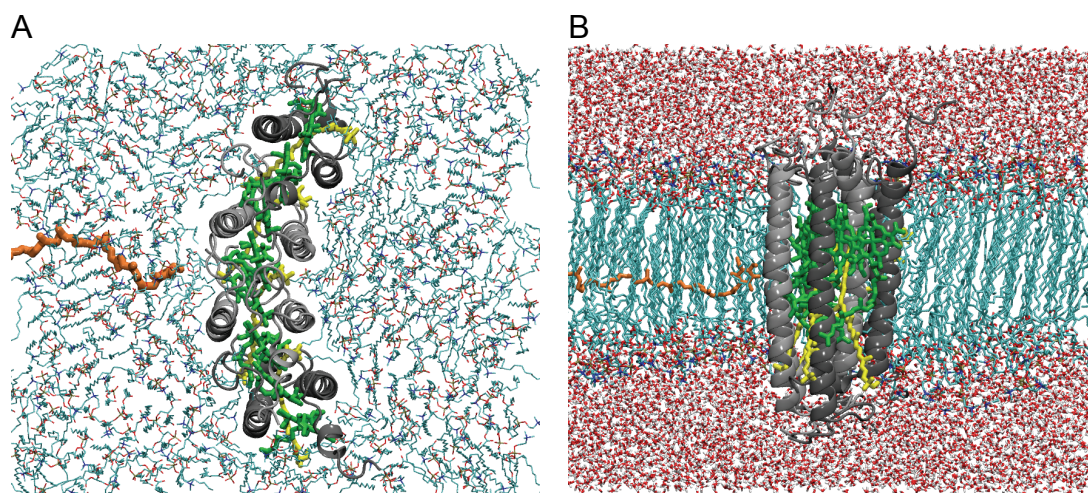


Abb. 4.14

Modellsystem bestehend aus vier $\alpha\beta$ -Untereinheiten mit den zugehörigen Pigmenten. Ein Ubichinon-Molekül befindet sich vor dem LH1-Ring im hydrophoben Bereich der Membran. (A) Aufsicht, (B) Seitenansicht.

Resultierend erhält man ein Simulationssystem, das in **Abb. 4.14** gezeigt wird. Falls nicht entsprechend anders vermerkt, wird nachstehende Farbkodierung für alle folgenden Abbildungen verwendet. Protein-Atome sind in grau (Cartoon-Darstellung), BChl- bzw. Car-Atome sind in grün bzw. in gelb (Liccorice-Darstellung) eingefärbt. Das Ubichinon ist ebenfalls in Liccorice-Darstellung, aber in orange gezeichnet. Lipid- sowie Wasser-Atome werden bei Bedarf zur besseren Übersicht teilweise nicht dargestellt.

In der Aufsicht sind die vier Protein-Untereinheiten ($\alpha\beta$) mit den entsprechenden Pigmenten zu sehen (**Abb. 4.14A**). Das Ubichinon befindet sich auf der Außenseite des LH1-Rings (links von der Proteinstruktur) und ist im hydrophoben Bereich der Membran eingebaut worden (**Abb. 4.14B**). Es wurde darauf geachtet, dass sich sowohl auf der Außen- wie auch auf der Innenseite des LH1-Rings eine ausreichende Anzahl Lipide befindet, um den Diffusions-transport ohne störende Randeﬀekte simulieren zu können.

Die Systemgröße konnte mit diesen Maßnahmen deutlich reduziert werden. Das Gesamtsystem umfasst 82949 Atome. Hiervon entfallen 6940 Atome auf die Protein-untereinheiten, 1641 Atome auf die Pigmente, 31758 Atome auf die Lipide, 42606 Atome auf die Wassermoleküle und 4 Atome auf Ionen. Das System besitzt eine rechtwinklige Einheitszelle mit den Ausmaßen $115\text{\AA} \times 105\text{\AA} \times 87\text{\AA}$. Zur Gewährleistung der Stabilität der Gesamtstruktur, die hier nicht mehr durch den kompletten Ring gegeben ist, wurde auf das

Proteinrückgrat der Transmembranhelices der zwei äußeren $\alpha\beta$ -Untereinheiten (in **Abb. 4.14** dunkelgrau hervorgehoben) ein harmonischer Constraint mit einer Stärke von 35 pN/Å angelegt. Dieser Constraint war während der Simulation konstant. Der untersuchte Kanal befindet sich zwischen den inneren $\alpha\beta$ -Untereinheiten, an denen der Constraint nicht direkt angelegt war. Alle weiteren Simulationen zur Untersuchung des Transportweges des Ubichinon-Moleküls basieren auf diesem Modellsystem. Aufgrund der beschriebenen Modifikationen des Systems, wurde eine erneute Equilibrierung durchgeführt. Voraussetzung für die Verwendung des „verkleinerten“ Modellsystems ist, dass sich das System im Vergleich zum ganzen LH1-Ring identisch verhält. Es wurden dieselben Simulationsparameter wie in Unterkapitel *Simulation des Kernkomplexes von R. rubrum* verwendet.

Minimierung: Um Überlappungen von Atomen im System zu verhindern, wurde das neue System energieminiert.

Equilibrierung des Lösungsmittels: Das Proteinrückgrat der LH1-Untereinheiten sowie das Ubichinon werden mit einem Constraint der Stärke 70 pN/Å festgehalten und nur die Lipide und Wassermoleküle werden equilibriert. Das System wird von 0 K in einer Temperaturrampe auf 300 K aufgeheizt. Die Simulation erfolgte im NVT-Ensemble. Die Simulationsdauer betrug 250 ps.

Equilibrierung des Gesamtsystems: Der Constraint, der anfänglich auf die Atome der LH1-Untereinheiten und des Ubichinons gewirkt hat, wird auf 0 pN/Å reduziert und das System kann frei equilibrieren. Es wird im NPT-Ensemble bei einer konstanten Temperatur von 300 K und einem konstanten Druck von 1 bar simuliert. Die Simulationsdauer betrug 5 ns.

4.4.2. Ergebnisse und Diskussion

Abb. 4.15 gibt eine Übersicht der Ergebnisse der Equilibrierung. Innerhalb der letzten 2 ns der Simulation sind die Systemgrößen Gesamtenergie, Temperatur sowie das Volumen des Systems (**Abb. 4.15A-C**) stabil.

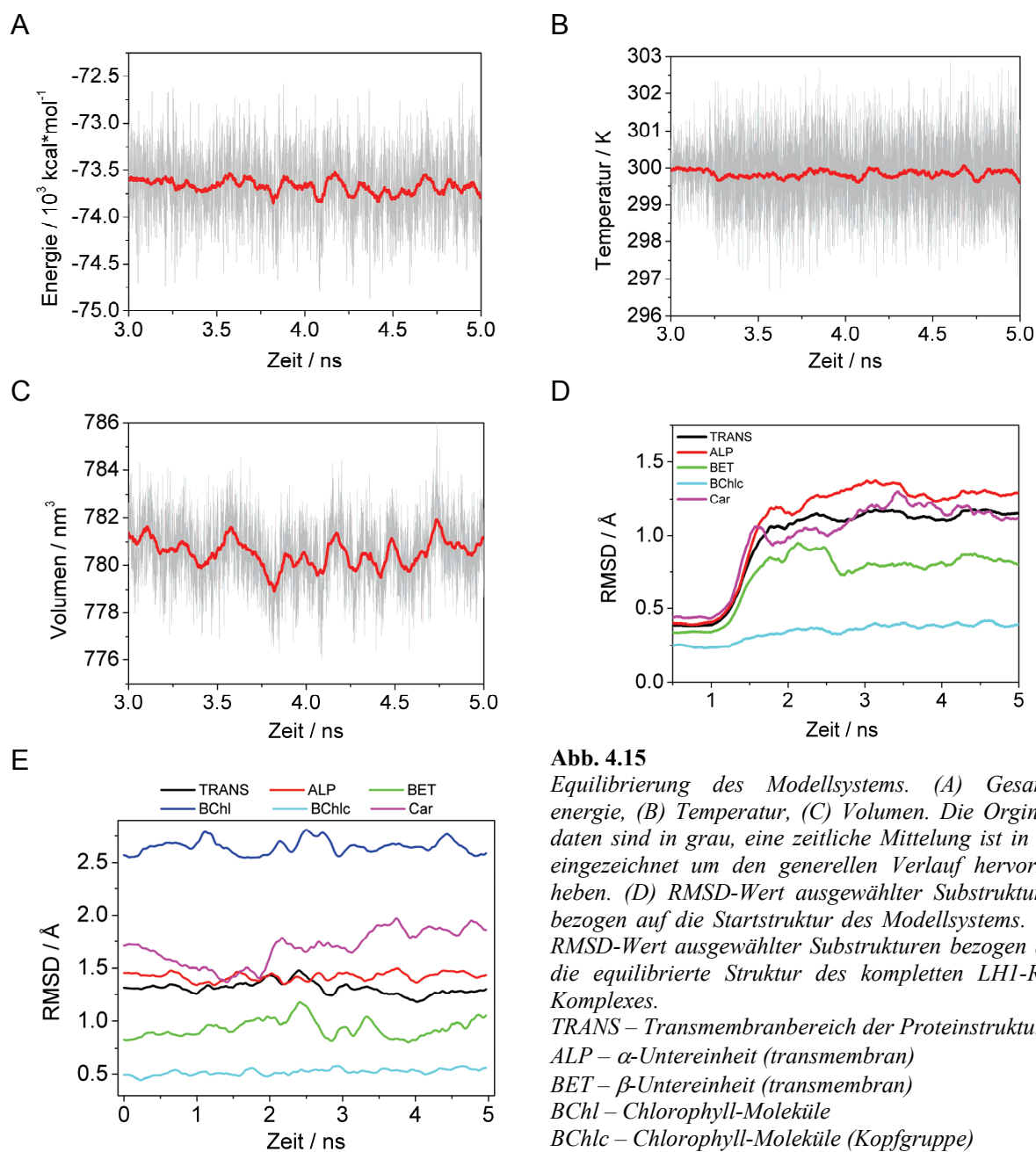


Abb. 4.15

Equilibration des Modellsystems. (A) Gesamtenergie, (B) Temperatur, (C) Volumen. Die Originaldaten sind in grau, eine zeitliche Mittelung ist in rot eingezeichnet um den generellen Verlauf hervorzuheben. (D) RMSD-Wert ausgewählter Substrukturen bezogen auf die Startstruktur des Modellsystems. (E) RMSD-Wert ausgewählter Substrukturen bezogen auf die equilibrierte Struktur des kompletten LHI-RC-Komplexes.

TRANS – Transmembranbereich der Proteinstruktur

ALP – α -Untereinheit (transmembran)

BET – β -Untereinheit (transmembran)

BChl – Chlorophyll-Moleküle

BChlc – Chlorophyll-Moleküle (Kopfgruppe)

Car – Carotinoid-Moleküle

Abb. 4.15D zeigt die strukturelle Abweichung verschiedener Substrukturen bezogen auf die Startstruktur der Simulation. Der Transmembranbereich der Protein-Untereinheiten (schwarz), sowie die α - (rot) und β -Untereinheit (grün) zeigen zu Beginn der Simulation nur kleine Abweichungen von der Startstruktur; die RMSD-Werten liegen unterhalb 1.5 Å. Für die Chlorophyll- (cyan) sowie Carotinoid-Moleküle (magenta) ergibt sich ein ähnlicher Verlauf der RMSD-Werte. Alle betrachteten Substrukturen sind nach ca. 2 ns wieder stabil. Die Änderungen sind auf das erneute Einbauen in die Doppellipidschicht und die anschließende Solvatisierung zurückzuführen.

In **Abb. 4.15E** ist als Referenzstruktur die Struktur des equilibrierten LH1-Rings aus der Simulation des LH1-RC-Komplexes verwendet worden (Unterkapitel *Simulation des Kernkomplexes von R. rubrum*). Durch Verwendung dieser Referenzstruktur erhält man die strukturelle Abweichung bezogen auf den kompletten LH1-Ring. Keine der betrachteten Substrukturen zeigt eine sichtbare Veränderung der strukturellen Abweichung.

Diese Simulation hat gezeigt, dass das „Extrahieren“ eines Minimalsystems aus der kompletten Kernkomplexstruktur zu keiner großen Veränderung in der strukturellen Dynamik des Systems führt. Das gewählte Modellsystem weicht nur geringfügig von der equilibrierten Struktur des LH1-RC-Systems ab und kann somit als Minimalsystem für die weiteren Simulationen verwendet werden; unter anderem zur Untersuchung eines möglichen Pfades, über den das Ubichinon durch den LH1-Ring diffundieren kann.

4.5. Voruntersuchung zur Ubichinon-Diffusion durch den LH1-Ring

In einem ersten Versuch wurde das Ubichinon-Molekül mit dem Kopf voran zwischen zwei $\alpha\beta$ -Untereinheiten durch den LH1-Ring gezogen. Die Bewegung des Ubichinons wurde mittels SMD durch eine externe Kraft beschleunigt. Ziel dieser Simulation war es, die Machbarkeit einer möglichen Diffusion des Ubichinons durch den LH1-Ring zu untersuchen. Die zentrale Frage war, inwieweit ein Durchziehen des Ubichinon-Moleküls die Struktur der Pigment-Protein-Barriere (LH1) verändert. Als Startstruktur kam die equilibrierte Struktur des Modellsystems zum Einsatz.

4.5.1. Simulationssystem und Simulationsparameter

Das Ubichinon befand sich, wie im Unterkapitel *Modellsystem* beschrieben, auf der Außenseite des LH1-Rings mit der Kopfgruppe in Richtung des LH1-Rings (**Abb. 4.16A**). Die Kopfgruppe ist in rot eingefärbt. Die externe Kraft wurde am Schwerpunkt des Ubichinon-Kopfes angelegt und das Ubichinon wurde komplett durch das Ringsegment gezogen. Am Ende der Simulation befand es sich auf der Innenseite der Proteinstruktur (**Abb. 4.16B**). Eine zeitliche Abfolge der SMD-Simulation zeigt **Abb. 4.16C-F**.

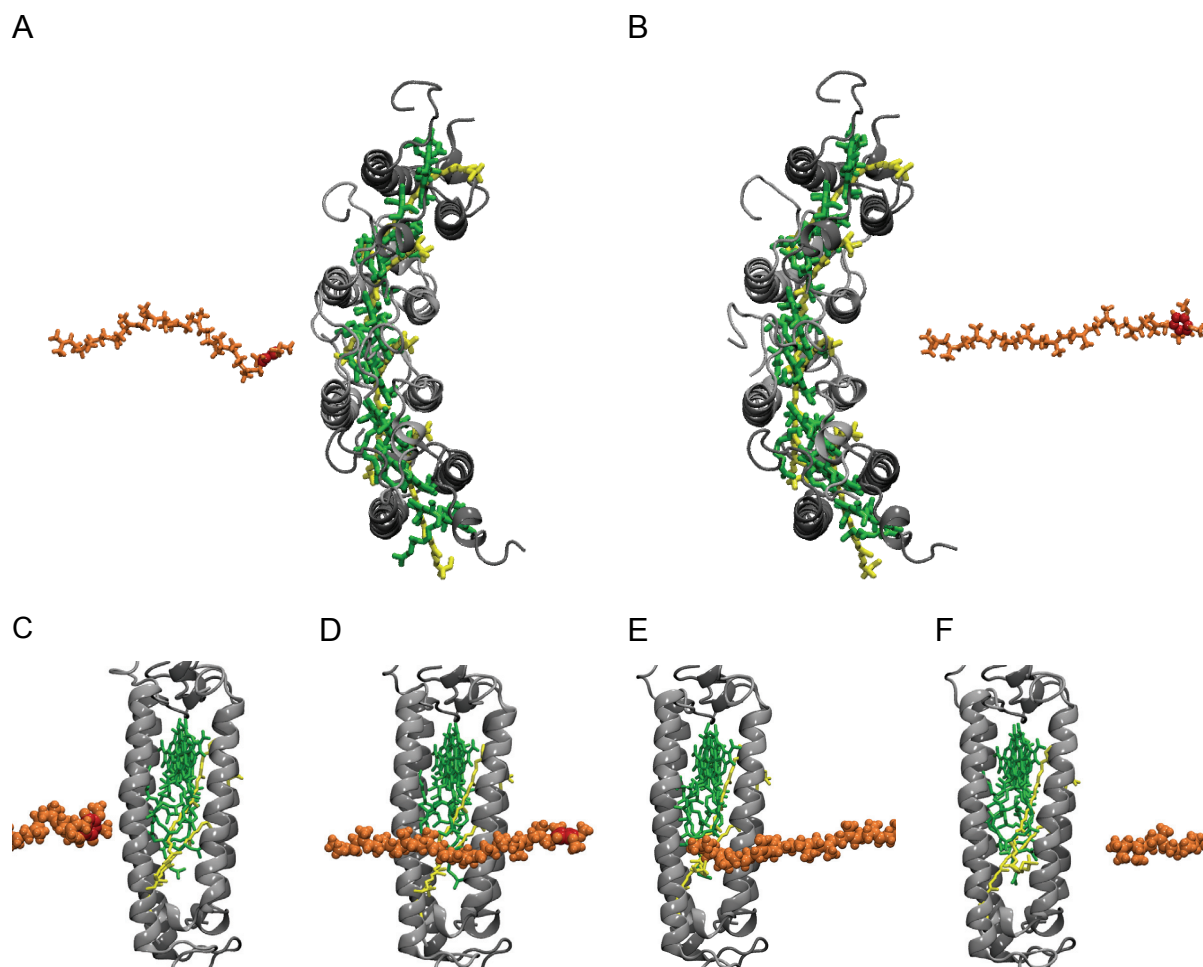


Abb. 4.16

Das Ubichinon wird Kopf voran durch die Pigment-Protein-Barriere gezogen. Die Kopfgruppe des Ubichinon, an die die externe Kraft des SMD-Potentials angelegt wurde, ist rot hervorgehoben. (A) und (B) Aufsicht auf das System vor bzw. nach der Simulation. (C)-(F) Seitenansicht auf das System. Die Bilder zeigen eine zeitliche Abfolge der Simulation. Am Anfang befindet sich das Ubichinon auf der Außenseite des LH1-Rings (links) (C), am Ende ist es komplett durch den LH1-Ring auf die Innenseite gezogen worden (F). Lipide, Wasser und Teile der Pigment-Protein-Struktur sind zur besseren Übersicht nicht eingezeichnet. Gezeigt ist ein Querschnitt durch die Mitte der vier $\alpha\beta$ -Untereinheiten.

Besonderes Augenmerk wurde auf die externe Kraft sowie auf die strukturellen Abweichungen der beteiligten Substrukturen, wie den Chlorophyll-Molekülen, den α - bzw. β -Untereinheiten des LH1-Rings oder den Carotinoid-Molekülen, gelegt. Als Referenzstruktur diente die Startstruktur des Kernkomplexes. Die Simulationsdauer betrug insgesamt 9 ns und die verwendete SMD-Geschwindigkeit lag bei 10 Å/ns. Die Kraftkonstante der Feder betrug 500 pN/Å. Alle weiteren Simulationsparameter entsprechen den Simulationsparametern aus Unterkapitel *Modellsystem*.

4.5.2. Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse dieser SMD-Simulation sind in der **Abb. 4.17** zusammengestellt. Gezeigt werden nur die externe Kraft sowie die strukturelle Abweichung der Substrukturen des Systems; alle weiteren Systemgrößen zeigten keine Auffälligkeiten. In **Abb. 4.17A** ist der Verlauf der Kraft zu sehen, die aufgebracht werden musste, um das Ubichinon-Molekül durch den LH1-Ring zu ziehen (grau). In rot sieht ist eine geglättete Kraftkurve eingezeichnet, um den generellen Verlauf zu verdeutlichen.

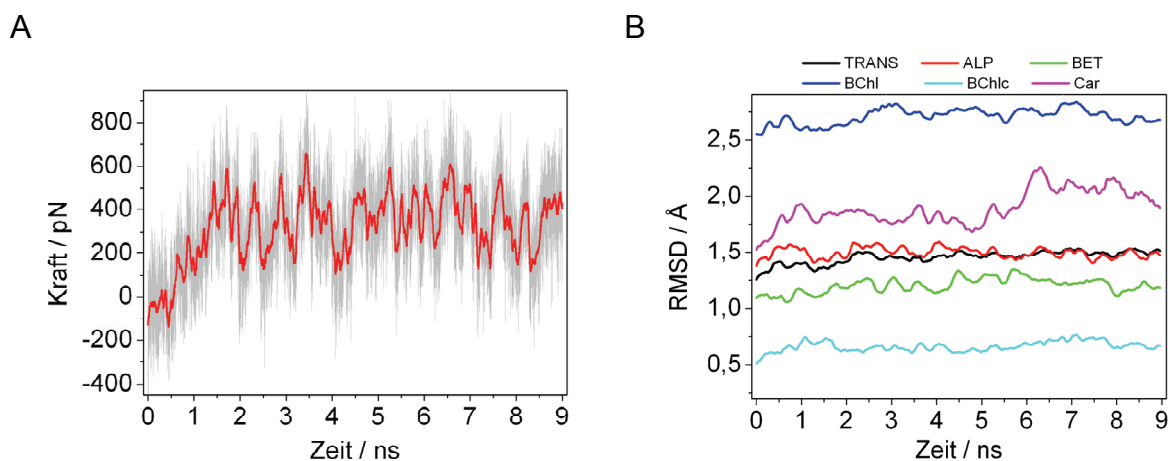


Abb. 4.17

Ergebnis der SMD-Simulation. Das Ubichinon wurde mit dem Kopf voran, von außen nach innen, komplett durch den Ring gezogen. (A) Kraft, (B) Strukturelle Abweichung. RMSD-Wert ausgewählter Substrukturen bezogen auf die equilibrierte Struktur des LH1-RC-Komplexes, TRANS – Transmembranbereich der Proteinstruktur, ALP – α -Untereinheit (transmembran), BET – β -Untereinheit (transmembran), BChl – Chlorophyll-Moleküle, BChlc – Chlorophyll-Moleküle (Kopfgruppe) und Car – Carotinoid-Moleküle.

Zu Beginn der Simulation steigt die Kraft im Mittel auf ca. 500 pN an. Der Kopf des Ubichinons wird in diesem Bereich in den Zwischenraum zweier $\alpha\beta$ -Untereinheiten gezogen. Danach fluktuiert die Kraft um einen Mittelwert von 350 pN bis zum Ende der Simulation. Die Größenordnung der Kraft ist vergleichbar mit der aus anderen SMD-Simulationen kleiner Moleküle unter Verwendung ähnlicher Zuggeschwindigkeiten [99, 100].

Die strukturelle Abweichung des Systems (**Abb. 4.17B**) ist vergleichbar mit der Equilibrierung des Modellsystems. Im Vergleich zur Referenzstruktur des Kernkomplexes, besitzen alle betrachteten Substrukturen stabile RMSD-Werte. Lediglich der RMSD-Wert der Car-Moleküle steigt zum Ende der Simulation leicht an. Die RMSD-Daten sowie eine visuelle Inspektion der Struktur zeigen, dass keine merklichen strukturellen Veränderungen des Systems auftreten. Das Ubichinon kann ohne Zerstörung der Protein- bzw. Pigmentstruktur mit moderaten Kräften durch den LH1-Ring gezogen werden. Im Folgenden soll der Pfad durch die $\alpha\beta$ -Untereinheiten des LH1-Rings näher untersucht und charakterisiert werden.

4.6. Identifizierung eines möglichen Pfades durch den LH1-Ring

Zur Identifizierung eines möglichen Pfades des Ubichinons durch den LH1-Ring und dessen genauere Untersuchung wurden zwei Modellsysteme aufgesetzt, in denen das Ubichinon bereits zur Hälfte durch den Ring gezogen war. Während in dem einen Modellsystem der Kopf des Ubichinons auf der Innenseite des LH1-Rings positioniert war (System 1), befand sich im zweiten Modellsystem die Kopfgruppe des Ubichinons auf der Außenseite des LH1-Rings (System 2). Anstelle des gesamten LH1-Rings wurden wiederum nur vier $\alpha\beta$ -Untereinheiten eingesetzt. Diese Modellsysteme waren der Ausgangspunkt für zwei Simulationen, in denen das Ubichinon aus dem LH1-Ring gezogen wurde – einmal von innen nach außen und von außen nach innen. Aus den erhaltenen Daten wurde der Pfad des Ubichinons durch den LH1-Ring ermittelt.

4.6.1. Simulationssystem und Simulationsparameter

Das Ubichinon-Molekül liegt in einer gestreckten Konformation im LH1-Ring, so dass sich der Kopf und der Schwanz des Moleküls auf unterschiedlichen Seiten des LH1-Rings befinden. Die zwei Modellsysteme sind in **Abb. 4.18** dargestellt und werden im Folgenden mit System 1 (blau) und System 2 (rot) bezeichnet. Die fehlenden Segmente des LH1-Rings sind als gestrichelte Linie angedeutet.

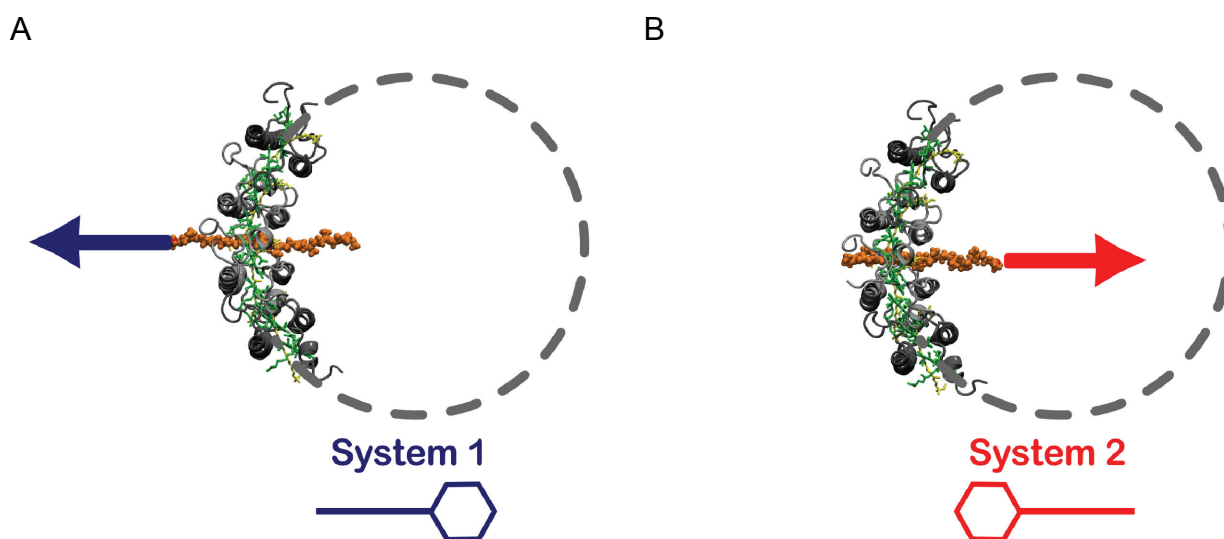


Abb. 4.18

Das Ubichinon ist im LH1-Ring mit unterschiedlicher Orientierung eingebaut. Die fehlenden Segmente des LH1-Rings sind als gestrichelte Linie angedeutet. Die Kopfgruppe des Ubichinons ist rot angefärbt. (A) System 1 (blau) – Kopfgruppe des Ubichinons sitzt auf der Innenseite des LH1-Rings. (B) System 2 (rot) – Kopfgruppe des Ubichinons sitzt auf der Außenseite des LH1-Rings.

In System 1 (**Abb. 4.18A**) befindet sich die Kopfgruppe des Ubichinons auf der Innenseite und der Schwanz des Ubichinons auf der Außenseite der Proteinstruktur. In System 2 (**Abb. 4.18B**) sitzt das Ubichinon-Molekül umgekehrt im LH1-Ring. Hier befinden sich die Kopfgruppe auf der Außenseite und der Schwanz auf der Innenseite der LH1-Struktur. An diesen beiden Systemen wurden SMD-Simulationen durchgeführt, um Informationen über einen möglichen Pfad durch die Pigment-Protein-Barriere zu erhalten. Die Kopfgruppe des Ubichinons ist der Teil des Moleküls, der das größte Volumen einnimmt, und so bei der Diffusion durch den LH1-Ring den größten Einfluss haben wird. In der SMD-Simulation, die in Unterkapitel *Voruntersuchung zur Ubichinon-Diffusion durch den LH1-Ring* vorgestellt wurde, lag die externe Kraft am Schwerpunkt der Kopfgruppe an. Im jetzigen Fall wird am Schwanz des Ubichinons gezogen und verfolgt, welchen Pfad die Kopfgruppe durch die Pigment-Protein-Barriere nimmt. Diese Simulation erfolgt in beiden Richtungen – von außen nach innen und von innen nach außen. Im Anschluss sollen anhand der Daten aus beiden unabhängig voneinander durchgeführten Simulationen Aussagen über den genauen Pfad des Moleküls gemacht werden.

Die Kraft wurde am Schwerpunkt der terminalen C-Atome der endständigen Isoprenoid-Gruppe angelegt (Pfeil in **Abb. 4.18**). Die Kraftkonstante betrug 500 pN/\AA und die SMD-Geschwindigkeit 10 \AA/ns . Alle weiteren Simulationsparameter entsprechen den Simulationsparametern aus Unterkapitel *Modellsystem*. Im Gegensatz zu vorheriger Simulation (Unterkapitel *Voruntersuchung zur Ubichinon-Diffusion durch den LH1-Ring*), ist in diesem Fall der Kopf frei beweglich und wird durch Ziehen am Schwanz durch den LH1-Ring geführt. Damit kann sich der Kopf, der das größte Hindernis darstellt, einen Weg durch den LH1-Ring suchen. Das Ubichinon-Molekül selbst besitzt zusätzlich eine gewisse Flexibilität, die zusammen mit dem harmonischen Zugpotential, angelegt am Schwanz des Ubichinons, eine maximale Bewegungsfreiheit der Ubichinon-Kopfgruppe gewährleistet.

4.6.2. Ergebnisse und Diskussion

Eine Übersicht der wichtigen Ergebnisse für System 1 zeigt **Abb. 4.19**. Die Kraftkurve ist in grau, eine geglättete Kurve der Daten in rot gezeichnet (**Abb. 4.19A**). Der Verlauf der Kraft ähnelt dem, der SMD-Simulation in Unterkapitel *Voruntersuchung zur Ubichinon-Diffusion durch den LH1-Ring*. Im Mittel (rot) fluktuiert auch hier die Kraft um ca. 300 pN . Innerhalb der ersten Nanosekunde steigt die Kraft sukzessive an. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass das Ubichinon-Molekül zu Beginn der Simulation nicht komplett gestreckt

vorlag und sich dadurch die Ubichinon-Kopfgruppe erst nach einer bestimmten Simulationsdauer bewegt.

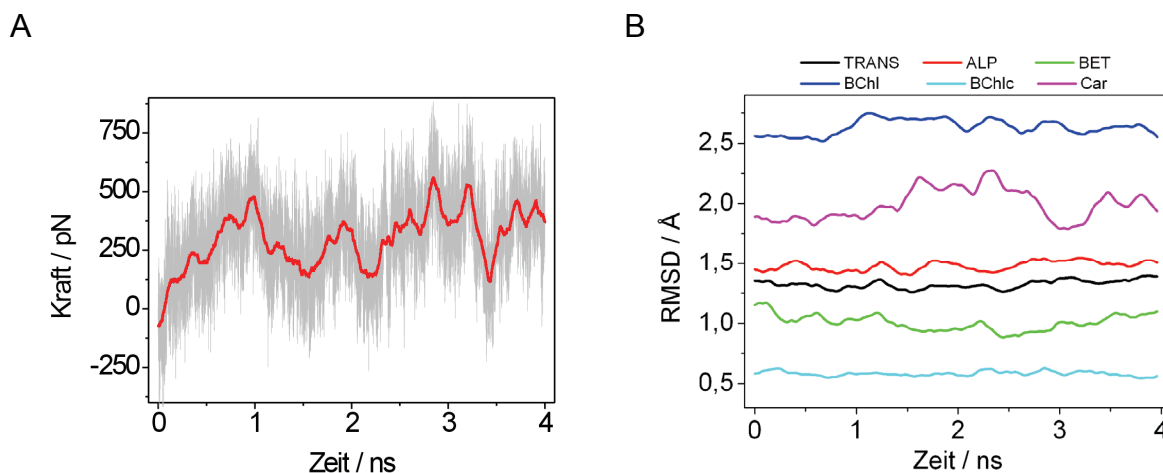


Abb. 4.19

SMD-Simulation zur Ermittlung eines Pfades durch den LH1-Ring im System I. (A) Kraft (B) RMSD-Wert ausgewählter Substrukturen bezogen auf die equilibrierte Struktur des LH1-RC-Komplexes. TRANS – Transmembranbereich der Proteinstruktur, ALP – α -Untereinheit (transmembran), BET – β -Untereinheit (transmembran), BChl – Chlorophyll-Moleküle, BChlc – Chlorophyll-Moleküle (Kopfgruppe) und Car – Carotinoid-Moleküle.

Im Vergleich zur equilibrierten Struktur des Kernkomplexes behalten alle betrachteten Substrukturen während der Simulation stabile RMSD-Werte (**Abb. 4.19B**). Das Protein (schwarze Kurve) zeigt nur sehr geringe strukturelle Abweichungen. Dies ist sowohl in der α -Untereinheit (rote Kurve), wie auch der β -Untereinheit (grüne Kurve) zu sehen. Der RMSD-Wert der Carotinoid-Moleküle (Kurve in magenta) zeigt im Vergleich zu den anderen Strukturen leicht erhöhte Fluktuationen entlang der Trajektorie. Dieses Verhalten der Carotinoide konnte bereits in der Equilibrierungsphase des Kernkomplexes gesehen werden und deutet deshalb auf ein generelles Verhalten der Carotinoid-Moleküle hin. Die BChl-Moleküle (blaue Kurve) zeigen im Vergleich zu den anderen Substrukturen die größte Abweichung von der Referenzstruktur. Hierfür sind die BChl-Schwänze verantwortlich, die im Zwischenraum der Protein-Untereinheiten liegen und zusammen mit den Car-Molekülen diesen Bereich ausfüllen. Die Flexibilität bzw. die dynamischen Umlagerungen dieser Teile der Struktur ermöglichen es dem Ubichinon-Molekül durch den LH1-Ring zu diffundieren. Die Kopfgruppen der Chlorophyll-Moleküle (Kurve in cyan) sind stabil in die Protein-Untereinheiten eingebaut und zeigen nur eine sehr geringe strukturelle Abweichung.

Eine visuelle Inspektion der Struktur bestätigt diese Ergebnisse; es kam während der Simulation zu keiner merklichen strukturellen Veränderung des Systems. Die Daten der

Simulation aus System 2 ergeben einen sehr ähnlichen Verlauf der untersuchten Größen und werden daher nicht explizit gezeigt.

Um den gewählten Weg der Ubichinon-Kopfgruppe genauer zu untersuchen, wurde er zu verschiedenen Zeitpunkten entlang der Trajektorie visuell rekonstruiert. Dies erfolgte für beide Simulationssysteme (System 1 und 2) und ist in **Abb. 4.20** zu sehen. In blau sind Momentaufnahmen der Kopfgruppe für das System 1, in rot für das System 2 gezeigt. Auf Wasser- Lipid-, sowie einige Protein- und Pigmentatome wurden der Übersicht wegen in **Abb. 4.20** verzichtet. Der Pfad des Ubichinons führt zwischen den Chlorophyll-Schwänzen und den Carotinoiden durch die Protein-Untereinheiten des LH1-Rings hindurch.

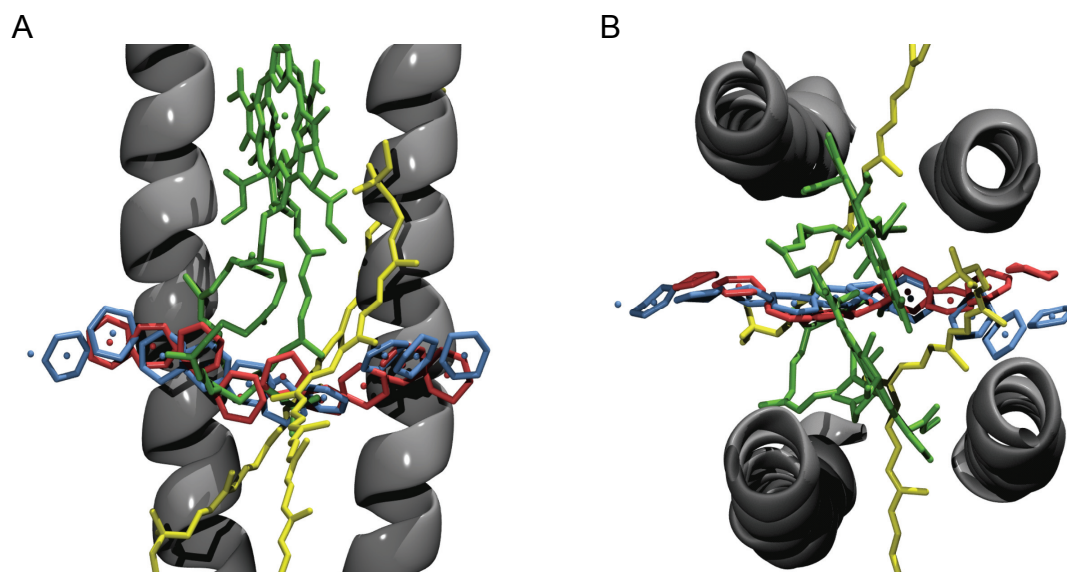


Abb. 4.20

Möglicher Pfad der Ubichinon-Kopfgruppe durch den LH1-Ring. (A) Seitenansicht, (B) Aufsicht. Momentaufnahmen der Kopfgruppe der Simulation von System 1 sind in blau, für System 2 in rot dargestellt. Zu sehen ist jeweils der Schwerpunkt der Kopfgruppe (Kugel), sowie der Kohlenstoff-Sechsring. Lipide, Wassermoleküle sowie Teile des Proteins und der Pigmente sind der Übersicht wegen nicht eingezeichnet.

Sowohl die Seitenansicht (**Abb. 4.20A**) als auch die Aufsicht (**Abb. 4.20B**) zeigen für beide Richtungen einen sehr ähnlichen Pfad, den die Kopfgruppe des Ubichinons durch den LH1-Ring nimmt. Dies ist auf die dichte Struktur des LH1-Rings, bestehend aus Chlorophyll-Molekülen, Carotinoide und dem Proteingerüst zurückzuführen, wodurch der Raum für eine mögliche Diffusion eingeschränkt ist. In der Aufsicht ist eine Abweichung an der Innenseite des LH1-Segments zu sehen (rechts); dort stimmen die Momentaufnahmen von Vorwärts- und Rückwärtsrichtung (bzw. System 1 und 2) nicht genau überein. Diese Abweichung kann auf die Systempräparation zurückgeführt werden; durch längere Equilibrierungsphasen oder eine langsamere Zuggeschwindigkeit lässt sich wahrscheinlich auch in diesem Bereich des Systems eine bessere Übereinstimmung erreichen.

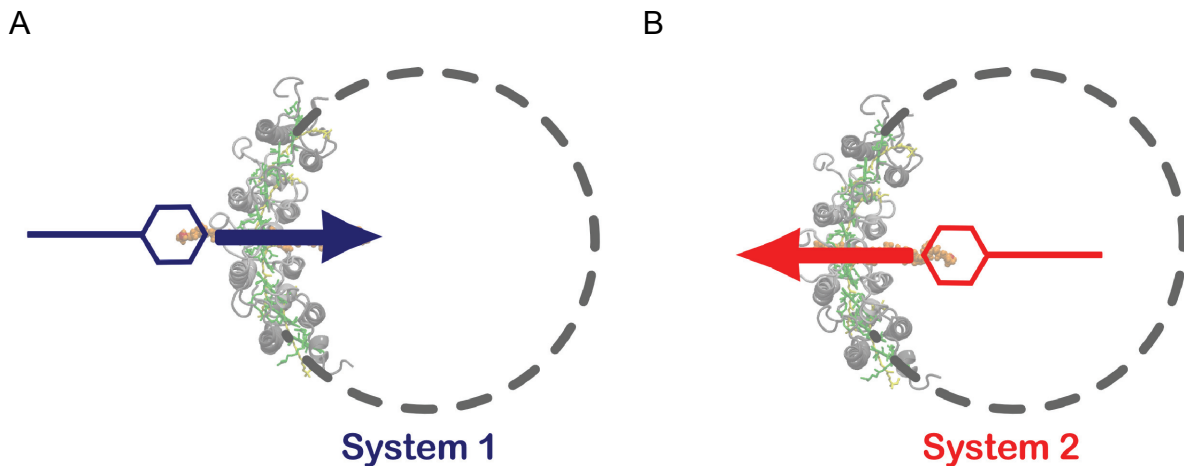
Im Folgenden soll der gefundene Pfad näher untersucht und ein Profil der Freien Energie entlang des Weges erstellt werden.

4.7. Rekonstruktion des Potentials entlang der Reaktionskoordinate

Um quantitative Aussagen über einen Diffusionsprozess entlang des Pfades machen zu können, muss das Freie Energieprofil entlang des Pfades (PMF) bekannt sein. Dabei beschränkt sich die Betrachtung auf die Kopfgruppe des Ubichinons. Sie stellt das größte Hindernis bei einer Diffusion durch den LH1-Ring dar und wird dementsprechend den größten Beitrag zum PMF liefern. Zur Bestimmung des PMF werden SMD-Simulationen herangezogen, die die Ubichinon-Kopfgruppe entlang des zuvor ermittelten Pfades durch den LH1-Ring ziehen. Aufgrund der erwarteten langsamen Diffusionszeit (das Ubichinon benötigt für dieselbe Strecke ohne Potential bereits mehr als 100 ns) ist eine Simulation im Gleichgewicht nicht möglich; das Ubichinon-Molekül wird beschleunigt entlang des Pfades bewegt. Aufgrund der Beschleunigung des Prozesses befindet sich das System im Nicht-Gleichgewicht, d.h. nicht die gesamte Arbeit, die über das SMD-Potential ins System fließt, wird für die Überwindung des Potentials der Pigment-Protein-Barriere verwendet. Es entsteht Dissipation; also Arbeit, die an das Wärmebad abgegeben wird und somit verloren geht. Zu einer Rekonstruktion des PMFs benötigt man daher eine Reihe von Trajektorien, gekoppelt mit einer statistischen Auswertung, um die Gleichgewichtsgröße (Potentialänderung ΔG) aus den Nichtgleichgewichtsdaten (investierte Arbeit W) zu extrahieren.

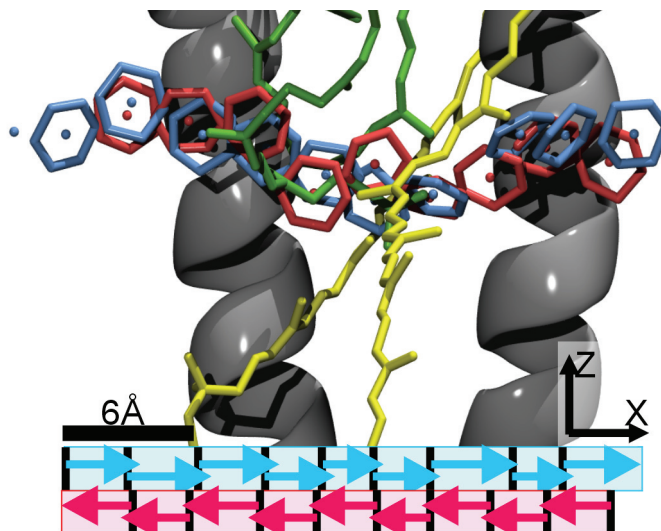
4.7.1. Simulationssystem und Simulationsparameter

Das PMF wurde für beide Simulationsrichtungen (System 1 und 2) unabhängig voneinander berechnet. Zu diesem Zweck mussten beide Simulationssysteme modifiziert werden, was in **Abb. 4.21** schematisch dargestellt ist. In System 1 (**Abb. 4.21A**) ist das Ubichinon von außen durch den LH1-Ring auf die Innenseite gezogen worden, in System 2 (**Abb. 4.21B**) von innen nach außen; in beiden Fällen lag die externe Kraft nun am Schwerpunkt der Kopfgruppe an. Die Ubichinon-Moleküle sind schematisch in blau bzw. rot eingezeichnet, das Sechseck repräsentiert die Kopfgruppe.

**Abb. 4.21**

Schematische Darstellung der beiden Systeme zur Rekonstruktion des Profils der Freien Energie. Die Ubichinon-Moleküle sind schematisch in blau bzw. rot eingezeichnet, das Sechseck repräsentiert die Kopfgruppe. Der LH1-Ring ist durch einen gestrichelten Kreis angedeutet und das simulierte Pigment-Protein-Segment des Modellsystems ist transparent im Hintergrund eingezeichnet. Die Zugrichtung ist als Pfeil dargestellt. (A) System 1 = Vorwärtsrichtung, (B) System 2 = Rückwärtsrichtung.

Um das System während der Simulation möglichst nahe am Gleichgewicht zu halten, sind beide möglichen Pfade (System 1 und 2) in mehrere Sektionen zerlegt. Ein seitlicher Schnitt durch das Modellsystem verdeutlicht die Einteilung und ist in Abb. 4.22 gezeigt. Zum einen wird, analog zu Abb. 4.20, der Pfad der Kopfgruppe des Ubichinons durch den LH1-Ring für beide Systeme dargestellt, zum anderen wird im unteren Teil der Abbildung die Einteilung in Sektionen, dargestellt durch Pfeile der entsprechenden Farbe, verdeutlicht. Jede Sektion hatte eine Länge von ca. 3 Å.

**Abb. 4.22**

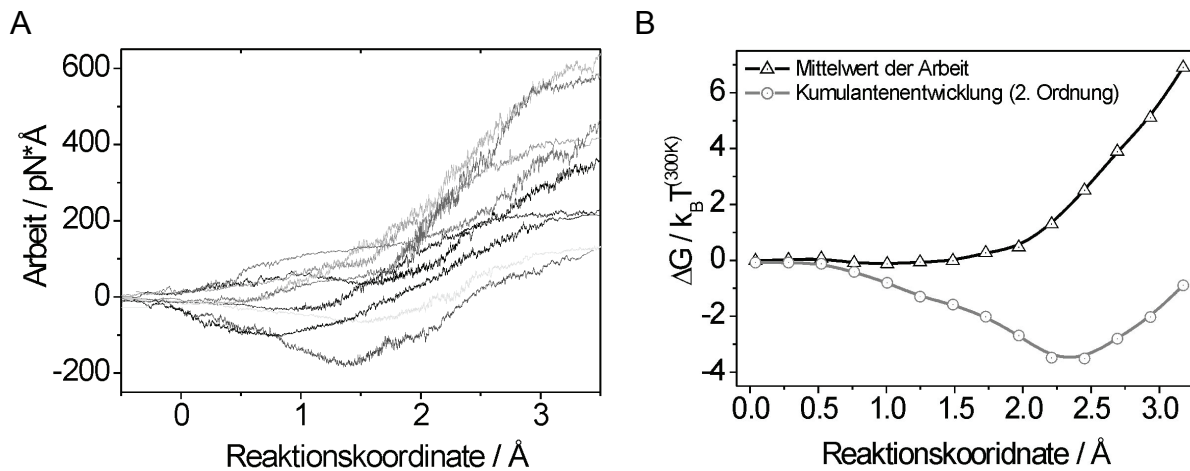
Einteilung des Pfades in Sektionen. Im Pigment-Protein-Gerüst eingezeichnet ist der Pfad der Kopfgruppe des Ubichinons für beide Systeme. Die Darstellung ist analog zu Abb. 4.20. Im unteren Teil der Abbildung sind zusätzlich die einzelnen Sektionen eingezeichnet. Sie werden durch die Pfeile in der entsprechenden Farbe repräsentiert.

In MD-Simulationen wurde das Ubichinon-Molekül an den Ausgangspunkten der Sektionen präpariert (Anfang der Pfeile) und die daraus entstehenden 10 neuen Systeme für jede Richtung jeweils 1 ns equilibriert. Der Schwerpunkt der Kopfgruppe des Ubichinon-Moleküls wurde an den vordefinierten Positionen mit einem harmonischen Constraint von 500 pN/Å festgehalten. Die Equilibrierung wurde durchgeführt, um in jeder Sektion aus einem Gleichgewichtszustand des Systems zu starten und damit das System entlang des gesamten Pfades möglichst nahe am Gleichgewicht zu halten.

Aus jeder Simulationen wurde ein Ensemble aus insgesamt 10 zufälligen Startstrukturen extrahiert. An jedem Ensemble wurden SMD-Simulationen durchgeführt, bei denen der Kopf des Ubichinon-Moleküls von seiner Startposition zur nächsten Sektion entlang des Pfades gezogen wurde. Um eine lückenlose Untersuchung des Pfades sicherzustellen, wurden die Sektionen so gewählt, dass sich benachbarte Sektionen teilweise überlappen, d. h. dass das Ende der einen Sektion bereits den Anfang der nachfolgenden Sektion beinhaltet. Die Federkonstante des SMD-Potentials betrug 500 pN/Å und die SMD-Geschwindigkeit 10 Å/ns. Alle weiteren Simulationsparameter entsprachen den Simulationsparametern aus dem Unterkapitel *Modellsystem*.

4.7.2. Ergebnisse und Diskussion

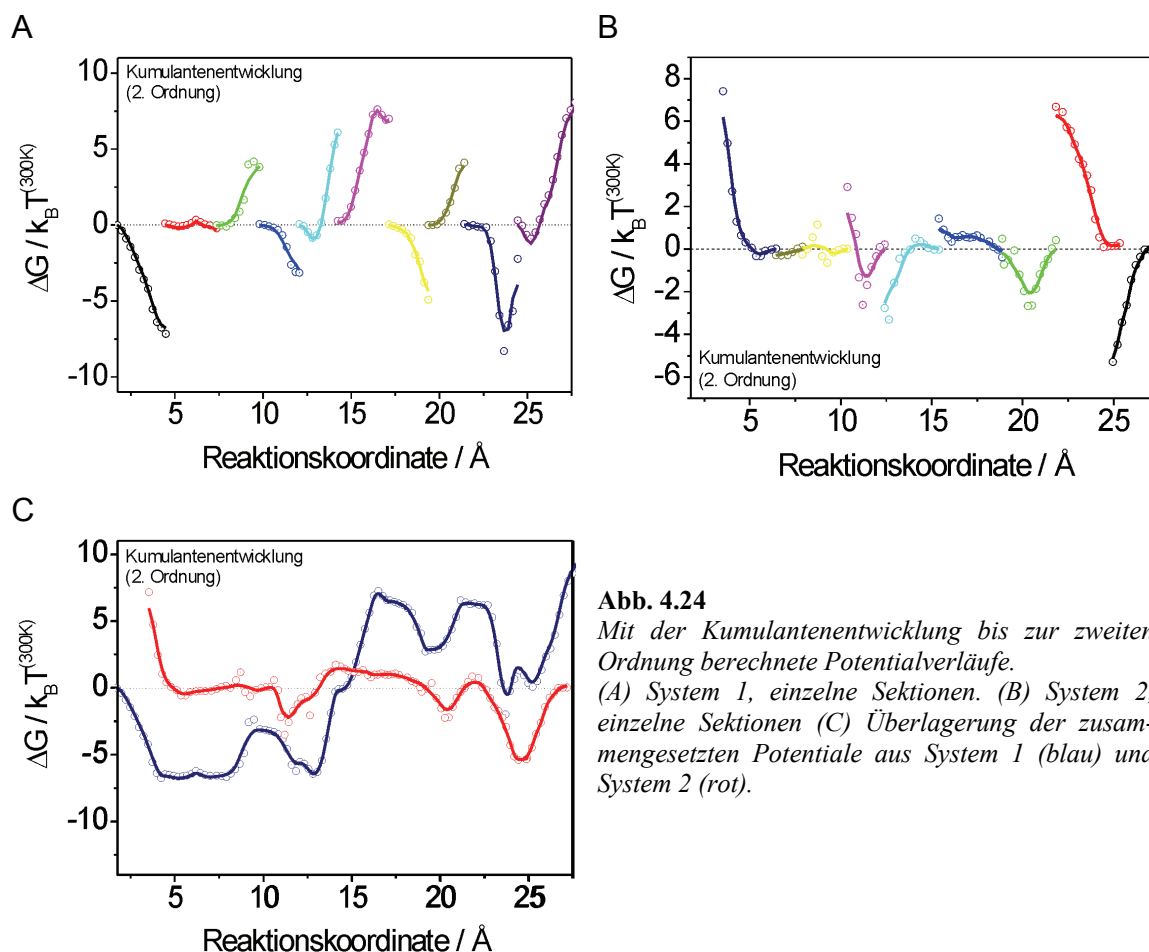
Aus den Daten der SMD-Simulation lassen sich die Position der Kopfgruppe und die Kräfte, die an der Kopfgruppe des Ubichinon-Moleküls angreifen, ermitteln. Aus dieser Kraft kann die Arbeit berechnet werden, die am System verrichtet wurde. Da die Kräfte von Trajektorie zu Trajektorie innerhalb einer Sektion fluktuieren, ergeben sich unterschiedliche Arbeitsprofile. In **Abb. 4.23A** sieht man Arbeitswerte von 10 SMD-Simulationen einer Sektion als Funktion der Reaktionskoordinate.

**Abb. 4.23**

(A) Arbeitswerte aus 10 Trajektorien für eine einzelne Sektion (Sektion 3 aus System 2, Rückwärtsrichtung). (B) Rekonstruiertes Potential aus den 10 Trajektorien). Zur Bestimmung der Freien Energie wurden verschiedene Methoden verwendet. Der Mittelwert der Arbeitswerte ist durch Dreiecke und die Kumulantenentwicklung bis zur zweiten Ordnung durch Kreise dargestellt.

Die Arbeitsprofile sind der Klarheit wegen geglättet dargestellt. Die Streuung der Arbeitswerte entlang der Reaktionskoordinate nimmt zu. Dies bedeutet auch, dass die dissipierte Arbeit zunimmt, während das Ubichinon-Molekül entlang der Reaktionskoordinate gezogen wird. Aus den Arbeitswerten lässt sich die Änderung der Freien Energie entlang der Reaktionskoordinate rekonstruieren. In **Abb. 4.23B** ist das Ergebnis dieser Berechnung für Sektion 3 aus System 2 zu sehen; hier sind die mittlere Arbeit (Dreiecke) sowie die Kumulantenentwicklung bis zur zweiten Ordnung (Kreise) eingezeichnet. Die mittlere Arbeit entspricht nur dann der Änderung der Freien Energie, wenn sich das System zu allen Zeiten im Gleichgewicht befindet - was nicht der Fall ist. Die mittlere Arbeit ist dann $\langle W \rangle > \Delta G$, also immer größer als die Änderung der Freien Energie. Unter der Annahme einer Gaußförmigen Arbeitsverteilung lässt sich das Maß an Dissipation anhand der Breite der Arbeitsverteilung abschätzen. Bis ca. 2 Å ist die dissipierte Arbeit $W_{\text{diss}} < 3 k_{\text{B}}T$ und das System nahe am Gleichgewicht. Am Ende der Sektion ist die dissipierte Arbeit $W_{\text{diss}} < 8 k_{\text{B}}T$ und das System hat sich somit weiter vom Gleichgewicht entfernt. Für alle Sektionen, sowohl für die Vorwärts- als auch für die Rückwärtsrichtung, wurde die Dissipation im Bereich von 0 k_BT bis 5 k_BT für große Teile der Sektionen abgeschätzt. Zum Ende der Sektionen steigt die Dissipation in einigen Sektionen bis auf 10 k_BT an. Wie in Kapitel 2.4.2. *Rekonstruktion des Freien Energieprofils aus SMD-Simulationen* gezeigt, lässt sich für eine geringe Anzahl an Trajektorien ($n = 10$) und der Dissipation ($W_{\text{diss}} \leq 10 k_{\text{B}}T^{(300\text{K})}$) die Änderung der Freien Energie mit der Kumulantenentwicklung bis zur zweiten Ordnung rekonstruieren. Dies erfolgte für beide Richtungen (System 1 und 2) und alle Sektionen entlang des Pfades (**Abb. 4.24A,B**). Die rekonstruierten Potentiale der einzelnen Sektionen wurden unter Berück-

sichtigung, dass alle Potential-Segmente nahtlos aneinander anschließen, zusammengeführt. Dazu wurden die Potentiale benachbarter Sektionen auf der ΔG -Achse entsprechend verschoben. Eine Überlagerung der zusammengesetzten Potentialverläufe aus System 1 und 2 zeigt **Abb. 4.24C**.



In den Abbildungen **Abb. 4.24A,B** ist zu erkennen, dass sich Sektionen mit ansteigendem ΔG und solche mit abnehmendem ΔG die Waage halten. In der Überlagerung der beiden zusammengesetzten Potentialverläufe (**Abb. 4.24C**) sieht man, dass beide Richtungen unterschiedliche Potentialverläufe ergeben. Die maximale Potentialmodulation liegt bei ca. $16 k_B T$. Die Potentialdifferenzen zwischen Anfang und Ende liegen im Bereich von $10 k_B T$ für System 1 bzw. $7 k_B T$ für System 2.

Die Kumulantenentwicklung bis zur zweiten Ordnung führt zu keinem zufriedenstellenden Ergebnis, da der Potentialverlauf zwei grundsätzliche Eigenschaften des Potentials nicht wiedergeben kann.

i) Die Potentialverläufe ergeben keine Übereinstimmung zwischen Vor- und Rückwärtsrichtung (System 1 und 2). Wenn aber Wechselwirkungen der Kopfgruppe des Ubichinon-

Moleküls das Potential maßgeblich beeinflussen und in beiden Systemen derselbe Pfad untersucht wurde, sollten die Potentiale in beiden Systemen übereinstimmen ii) Darüber hinaus wäre zu erwarten, dass das Potential auf beiden Seiten des LH1-Rings nahezu denselben Wert annimmt, da es für den Kopf des Ubichinon-Moleküls in Bezug auf die Änderung der Freien Energie gleichbedeutend ist, ob er sich vor oder hinter der Proteinbarriere in der Doppellipidschicht befindet. Dies ist in beiden Systemen nicht erfüllt.

4.8. Bestimmung des entropischen Beitrags durch Streckung des Ubichinons

Bei genauerer Betrachtung einzelner Trajektorien aus verschiedenen Sektionen, insbesondere bei der Betrachtung der Struktur des Ubichinon-Moleküls fallen zwei Punkte auf. Erstens besitzt das Ubichinon-Molekül in den einzelnen Sektionen nicht immer dieselbe Struktur, sondern ist unterschiedlich stark gestreckt bzw. geknäult. Zweitens wird es während den SMD-Simulationen gestreckt. Die zusätzliche Arbeit, die mit diesem Strecken einhergeht, muss bei der Rekonstruktion des Potentials berücksichtigt werden. Mit Hilfe von zwei weiteren Simulationen wird das Potential der Streckung des Ubichinon-Moleküls bestimmt. In einer ersten Simulation wurde das Ubichinon-Molekül aus einem equilibrierten, geknäulten Zustand (Abb. 4.25A) in einen völlig gestreckten Zustand überführt (Abb. 4.25B). Die zweite Simulation führte aus diesem gestreckten Zustand zurück in eine geknäulte Konformation des Ubichinon-Moleküls.

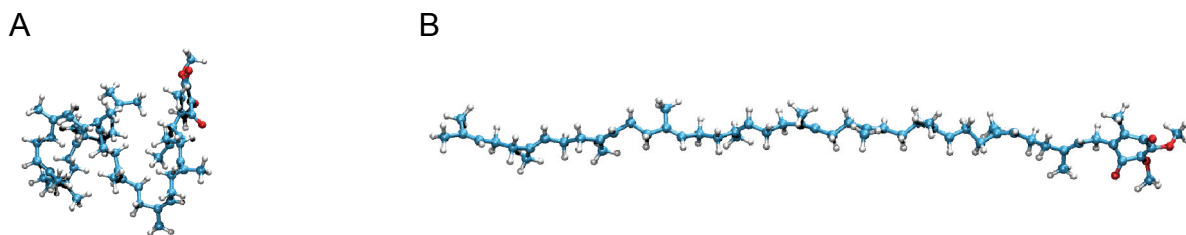


Abb. 4.25

Ubichinon-Molekül in Ball and Stick-Darstellung. Gezeigt sind zwei Konformationen. (A) Geknäulte Konformation. (B) Gestreckte Konformation. Die Atome sind entsprechend dem Namen (chemischem Element) eingefärbt.

Die SMD-Simulationen wurden im Vakuum durchgeführt. In beiden Simulationen diente ein harmonischer Constraint mit der Stärke $500 \text{ pN}/\text{Å}$ dazu, den Schwerpunkt der Kopfgruppe zu bewegen, wobei das terminale C-Atom der letzten Isoprenoid-Einheit im Raum fixiert war. Um aus den Simulationsdaten direkt auf das zugrunde liegende Potential schließen zu können, muss sich das System über den gesamten Verlauf der Simulation im Gleichgewicht befinden.

Die Zuggeschwindigkeit betrug aus diesem Grund in beiden Fällen 0.1 \AA/ns , was zu einer Simulationsdauer von ca. 450 ns pro Simulation führte. Während der Simulation werden die Kraft, die notwendig ist, um das Molekül zu strecken, sowie der Abstand zwischen dem Schwerpunkt der Kopfgruppe und dem Schwanzatom des Ubichinon-Moleküls kontinuierlich aufgenommen.

4.8.1. Ergebnisse und Diskussion

Lässt man das Ubichinon-Molekül frei equilibrieren, so liegt es in einer geknäulten Konformation vor. Dabei kann das Ubichinon im equilibrierten Zustand bei Raumtemperatur eine Vielzahl an unterschiedlichen Konformationen einnehmen.

Wird das Ubichinon-Molekül gestreckt, so wird nach und nach die Anzahl der Freiheitsgrade, die dem System zur Verfügung steht, reduziert. Dies geschieht so lange, bis das System in einem komplett gestreckten Zustand vorliegt und ein Minimum an Entropie erreicht hat. Um eine Streckung des Moleküls zu erzielen, muss Arbeit am System verrichtet werden. Die dazugehörige Kraft-Ausdehnungs-Kurve lässt sich mit Hilfe eines Polymer-Modells aus dem Gebiet der statistischen Mechanik approximieren. Das Ubichinon-Molekül kann annähernd als polymerartige Molekülkette aus identischen Isoprenoid-Einheiten angenommen werden. Ein solches System lässt sich mit verschiedenen Polymer-Modellen beschreiben.

Im Folgenden soll kurz auf das *Worm-Like-Chain* (WLC)-Modell eingegangen werden. Dabei handelt es sich um ein Modell, bei dem das Ubichinon-Molekül als homogener Strang mit konstanter Biege-Elastizität angesehen wird [101]. Die eingenommene Konformation wird mathematisch durch eine kontinuierlich gebogene Kurve beschrieben, die bei Unterschreiten einer charakteristischen Längenskala – der Persistenzlänge l_p – als linear angenommen wird. Das bedeutet, dass sich die Richtung des Polymers im Bereich der Persistenzlänge nicht ändert und so eine Aussage über die Steifigkeit des Moleküls möglich ist. Die Persistenzlänge l_p lässt sich nicht direkt mit strukturellen Größen, wie einer kleinsten Einheit im Molekül vergleichen. Die zur Streckung notwendige Kraft lässt sich approximieren [102] zu

$$F(x) = \frac{k_B T}{l_p} \left[\frac{1}{4} \left(1 - \frac{x}{L_c} \right)^{-2} + \frac{x}{L_c} - \frac{1}{4} \right]. \quad (4.2)$$

F ist die zur Streckung notwendige Kraft, k_B die Boltzmannkonstante, T die Temperatur, x der Abstand zwischen Kopfgruppe und Schwanz, L_c die Konturlänge, (Länge des Moleküls im komplett gestreckten Zustand) und l_p die Persistenzlänge. **Abb. 4.26** zeigt den Verlauf der

Kraft-Ausdehnungs-Kurve für die Strecksimulation. Das WLC-Modell ergibt eine Fitkurve (rot), die die Simulationsdaten (schwarz) gut beschreibt. Die ermittelte Persistenzlänge l_p von ca. 3 Å ist kürzer als die Länge der kleinsten strukturellen Einheit des Ubichinon-Moleküls, nämlich einer Isoprenoid-Einheit, die eine Länge von ca. 5 Å besitzt. Die Persistenzlänge macht weniger als 1/15 der Gesamtlänge des Moleküls ($L_c = 53$ Å) aus. Daraus folgt, dass das Ubichinon-Molekül eine Tendenz zu verknäulen besitzt, was in einer MD-Simulation gezeigt werden konnte.

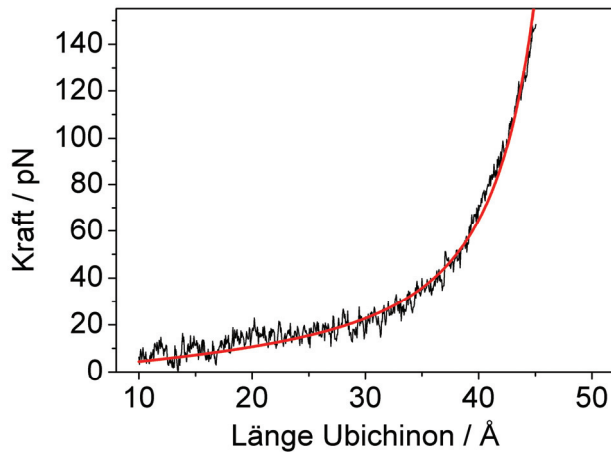
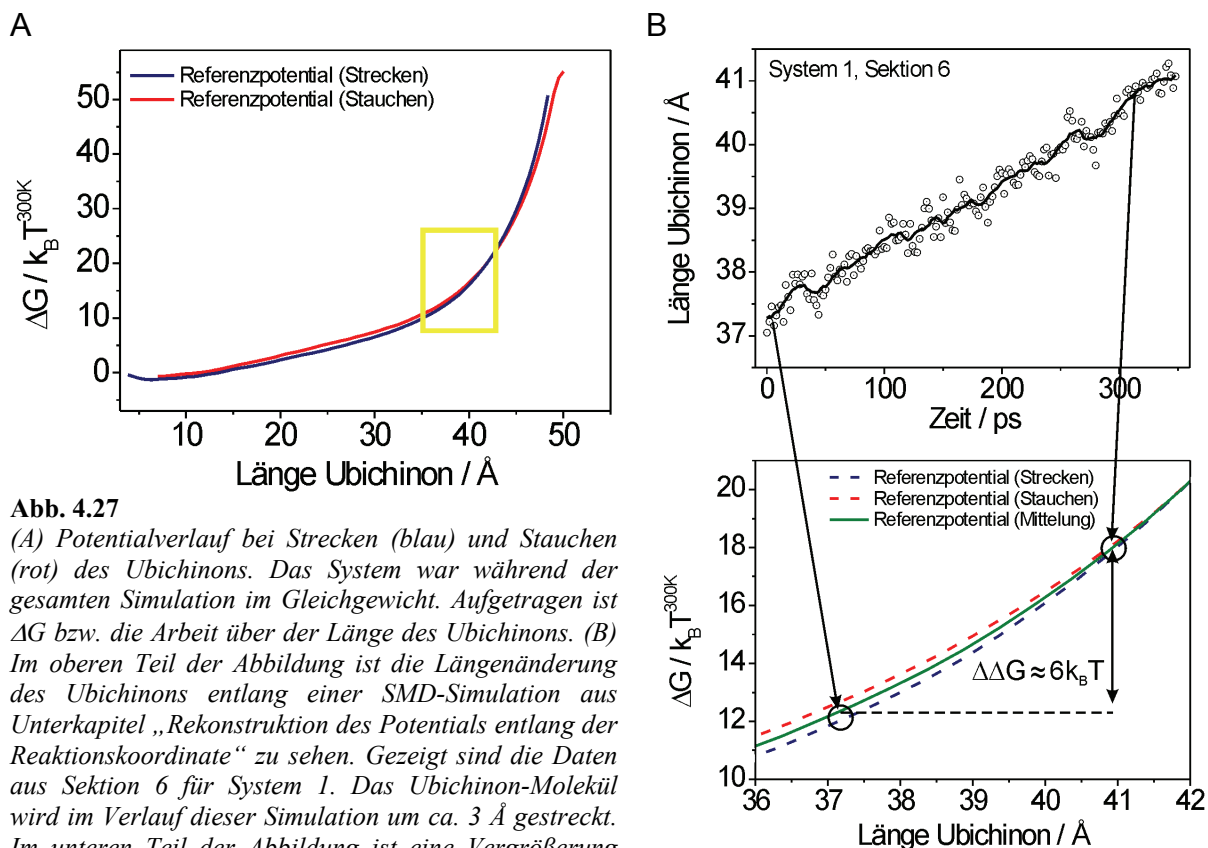


Abb. 4.26

Worm-like-chain-Modell. Gezeigt ist die Kraft-Ausdehnungskurve aus der Simulation, in der das Ubichinon-Molekül aus dem geknäulten in den gestreckten Zustand gezogen wurde. In rot ist der Fit eingezeichnet, der mit dem WLC-Modell berechnet wurde.

vorliegenden Fall erfüllt ist. Der Arbeitsverlauf für den Streckvorgang (blau) deckt sich mit dem Arbeitsverlauf des Stauchvorgangs (rot).

Anhand der Kraft-Ausdehnungskurven lässt sich die Arbeit bestimmen, die für den Streckvorgang am System verrichtet werden muss, bzw. die beim Stauchen frei wird. Die Arbeit wurde für beide Simulationen (Strecken/Stauchen) berechnet und ist in **Abb. 4.27A** gezeigt. Für den Fall einer quasi-stationären Simulation, ist die Arbeit entlang der Trajektorie identisch mit der Änderung der Freien Energie. Somit sollten die Arbeitskurven für den Streck- bzw. Stauchvorgang identisch sein, was für den

**Abb. 4.27**

(A) Potentialverlauf bei Strecken (blau) und Stauchen (rot) des Ubichinons. Das System war während der gesamten Simulation im Gleichgewicht. Aufgetragen ist ΔG bzw. die Arbeit über der Länge des Ubichinons. (B) Im oberen Teil der Abbildung ist die Längenänderung des Ubichinons entlang einer SMD-Simulation aus Unterkapitel „Rekonstruktion des Potentials entlang der Reaktionskoordinate“ zu sehen. Gezeigt sind die Daten aus Sektion 6 für System 1. Das Ubichinon-Molekül wird im Verlauf dieser Simulation um ca. 3 Å gestreckt. Im unteren Teil der Abbildung ist eine Vergrößerung des relevanten Potentialbereichs (gelber Kasten) aus (A) gezeigt. Hier ist zusätzlich die Mittelung der beiden Potentiale aus Hin- bzw. Rückrichtung in grün eingezeichnet. Die Streckung des Ubichinons aus dem oberen Teil lässt sich mit Hilfe des Potentialverlaufs in einen Korrekturterm umrechnen, der bei der Rekonstruktion des Potentials aus Unterkapitel „Rekonstruktion des Potentials entlang der Reaktionskoordinate“ berücksichtigt werden muss.

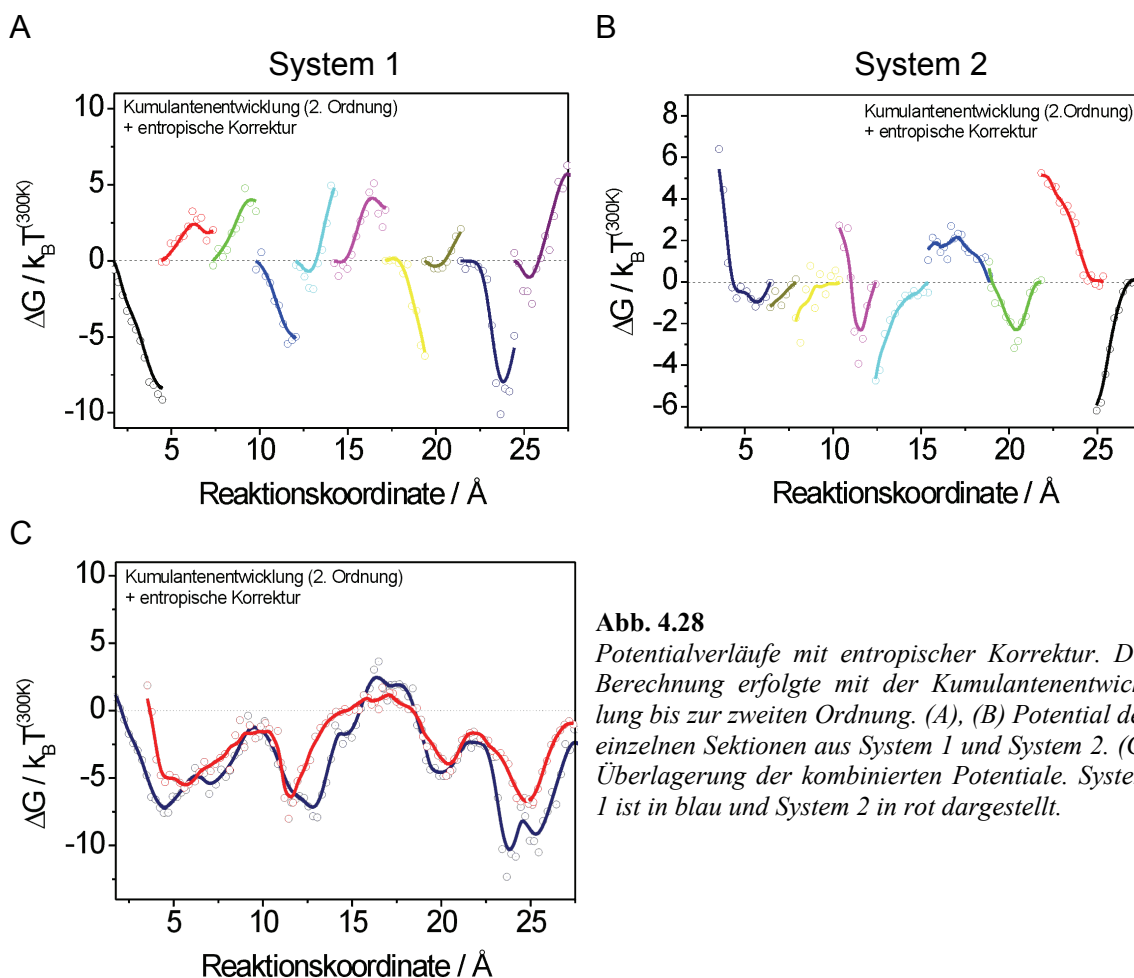
Bereits bei Längenänderungen ab 10 Å sieht man, dass die Steigung der Kurve deutlich größer als Null ist. Das bedeutet, dass bereits ab dieser Länge des Ubichinon-Moleküls eine Streckung bzw. Stauchung zu einem Arbeitsbeitrag führt, der nicht zu vernachlässigen ist. Liegt das Ubichinon-Molekül gestreckter vor (ab ca. 35 Å), erhöht sich die Steigung der Potentialkurve (**Abb. 4.27B**) und damit auch der Arbeitsbeitrag. Eine Streckung um wenige Ångstrom, führt zu einer Änderung des Potentials, die im Bereich der ursprünglich gemessenen Änderung der Freien Energie des Ubichinons entlang der Reaktionskoordinate liegt (siehe Unterkapitel *Rekonstruktion des Potentials entlang der Reaktionskoordinate*). In **Abb. 4.27B** ist im oberen Teil die Längenänderung des Ubichinon-Moleküls für die SMD-Simulation aus Sektion 6 für System 1 gezeigt. Die Länge des Ubichinons nimmt während der Simulation zu, da das Molekül zusätzlich gestreckt wird. Am Ende der SMD-Simulation (300 ps) hat sich das Ubichinon um ca. 3 Å verlängert. Der untere Teil in **Abb. 4.27B** zeigt einen Ausschnitt des Potentials aus **Abb. 4.27A** (gelber Kasten). In grün ist die Mittelung aus Hin- bzw.

Rückrichtung eingezeichnet. Die Längenänderung führt in diesem Fall zu einem Beitrag an Freier Energie von ca. $6 k_B T$, der durch zusätzliches Strecken des Ubichinon-Moleküls entlang der SMD-Simulation entsteht. Dieser Verlust an Entropie muss mit einem entsprechenden Zusatzbeitrag an Arbeit erkaufte werden.

Die Arbeit, die zur Kompensation des Entropieverlusts aufgewendet wurde, muss bei der Rekonstruktion des Potentialverlaufs berücksichtigt werden. Dadurch ist die Kraft, die während der SMD-Simulation am Kopf des Ubichinons angelegt wurde, in den meisten Fällen größer, als die Kraft, die notwendig ist, um das Ubichinon entlang der Reaktionskoordinate zu bewegen. Dies gilt es zu berücksichtigen, um das tatsächliche Potential zu rekonstruieren.

4.9. Rekonstruktion des korrigierten Potentials entlang der Reaktionskoordinate

Mit Hilfe des in Unterkapitel *Bestimmung des entropischen Beitrags durch Streckung des Ubichinons* bestimmten Potentials zur Streckung des Ubichinon-Moleküls wird das Freie Energieprofil aus Unterkapitel *Rekonstruktion des Potentials entlang der Reaktionskoordinate* korrigiert. Für jede Sektion (siehe **Abb. 4.24A,B**) wurde aus den einzelnen Trajektorien eine mittlere Streckung berechnet und damit über das Potential zur Streckung des Ubichinons (siehe **Abb. 4.27A**) der Wert der Arbeit abgelesen. Um diesen Wert muss das Potential entlang der Reaktionskoordinate korrigiert werden. Der Längenzuwachs innerhalb einer Sektion wurde als linear angenommen, was für die meisten Sektionen mit der tatsächlichen Längenänderung übereinstimmte. Der zusätzliche Längenzuwachs und somit der entropische Arbeitsbeitrag sind von Sektion zu Sektion und für beide Richtungen (System 1 und 2) unterschiedlich. Für die meisten Sektionen wurde das Potential aufgrund einer zusätzlichen Streckung während der SMD-Simulation überschätzt. Es gab aber auch Sektionen, in denen sich das Ubichinon-Molekül während der Simulation zusammengeknäult hat, was zu einem negativen entropischen Beitrag führte. **Abb. 4.28** zeigt die korrigierten Potentiale für die Kumulantenentwicklung bis zur zweiten Ordnung.

**Abb. 4.28**

Potentialverläufe mit entropischer Korrektur. Die Berechnung erfolgte mit der Kumulantenentwicklung bis zur zweiten Ordnung. (A), (B) Potential der einzelnen Sektionen aus System 1 und System 2. (C) Überlagerung der kombinierten Potentiale. System 1 ist in blau und System 2 in rot dargestellt.

Die Potentialverläufe der einzelnen Sektionen zeigen für beide Richtungen keine großen Änderungen (Abb. 4.28A,B). Die Amplituden der Potentiale liegen im Bereich einiger $k_B T$. Eine Überlagerung der zusammengesetzten Potentialverläufe ist in Abb. 4.28C dargestellt.

Die Potentialverläufe für die beiden Systeme unterscheiden sich deutlich von den Potentialverläufen in denen die Entropie nicht berücksichtigt wurde. Für die Systeme 1 und 2 ergibt sich ein Potentialverlauf, der an beiden Enden einen nahezu identischen Wert annimmt. Die Modulation der Potentialverläufe liegt im Bereich von ca. $14 k_B T$, wobei System 1 eine etwas stärkere Modulation aufweist. Des Weiteren zeigen die beiden Potentiale aus System 1 und System 2 einen ähnlichen Verlauf. Der Potentialverlauf der zwei Systeme fällt vom Beginn und vom Ende an zur Mitte hin zunächst ab und besitzt 3 ausgeprägte Potentialbarrieren, die sich bei ca. 10 \AA , 16 \AA und 21 \AA befinden. Die Barrierenhöhen liegen im Bereich von $< 10 k_B T$.

4.9.1. Diskussion

Durch Berücksichtigung der entropischen Korrektur resultiert ein Potentialverlauf, der beide im Vorfeld geforderten Kriterien erfüllt: die Potentialverläufe für beide Zugrichtungen haben am Anfang und am Ende vergleichbare Werte, mit einer Differenz von lediglich ca. $2 k_B T$. Außerdem stimmen die Potentialverläufe aus beiden Richtungen überein, obwohl die Daten zur Rekonstruktion aus unabhängigen Simulationen stammen. Einzige Vorgabe bei Berechnung der beiden Potentialverläufe war eine nahezu identische Reaktionskoordinate, die sich aus Voruntersuchungen ergeben hatte.

Die berechneten Potentiale können mit strukturellen Gegebenheiten der Pigment-Protein-Barriere in Verbindung gebracht werden. **Abb. 4.29** zeigt die Potentiale für System 1 (blau) und System 2 (rot) mit den strukturellen Daten der Pigment-Protein-Barriere im Hintergrund.

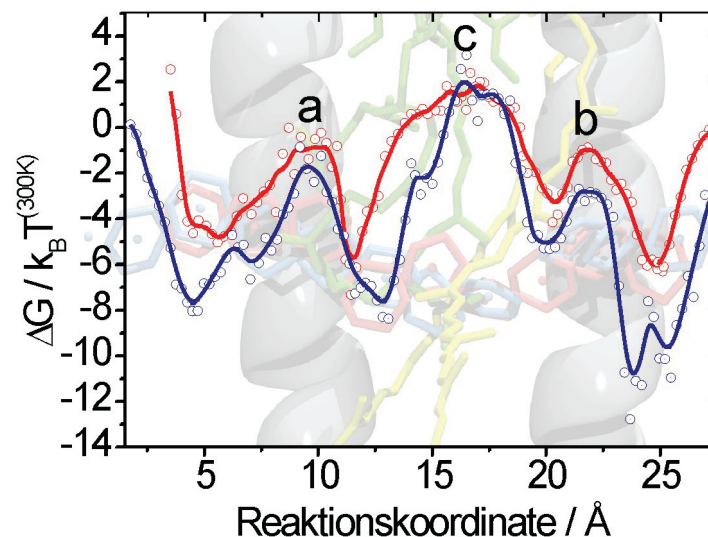


Abb. 4.29

Potentialverlauf mit Berücksichtigung der entropischen Korrektur für System 1 (blau) und System 2 (rot). Die Pigment-Protein-Struktur ist im Hintergrund zu sehen. Drei charakteristische Potentialbarrieren sind mit a, b und c gekennzeichnet.

Der Ubichinon-Pfad ist durch die Ubichinon-Köpfe gekennzeichnet (siehe auch **Abb. 4.20**). Ein Teil der Pigment-Protein-Barriere ist der Übersicht wegen nicht gezeigt. Zwischen den α -Helizes der β -Untereinheiten (10 \AA) tritt eine Potentialbarriere mit einer Größe von ca. $7 k_B T$ auf (**Abb. 4.29-a**). Eine geringfügig höhere Barriere ist an der Position zwischen den α -Helizes der α -Untereinheiten (16 \AA) zu sehen (**Abb. 4.29-b**). Zusätzlich gibt es eine dritte Barriere, die sich im Inneren der Pigment-Protein-Struktur befindet (**Abb. 4.29-c**). Diese Potentialbarriere wird durch die Chlorophyllschwänze und Carotinoide hervorgerufen. Bei Betrachtung des Gesamtverlaufs des Potentials in beiden Richtungen fällt auf, dass das Potential im Inneren

des LH1-Rings tiefer liegt als außen. Das Potential nimmt, von beiden Seiten kommend, zur Mitte hin ab. Dieses Verhalten bedeutet, dass das Ubichinon-Molekül eine erhöhte Aufenthaltswahrscheinlichkeit in diesem Bereich des LH1-Rings aufweist. Dieser Potentialverlauf kann zumindest teilweise auf die Präparation der Simulationssysteme zurückgeführt werden. Der Startpunkt auf der Innen- bzw. Außenseite des Potentials entspricht einer Position, in der sich die Ubichinon-Kopfgruppe nicht vollständig in einer Lipidumgebung befindet, sondern an der Lipid-Protein Grenzfläche. Durch Ziehen des Ubichinon-Moleküls durch den LH1-Ring in den vorangegangenen Simulationen (Unterkapitel *Identifizierung eines möglichen Pfades durch den LH1-Ring*), wurden Lipidmoleküle, die sich im Eingangsbereich des Kanals befunden haben, verschoben. Der Kanaleingang ist auf beiden Seiten zu Beginn der Simulation nicht mit Lipidschwänzen gefüllt und hat einen attraktiven Effekt auf die Ubichinon-Kopfgruppe, die sich leichter in den Kanalbereich ziehen lässt. Ohne diese künstlich erzeugte Ausgangssituation würde man einen Potentialverlauf mit weniger steilen Flanken an beiden Seiten erwarten.

4.9.1.1. Fehlerbetrachtung

Es gibt zwei Kriterien, die beachtet werden müssen, um eine allgemeine Aussage über die Richtigkeit des berechneten Potentials zu machen. Zum einen ist dies die Gesamtdifferenz des Potentials zwischen außen und innen (links und rechts der Pigment-Protein-Barriere), die im Idealfall Null sein sollte. Zum anderen müssen die Potentiale für beide Richtungen identisch sein. Für die Methode der Kumulantenentwicklung unter Berücksichtigung der entropischen Korrektur werden beide Kriterien zufriedenstellend erfüllt. Obwohl es offensichtliche Abweichungen zwischen System 1 und 2 gibt, stimmen die Hauptmerkmale, wie der erleichterte Zugang, die Potentialbarrieren zwischen den inneren (α -Untereinheit) und äußeren (β -Untereinheit) Paaren von α -Helizes und der Potentialbarriere in der Mitte des Reaktionsweges, für beide Richtungen gut überein.

Im Folgenden wird eine Abschätzung des Fehlers bei der Rekonstruktion des Potentials vorgenommen. Die Berechnung des Potentials entlang der Reaktionskoordinate erfolgte für jede rekonstruierte Sektion mit einem Datensatz bestehend aus jeweils 10 Trajektorien. Als Auswertemethode kam die Kumulantenentwicklung zum Einsatz. Analog zu Kapitel 2.4.2. *Rekonstruktion des Freien Energieprofils aus SMD-Simulationen* wird der statistische Fehler von Mittelwert und Varianz und damit der Fehler von ΔG berechnet. Aus jeweils 10 zufälligen Arbeitswerten einer simulierten, Gaußförmigen Arbeitsverteilung mit vorgegebenem Mittelwert und Breite lässt sich die Änderung der Freien Energie ΔG bestimmen. Wieder-

holtes Berechnen von ΔG und eine Analyse der entstehenden Verteilung an Potentialwerten, erlauben eine Bestimmung des Fehlers. Breite und Mittelwert werden dabei aus dem rekonstruierten Potential $\Delta G = \langle W \rangle - \langle W_{\text{diss}} \rangle$ entnommen. Die Abschätzung des Fehlers wurde für jeden Punkt des Potentials in allen Sektionen und für beide Richtungen gemacht. Für kleine Werte der Dissipation (im Bereich von einigen $k_B T$), wie sie in den hier durchgeführten Simulationen auftreten, ist die Verschiebung des Mittelwertes von ΔG gegenüber der statistischen Schwankung zu vernachlässigen.

Abb. 4.30 zeigt den statistischen Fehler des Potentialverlaufs entlang der Reaktionskoordinate für beide Richtungen. In blau ist das System 1 (Vorwärtsrichtung) und in rot das System 2 (Rückwärtsrichtung) dargestellt. Zusätzlich ist die statistische Ungenauigkeit als Fehlerbalken für jede Sektion eingezeichnet.

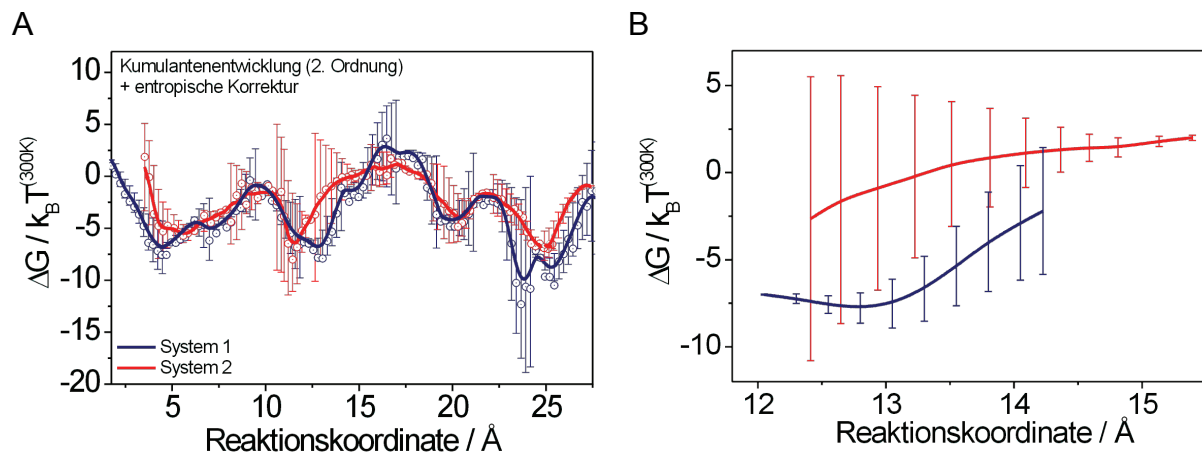


Abb. 4.30

Fehlerbetrachtung des Potentials. (A) Statistischer Fehler des Potentials für die einzelnen Sektionen. Eingezeichnet sind die Potentialverläufe von System 1 (Vorwärtsrichtung) in blau und von System 2 (Rückwärtsrichtung) in rot. Die Fehlerbalken entsprechen der statistischen Ungenauigkeit innerhalb der jeweiligen Sektion. (B) Ausschnittvergrößerung einer Sektion aus (A).

Bewegt man sich innerhalb einer Sektion entlang der Reaktionskoordinate, entsteht immer mehr Dissipation, was zu einer Verbreiterung der Arbeitsverteilungen und daher zu einer Vergrößerung des statistischen Fehlers bei der Bestimmung der Änderung der Freien Energie führt. In vielen Sektionen bewegte sich der statistische Fehler in der Regel unterhalb $4 k_B T$. Zum Ende der Sektionen stieg der statistische Fehler jedoch auf teilweise über $8 k_B T$ an (Abb. 4.30A). Da zu Beginn der SMD-Simulationen die einzelnen Sektionen equilibriert und damit wieder im Gleichgewicht waren, ist der Startpunkt der Simulation in jeder Sektion, für sich betrachtet, ohne statistischen Fehler behaftet.

Von Interesse ist jedoch der Fehler, der gemacht wird, wenn man sich einmal entlang der gesamten Reaktionskoordinate bewegt. Hierzu müssen die Fehler der einzelnen Sektionen

mittels Fehlerfortpflanzung kombiniert werden. Dies führt zu sehr großen Fehlern am Ende des Reaktionspfades, unabhängig von der gewählten Richtung. Die Fehler liegen in der Größenordnung der maximalen Modulation des Potentials. Diese Fehler lassen sich mit Hilfe der folgenden Überlegungen minimieren. 1) Bei Betrachtung einer Ausschnittsvergrößerung des Potentialverlaufs wird offensichtlich, dass der Endbereich einer Sektion (hier aus System 2 in rot), der mit einem großen statistischen Fehler behaftet ist, gleichzeitig der Anfangsbereich einer Sektion aus dem jeweiligen anderen System (hier System 1 in blau) ist, der mit einem kleinen statistischen Fehler behaftet ist (Abb. 4.30B). 2) Zwei Punkte entlang der Reaktionskoordinate sind bekannt. Sowohl Anfangs- als auch Endpunkt des Potentialverlaufs müssen denselben Potentialwert haben.

Für alle Sektionen werden nun die Fehler berechnet, die auftreten, wenn man genau einen Schritt entlang des Potentials macht, sich also immer zum nächsten Punkt entlang der Reaktionskoordinate bewegt. Damit lassen sich die Daten aus beiden Richtungen miteinander kombinieren und die Teilstücke mit den jeweils kleinsten statistischen Fehlern zu einem neuen kombinierten Potential zusammenfügen (Abb. 4.31).

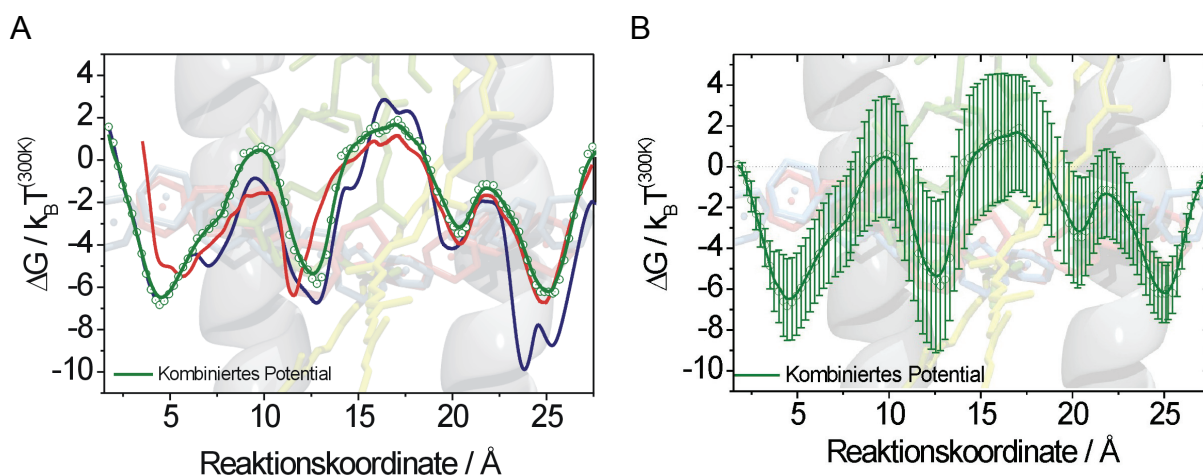


Abb. 4.31

Rekonstruiertes Potential aus den kombinierten Daten für System 1 und 2 (Vorwärts- und Rückwärtsrichtung). Die LH1-Struktur ist im Hintergrund zu sehen. (A) System 1 ist in blau, System 2 in rot und das kombinierte Potential ist in grün eingezeichnet. (B) Kombiniertes Potential mit Fehlerbalken.

Abb. 4.31A zeigt den Potentialverlauf für System 1 (blau) und 2 (rot). Das kombinierte Potential ist grün gezeichnet und besteht aus Daten der Sektionen beider Richtungen mit minimalen statistischen Fehlern. Im Hintergrund sind Teile der LH1 Struktur zu sehen. **Abb. 4.31B** zeigt das kombinierte Potential in grün mit eingezeichneten Fehlerbalken. Da sowohl Anfangs- als auch Endpunkt des Potentials fest sind, ergibt sich ein Verlauf des statistischen Fehlers, der von der Mitte des Potentials zu den Enden hin abnimmt und dort verschwindet. Alle strukturellen Merkmale sind noch im Potentialverlauf enthalten; die

Gesamtmodulation hat sich im kombinierten Potential auf ca. $8 k_B T$ verringert. Der Fehler liegt im Mittel bei ca. $2 k_B T$, der maximale Fehler beträgt ca. $4 k_B T$. Verglichen mit der Gesamtmodulation des Potentials liegt der Fehler im Mittel bei ca. 25 %, der maximale Fehler bei 50 %. Dies stellt eine Obergrenze der statistischen Ungenauigkeit dar.

4.9.1.2. Mean First Passage Time

Um die Frage zu beantworten, ob Diffusion entlang des vorgeschlagenen Pfades als Transportmechanismus durch den LH1-Ring in Frage kommen kann, wurde, basierend auf dem rekonstruierten Potential, eine mittlere Zeit abgeschätzt, in der sich das Ubichinon-Molekül durch den LH1-Ring bewegt. Die *Mean First Passage Time* (MFPT) lässt sich dann mit experimentell bestimmten Umsatzraten für das Reaktionszentrum in Purpurbakterien vergleichen. Diese liegen im Bereich von maximal 1000 Hz [103, 104]. Die Umsatzrate eines RC ist die Rate, mit der zwei Elektronen und zwei Protonen nach der Ladungstrennung im RC auf ein Ubichinon-Molekül übertragen werden, der reduzierte Elektronencarrier in die Membran abgegeben und durch ein oxidiertes Ubichinon wieder ersetzt wird. Um die optimale Funktion des Reaktionszentrums zu gewährleisten, sollte der Transport des Ubichinons durch den LH1-Ring auf einer ähnlichen Zeitskala, verglichen mit der Umsatzrate des RC, ablaufen. Zur Berechnung der MFPT wurde als einfachstes Modell eine Diffusion in einem Potential angenommen, das sich mit der *Smoluchowski*-Gleichung beschreiben lässt. Im Fall eines Diffusionsprozesses entlang eines eindimensionalen Potentials $G(z)$ nimmt die *Smoluchowski*-Gleichung folgende Form

$$\frac{\partial}{\partial t} p(z, t | z_0, t_0) = \frac{\partial}{\partial z} \left[D(z) \exp\left(-\frac{G(z)}{k_B T}\right) \frac{\partial}{\partial z} \exp\left(+\frac{G(z)}{k_B T}\right) \right] p(z, t | z_0, t_0) \quad (4.3)$$

an. $p(z, t | z_0, t_0)$ ist die Wahrscheinlichkeitsverteilung, mit der sich das System zur Zeit t an der Stelle z befindet, wenn das System zum Zeitpunkt t_0 an der Stelle z_0 war. $D(z)$ ist die ortsabhängige Diffusionskonstante und $G(z)$ das Potential. Damit lässt sich die mittlere Diffusionszeit gemäß

$$\tau_{\text{MFP}} = \frac{1}{D_{\text{Ubiquinon}}} \int_{z_L}^{z_R} dz \int_{z_L}^z dz' \exp\left(\frac{1}{k_B T} [G(z) - G(z')]\right) \quad (4.4)$$

bestimmen [105]. In Gleichung (4.4) ist τ_{MFP} die mittlere Diffusionszeit entlang des Potentials $G(z)$ und $D_{\text{Ubiquinon}}$ die Diffusionskonstante des Ubichinons. Bei Gleichung (4.4) handelt es sich

um einen Spezialfall, der bei Verwendung bestimmter Randbedingungen und einer Näherung eintritt.

Auf der einen Seite des Potentials wird eine so genannte reflektierende Randbedingung vorausgesetzt; auf der anderen Seite eine absorbierende Randbedingung. Zudem wird als einfacher Fall eine ortsunabhängige Diffusionskonstante angenommen.

Mit diesem Spezialfall soll eine erste Abschätzung der MFPT für die Diffusion des Ubichinon-Moleküls von der Außenseite des LH1-Rings (Membranbereich, linke Seite im Potential in **Abb. 4.31B**) auf die Innenseite (Reaktionszentrum, rechte Seite des Potentials in **Abb. 4.31B**) entlang der Reaktionskoordinate vorgenommen werden. Die Verwendung der oben genannten Randbedingungen wird im Folgenden näher erläutert.

i) Die freie Diffusion des Ubichinon-Moleküls ist in der Membran schneller als die Diffusion des Ubichinon-Moleküls entlang des Reaktionspfades durch den LH1-Ring. Zusätzlich wird angenommen, dass der rotatorische Anteil der Diffusion auf einer schnelleren Zeitskala abläuft, als der translatorische Anteil. Das Ubichinon-Molekül hat somit immer genug Zeit, um sich in der richtigen Konformation (Kopfgruppe des Ubichinons in Richtung des LH1-Rings) bezüglich der Pigment-Protein-Barriere zu orientieren. Zusätzlich existiert auf der Außenseite des LH1-Rings im Membranbereich ein Ubichinon-Pool [106], so dass immer ein Ubichinon-Molekül in der richtigen Konformation den Eingangsbereich des Kanals durch den LH1-Ring findet. Unter diesen Voraussetzungen kann eine reflektierende Barriere auf der Außenseite des LH1-Rings (linke Seite des Potentials in **Abb. 4.31B**) als erste Näherung angenommen werden.

ii) Im kompletten LH1-RC-Komplex befindet sich im Inneren des LH1-Rings direkt das Reaktionszentrum mit der Bindungstasche für das Ubichinon. Es wird angenommen, dass der Ubichinon-Transport vom Ausgang des Reaktionspfades auf der Innenseite des LH1-Rings zur Bindungstasche des Reaktionszentrums sehr effizient ist [90]. Dies bedeutet, dass jedes Ubichinon-Molekül, das die Pigment-Protein-Barriere überquert, die Ubichinon-Bindungstasche im Reaktionszentrum erreicht. Dieser Sachverhalt kann durch eine absorbierende Randbedingung als Näherung beschrieben werden.

Für die Diffusionskonstante des Ubichinons wird ein konstanter Wert von $5 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ angenommen. Dieser wurde experimentell bestimmt und entspricht der Diffusion des Ubichinon-Moleküls in der Membran [87, 89].

Gemäß Gleichung (4.4), geht das Potential exponentiell in die Bestimmung der MFPT ein und wird so durch den statistischen Fehler stark beeinflusst. Um eine realistische Abschätzung der Größenordnung der Diffusionszeit entlang der Reaktionskoordinate zu erhalten, wurde die

Modulation des Potentials so weit erhöht, dass alle Fehlerbalken durch das modifizierte Potential erfasst wurden. Basierend auf diesen Annahmen wurde eine Obergrenze der MFPT für die Diffusion des Ubichinons durch die Pigment-Protein-Barriere von $\sim 8 \times 10^{-3}$ s berechnet. Dieser Wert entspricht der Zeit, mit der das Ubichinon-Molekül im Mittel einmal von der Außenseite des LH1-Rings auf die Innenseite des LH1-Rings diffundiert.

4.9.1.3. Vergleich der Simulationsergebnisse mit experimentellen Daten

Um beurteilen zu können, ob die hier bestimmte Zeit für die Diffusion des Ubichinons durch den LH1-Ring aus biologischer Sicht realistisch ist, wird das Ergebnis im Folgenden mit bekannten, experimentell bestimmten Daten verglichen und bewertet. Dazu wird die Transferzeit in eine effektive „Turnover-Rate“ des LH1-RC-Komplexes umgerechnet und folgende Annahme gemacht. Die Diffusion des Ubichinons durch den LH1-Komplex stellt den langsamsten und damit limitierenden Schritt des gesamten Ubichinon-Transports innerhalb des LH1-RC-Komplexes dar. Unter der Annahme, dass die Transferzeit für das Ubichinol ähnlich dem des Ubichinons ist, erhält man eine maximale Turnover-Rate des LH1-RC-Komplexes von ca. 50 Hz ($2 \times$ Transferzeit + Zeit der übrigen Prozesse)⁻¹. Diese Annahme beruht auf der Tatsache, dass bei der zweifachen Reduktion des Ubichinons zu Ubichinol, neben zwei Elektronen lediglich zwei Protonen hinzugefügt werden, wodurch das Volumen der Kopfgruppe praktisch unverändert bleibt. Da der Kanalbereich größtenteils hydrophob ist, sollten keine Wechselwirkungen auftreten, die das Potential merklich verändern. Eine Rate von 50 Hz bedeutet, dass ca. 50 Ubichinole pro Sekunde in die Membran abgegeben werden können. In der Literatur findet sich eine ganze Reihe von experimentell ermittelten Turnover-Raten des RC aus *Rb. sphaeroides*, die teilweise deutlich von der hier berechneten Turnover-Rate abweichen. Gerencser et al. [103] ermittelte eine maximale Turnover-Rate des RC von ca. 1000 Hz. Eine etwas geringere Turnover-Rate für den Ubichinon-Transfer von ca. 600 Hz wurde von Osvath et al. [104] und eine Rate von ca. 260 Hz wurde von Paddock et al. [107] bestimmt. Zu beachten ist allerdings, dass die Experimente an isolierten RCs mit unterschiedlichen Bedingungen durchgeführt wurden.

Comayras et al. [90] untersuchte den Einfluss des Proteins PufX auf die Turnover-Raten von LH1-RC-Komplexen aus *Rb. sphaeroides*. Der LH1-RC-Komplex liegt in dieser Spezies nativ als Dimer vor, bei dem die LH1-Ringe eine geöffnete S-Form bilden. Von diesem LH1-RC-Komplex wird angenommen, dass die Struktur der LH1-Ringe Voraussetzung für einen effektiven Ubichinon/Ubichinol-Transport im Kernkomplex von *Rb. sphaeroides* ist.

Fehlt PufX, dann umschließt ein einzelner LH1-Ring in geschlossener Form das RC, vergleichbar mit der Struktur des Kernkomplexes aus *R. rubrum*. Die Turnover-Raten des LH1-RC-Komplexes aus *Rb. sphaeroides* wurden sowohl für die native Form, als auch für den Komplex ohne PufX bestimmt. Beide Kernkomplexe, mit und ohne PufX, wurden vor der Messung der Turnover-Raten in eine Membran eingebettet. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sollen mit den Turnover-Raten für den Kernkomplex aus *R. rubrum* verglichen werden.

Eine geschlossene LH1-Struktur um das RC aus *Rb. sphaeroides* führt zu einer Erniedrigung der Turnover-Rate um den Faktor zwei, d. h. dass durch die geschlossene Pigment-Protein-Barriere, der Ubichinon/Ubichinol-Austausch durch den LH1-Ring nicht entscheidend gestört wird. Die Messungen wurden bei hohen Lichtintensitäten durchgeführt, um einen limitierenden Faktor aufgrund schwacher Lichtintensität auszuschließen. Das Ubichinon benötigt demnach ca. 1 ms, um den LH1-Ring einmal zu durchqueren; die gesamte Turnover-Rate betrug 285 Hz. Dies ist ca. 6 Mal schneller, als die in dieser Arbeit angegebene Turnover-Rate von ca. 50 Hz. Die Rate stellt jedoch nur eine Untergrenze dar, die aufgrund eines Potentials berechnet wurde, das sämtliche Fehlerbalken beinhaltet und damit maximale Potentialbarrieren aufweist. Eine kleine Veränderung des Potentials wirkt sich aufgrund der exponentiellen Abhängigkeit des Potentials stark auf die MFPT und auf die Turnover-Rate aus. Um eine Turnover-Rate im Bereich von ca. 300 Hz bzw. eine MFPT von ca. 1 ms zu erreichen, müssten die Potentialbarrieren um ca. 30 % herabgesetzt werden.

Zusätzlich kann, ausgehend vom Absorptions-Wirkungsquerschnitt des LH1-Rings und der spektralen Energiedichte des Sonnenlichts, die Rate abgeschätzt werden, mit der ein LH1-Ring Anregungsenergie von absorbierten Photonen an das RC abgeben kann. Danach ergibt sich ein Wert von ca. 20 Hz. Dieser Wert liegt deutlich unterhalb der experimentell bestimmten maximalen Turnover-Raten für das RC und ebenso unterhalb der berechneten Diffusionsrate des Ubichinons durch den geschlossenen LH1-Ring (50 Hz). Der Energietransfer der absorbierenden Energie vom LH1-Ring zum RC könnte demnach unter physiologischen Bedingungen den limitierenden Faktor darstellen.

Die Diffusion des Ubichinons durch den geschlossenen LH1-Ring in *R. rubrum* ist aufgrund der Ergebnisse, der in diesem Kapitel vorgestellten Simulationen auf einer Zeitskala im Millisekundenbereich möglich. Eine Öffnung des LH1-Rings, wie sie in anderen Spezies durch Einbau eines zusätzlichen Proteins (wie z.B. PufX oder das W-Protein) beobachtet werden konnte, ist bei *R. rubrum* für die Diffusion des Ubichinons durch den LH1-Ring nicht notwendig. Diese Aussage wird durch die Tatsache bekräftigt, dass alle bislang bekannten

experimentellen Strukturdaten von LH1 bzw. LH1-RC-Komplexen aus *R. rubrum* eine geschlossene Ringstruktur besitzen und kein Protein entdeckt werden konnte, dass den LH1-Ring öffnet.

4.10. Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurde der Frage nachgegangen, ob der Elektronencarrier Ubichinon durch den geschlossenen LH1-Ring des Purpurbakteriums *R. rubrum* diffundieren kann. Ausgehend von Modellstrukturen für den LH1 und das RC wurde mit Hilfe von MD-Simulationen ein stabiler Kernkomplex gebaut. Bei genauer Analyse der equilibrierten Struktur des Kernkomplexes konnten Kanäle im LH1-Ring entdeckt werden, die aufgrund der Flexibilität der Chlorophyll-Schwänze und der Carotinoid-Moleküle eine mögliche Diffusion des Ubichinons durch den LH1-Ring erlauben.

Das zu simulierende System besteht aus dem Kernkomplex, der in eine Wasser-Lipid-Umgebung eingebettet ist. Dieses Modellsystem besitzt ca. 250000 Atome. Aufgrund der großen Anzahl an Atomen wurde der Diffusionsprozess des Ubichinons nur an einem Ausschnitt dieses Systems untersucht.

Dieses Minimalsystem besteht aus vier $\alpha\beta$ -Untereinheiten (1/4-Ring) des LH1 mit eingelagerten Pigmenten. Dieser LH1-Ausschnitt wurde ebenfalls in eine Doppellipidschicht eingebaut, solvatisiert und mittels MD-Simulation equilibriert. Um eine Diffusion des Ubichinon-Moleküls durch den LH1-Ring auf MD-Zeitskalen untersuchen zu können, wurde die Simulation mit Hilfe von SMD beschleunigt und das Ubichinon unter Einwirkung einer externen Kraft durch die Proteinbarriere gezogen. Dies erfolgte mit moderaten Kräften und ohne strukturelle Veränderung des Systems. Eine weitere Simulation des Diffusionsprozesses des Ubichinons in die entgegengesetzte Richtung ergab analoge Ergebnisse und eine Übereinstimmung des Pfades, auf dem sich die Kopfgruppe des Ubichinons durch den LH1-Ring bewegt. Dieser Pfad wurde im Anschluss genauer untersucht und die Änderung der Freien Energie während der Diffusion des Ubichinons entlang des Pfades bestimmt. Aufgrund der Tatsache, dass die beschleunigten Simulationen im Nichtgleichgewicht ablaufen, musste zur Bestimmung der Freien Energieänderung eine statistische Analyse mehrerer Simulationen vorgenommen werden. Um das System möglichst nahe am Gleichgewicht zu halten, wurde der Reaktionspfad in mehrere Sektionen unterteilt und das System an den Startpositionen der Sektionen equilibriert. Für jede Sektion wurden jeweils 10 SMD-Simulationen durchgeführt, in denen das Ubichinon entlang des Pfades zum Grenzpunkt des nächsten Teilstückes gezo-

gen wurde. Die Bestimmung des Potentials entlang der Reaktionskoordinate erfolgte mit Hilfe der Kumulantenentwicklung bis zur zweiten Ordnung. Dies wurde für beide Richtungen – von außen nach innen und von innen nach außen, bezogen auf den LH1-Ring - unabhängig voneinander gemacht. Diese Analyse zeigt, dass ein nicht zu vernachlässigender Arbeitsanteil durch Veränderung der Länge des Ubichinons während der SMD-Simulationen in das gesuchte Potential mit eingeht. Diese entropische Korrektur wurde durch Bestimmung des Potentials, das zur Streckung des Ubichinons überwunden werden muss, berücksichtigt.

Die Rekonstruktion des korrigierten Potentialverlaufs erfüllte die im Vorfeld geforderten Bedingungen: i) das Potential besitzt für beide Simulationsrichtungen das gleiche Profil und ii) Start und Endpunkt des Potentials liegen auf demselben Wert. Die Merkmale des Potentials konnten strukturellen Ursachen zugeordnet werden. So sieht man eine Potentialbarriere zu Beginn (ca. 8 $k_B T$) und am Ende der Reaktionskoordinate (ca. 6 $k_B T$). Diese Potentialbarrieren werden von Bereichen verursacht, die zwischen den inneren und äußeren α -Helizes liegen. Die zentrale Barriere von ca. 7 $k_B T$ lässt sich durch Wechselwirkung des Ubichinons mit Chlorophyllen und Carotinoiden im Zentrum der Pigment-Protein-Barriere erklären.

Durch Kombination der Ergebnisse für beide Richtungen konnte der Potentialverlauf mit minimalen statistischen Fehlern bestimmt werden. Der Fehler liegt im Mittel bei ca. 2 $k_B T$, der maximale Fehler beträgt ca. 4 $k_B T$. Das sind ca. 25 % bzw. 50 %, verglichen mit der Gesamtmodulation des Potentials.

Anhand eines Potentials, das alle Fehlerbalken beinhaltet, wurde eine Obergrenze der MFPT für die Diffusion des Ubichinons durch den LH1-Ring von 8×10^{-3} s abgeschätzt. Unter der Annahme, dass die Diffusion den limitierenden Schritt innerhalb des Kernkomplexes darstellt, beträgt die Turnover-Rate ca. 50 Hz. Durch einen Vergleich dieser Werte mit experimentellen Daten und unter Berücksichtigung möglicher weiterer limitierender Faktoren unter physiologischen Bedingungen, wie beispielsweise der Lichtintensität, kann geschlussfolgert werden, dass ein Diffusionsprozess des Ubichinons durch einen geschlossenen LH1-Ring möglich ist. Damit lässt sich erklären, warum alle bislang bekannten experimentellen Strukturdaten von LH1 bzw. LH1-RC-Komplexen aus *R. rubrum* eine geschlossene Ringstruktur aufweisen.

5. Untersuchung des Proteintranslokationskanals SecY aus *Methanococcus jannaschii*

In diesem Kapitel werden MD-Simulationen an einem Proteinkanal, dem SecY-Komplex vorgestellt, dessen Funktion die Translokation von Polypeptiden ist. Die Simulationen basieren auf einer Kristallstruktur des SecY-Komplexes aus dem Archaeobakterium *Methanococcus jannaschii*, die den Proteinkanal in einer inaktiven (nicht-translozierenden) Form beschreibt und einer anhand von Kryo-EM-Daten modellierten Struktur, die eine mögliche aktive (translozierende) Form darstellt. Diese Strukturen können stellvertretend für alle Proteintranslokationskanäle genommen werden, d. h. nicht nur für Proteintranslokationskanäle aus Bakterien.

Um den Einfluss struktureller Unterschiede auf funktionale Konsequenzen zu untersuchen, wurden MD-Simulationen des Proteinkanals SecY in seiner aktiven und inaktiven Form durchgeführt. Dabei wurde überprüft, inwieweit eine Konformationsänderung aus der inaktiven in die aktive Form für den Translokationsprozess notwendig ist und wie sich dies auf die Potentialbarriere zur Aktivierung der Proteintranslokation auswirkt. Darüber hinaus wurde mit Hilfe von SMD-Simulationen die Fähigkeit des Proteinkanals zur Abdichtung gegenüber kleinen Molekülen, wie Wasser und Ionen untersucht. MD-Simulationen zur Relaxation des Kanals in seine inaktive Form erlauben Aussagen über mögliche Funktionen des so genannten Pfropfens, welcher ein wichtiges Strukturelement des Proteinkanals darstellt.

5.1. Einleitung

Die Synthese von Proteinen (Translation) erfolgt am Ribosom, einem komplexen Nucleoprotein-Partikel. Die so genannte mRNA dient als Vorlage für das Protein. Entsprechend der Basenabfolge der mRNA werden die einzelnen Aminosäuren sukzessive aneinandergesetzt. Um nach der Translation die Proteine an ihren jeweiligen Bestimmungsort zu befördern, ist es für die Zelle notwendig, Proteine durch Membranen zu transportieren oder sie in Membranen einzubauen. Im Falle von Eukaryoten erfolgt die so genannte Translokation durch die Membran des Endoplasmatischen Reticulums (ER), aus dem Cytosol ins Lumen des ER. Im Falle von Prokaryoten erfolgt sie durch die Plasmamembran, aus dem intrazellulären in den extrazellulären Raum. Eine Signalerkennungssequenz (eine bestimmte Abfolge von Aminosäuren) im Protein legt dabei den Bestimmungsort des Proteins fest. Die Signalerkennungssequenz wird von einem Proteintranslokationskanal erkannt, der den Transport bzw. den Einbau vermittelt.

5.1.1. Allgemeine Beschreibung des Proteinkanals SecY bzw. Sec61

In Prokaryoten wird der Proteinkanal mit SecY bezeichnet, in Eukaryoten mit Sec61 und ist ein Multiproteinkomplex, der in die Membran eingebaut ist [108]. Er besitzt ein hydrophobes Inneres und kann sich sowohl senkrecht zur Membranebene öffnen, um Polypeptide durch eine Membran zu transportieren, als auch in der Membranebene öffnen, um Proteine in die Membran einzubauen. Der Proteinkanal besteht aus drei konservierten Membranprotein-Untereinheiten α , β und γ . Die Homologie der Untereinheiten α und γ aus verschiedenen Spezies ist größer als für die Untereinheit β . Für die Untereinheiten α und γ findet sich eine erhebliche Sequenz-Konservierung zwischen den einzelnen Spezies, für die β -Untereinheit ist dies nicht der Fall. Die β -Untereinheit ist für die Funktionalität des Kanals jedoch nicht essentiell.

Es wird angenommen, dass die Hauptbestandteile, die für die Funktion des Proteinkanals verantwortlich sind, in allen Spezies durch die α - und γ -Untereinheiten gestellt werden. Den Proteinkanal SecY kann man in allen Prokaryoten finden, Sec61 kommt in allen Eukaryoten vor.

Der größte Teil des Proteinkanals wird von der α -Untereinheit gebildet. Die α -Untereinheit besteht aus insgesamt 10 Transmembranregionen. Sowohl der C- als auch der N-Terminus liegen im Cytosol. Die β -Untereinheit besteht in Eukaryoten und Archaeobakterien aus einem

einzigem membran-durchspannenden Polypeptid, bei dem der N-Terminus ebenfalls im Cytosol liegt. Hier gibt es einen Unterschied zu den Eubakterien, bei der diese Untereinheit die Membran zweimal durchspannt. Die γ -Untereinheit ähnelt sich wiederum in den meisten Spezies; sie besteht aus einem membran-durchspannenden Polypeptid.

Die Bezeichnungen der einzelnen Untereinheiten des Proteinkanals unterscheiden sich von Organismus zu Organismus, was in **Tab. 5.1** an einigen Beispielen zusammengefasst ist:

Tab. 5.1

Nomenklatur der Protein-Untereinheiten des Proteintranslokationskanals für verschiedene Organismen.

	Eukaryoten (Sec61-Komplex)	Prokaryoten (SecY-Komplex)	
	Säugetiere	Eubakterien	Archaeobakterien
α -Untereinheit	Sec61 α	SecY	SecY
β -Untereinheit	Sec61 β	SecG	Sec β
γ -Untereinheit	Sec61 γ	SecE	SecE

5.1.2. Funktionsweise des Proteinkanals SecY bzw. Sec61

Eine der ersten experimentellen Studien, die einen Hinweis darauf gegeben haben, dass der SecY/Sec61-Komplex die Funktion eines protein-translozierenden Kanals hat, wurde 1994 von Mothes et al. durchgeführt [109]. Mit Hilfe von Crosslinking-Experimenten fand man heraus, dass sich fast ausschließlich Bindungen zwischen dem translozierten Polypeptid und Sec61 α , der größten Untereinheit des Kanals ausgebildet haben. Hieraus konnte geschlossen werden, dass das Polypeptid vom Ribosom direkt in den Proteintranslokationskanal transportiert wird.

Der Proteinkanal SecY bzw. Sec61 ist eine passive Pore, die Polypeptide prinzipiell in beide Richtungen passieren lassen kann. Um einen gerichteten Transport zu ermöglichen benötigt man eine treibende Kraft. Diese wird durch Assoziation von anderen Proteinkomplexen und der Hydrolyse von ATP oder GTP ermöglicht. In einigen Organismen konnte man den Proteinkanal in Assoziation mit weiteren SecY- bzw. Sec61-Komplexen nachweisen.

Es sind zwei verschiedene Arten der Translokation von Polypeptiden bekannt. Diese sollen im Folgenden kurz vorgestellt werden.

Bei der cotranslationalen Translokation wird die entstehende Peptidkette während der Translation aus dem Ribosom durch den Proteinkanal geschoben. Dieser Mechanismus findet sich in allen Organismen wieder und wird nicht nur dazu verwendet, Proteine durch die Membran zu transportieren, sondern auch Proteine in die Membran einzubauen. Dabei dient

die Signalerkennungssequenz, eine kurze Aminosäuresequenz am N-terminalen Ende des Polypeptids, als Erkennungsmerkmal für eine Translokation des Proteins. Diese wird von einem SRP (*Signal recognition particle*, einem Komplex bestehend aus mehreren Polypeptidketten und einem RNA-Molekül) erkannt. Der Ribosom-SRP-Komplex bindet am SRP-Rezeptor, der sich in der Membran befindet. Dadurch kommt es letztendlich zur Bindung des Ribosoms an den Proteinkanal [110, 111]. Nun kann die am Ribosom gebildete Polypeptidkette direkt in und durch den Proteinkanal geschleust werden. Die hierfür notwendige Energie stammt aus der Hydrolyse von GTP.

Eine weitere Möglichkeit der Proteintranslokation stellt die posttranslationale Translokation dar. Hierbei wird eine bereits fertig synthetisierte Polypeptidkette im ungefalteten Zustand aus dem Cytosol in den Proteinkanal geschleust. In Eukaryoten werden hierfür weitere Proteine zum Sec61-Komplex rekrutiert. Dabei spielen sowohl Proteine im Cytosol, in der Membran des ER, sowie im Lumen des ER eine Rolle. Chaperone im Cytosol verhindern das vorzeitige Falten der Polypeptidkette nach ihrer Synthetisierung. Die Signalsequenz der Polypeptidkette wird von einem weiteren Sec-Komplex, der mit dem Proteinkanal assoziiert ist, erkannt. Die Polypeptidkette wird durch Diffusion durch den Proteinkanal geschleust. Um einen gerichteten Transport zu erhalten bindet auf der anderen Seite des Kanals, im Lumen des ER, ein weiteres lösliches Protein an die Polypeptidkette, sobald diese ausreichend aus dem Kanal ragt. Diese Bindung verhindert eine Bewegung der Polypeptidkette zurück durch den Proteinkanal und wird durch die Hydrolyse von ATP ermöglicht. Wenn die Polypeptidkette weiter ins Lumen des ER ragt, können weitere Proteine binden und es kommt zu einer ratschenartigen Bewegung. Dies geschieht so lange, bis sich das Polypeptid komplett durch den Proteinkanal bewegt hat. Erstaunlicherweise funktioniert dieser Mechanismus auch ohne ATP als Energieträger [112]. Ein Ratschenmechanismus basierend auf der Brownschen Bewegung reicht demnach aus, um bereits einen Transport auf ausreichender Zeitskala zu ermöglichen, was anhand einer mathematischen Modellierung gezeigt werden konnte [113].

Eine weitere Form der posttranslationalen Translokation, die nur in Eubakterien vorkommt verwendet eine cytosolische ATPase als treibende Kraft [114]. Das synthetisierte Polypeptid wird von einer ATPase (SecA) gebunden, die wiederum einen Komplex mit dem Proteinkanal SecY eingehen kann. Durch die Hydrolyse von ATP kommt es zu Konformationsänderungen, die das Polypeptid schrittweise in den Proteinkanal schiebt. Dies geschieht solange, bis das komplette Polypeptid durch den Kanal transportiert wurde.

In allen drei Fällen handelt es sich um einen gerichteten Transport, bei dem das noch nicht gefaltete Polypeptid durch den Proteinkanal mit Unterstützung unterschiedlicher Helferproteine befördert wird.

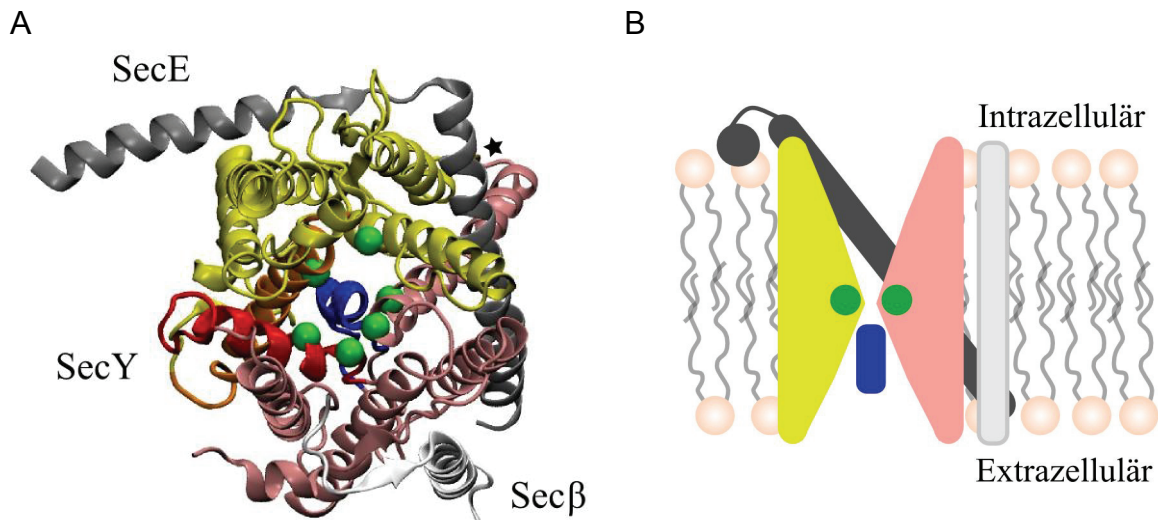
Bei der Translokation von Proteinen muss gewährleistet sein, dass der Kanal für Wasser, Ionen, sowie weitere kleine Moleküle undurchlässig ist, und somit der Konzentrationshaushalt der Zelle nicht beeinträchtigt wird. Der Proteinkanal kann als dynamisches System betrachtet werden, das zwischen einem aktiven (translozierenden) Zustand und einem inaktiven (nicht-translozierenden) Zustand wechselt. Der Translokationsprozess wird durch zusätzliche Proteine eingeleitet bzw. gesteuert. Die genaue Wirkungsweise des Proteinkanals, im Sinne einer molekularen Beschreibung der ablaufenden Prozesse, ist bislang noch nicht vollständig gelungen. Dies liegt vor allem daran, dass bis zum Jahr 2004 keine Strukturdaten mit atomarer Auflösung vorhanden waren. Der Großteil der bis dahin verfügbaren Strukturdaten stammte aus EM-Aufnahmen, entweder von dem Proteinkanal Sec61 alleine [115] oder im Komplex mit dem Ribosom [116, 117]. Man fand heraus, dass das Ribosom an einen oligomeren Sec61-Komplex bindet. Die anfängliche Vermutung, dass sich der Translokationskanal in der Mitte von vier Sec61-Komplexen befindet und erst durch Zusammenlagerung entsteht, konnte mit besser werdender Auflösung der EM-Daten widerlegt werden [118, 119].

Mit der Veröffentlichung der Kristallstruktur des SecY-Komplexes aus dem Archaeobakterium *Methanococcus jannaschii* mit einer Auflösung von 3.4 Å war es 2004 erstmals möglich, einen detaillierten Blick auf die Struktur des Proteinkanals eines Archaeobakteriums zu werfen und Vermutungen über Struktur-Funktions-Beziehungen zu äußern [120]. Aufgrund der hohen Sequenzsimilarität des Kanals verschiedener Spezies, kann die Struktur stellvertretend für alle Spezies genommen werden.

Die Kristallstruktur mit dem Eintrag 1RHZ.pdb in der Proteindatenbank ist Ausgangspunkt der in diesem Kapitel gemachten Simulationen und soll im Folgenden kurz vorgestellt werden. Strukturelle Konsequenzen, die den Einbau eines Polypeptides durch den Proteinkanal in die Membran betreffen, werden in diesem Zusammenhang nicht betrachtet.

5.1.3. Die Kristallstruktur des Proteinkanals SecY aus *M. jannaschii*

Die Kristallstruktur 1RHZ zeigt einen monomeren SecY-Komplex mit den Untereinheiten SecY, SecE und Sec β . In **Abb. 5.1** ist eine Aufsicht aus dem intrazellulären Raum auf den Kanal gezeigt.

**Abb. 5.1**

(A) Aufsicht auf die Kristallstruktur 1RHZ des SecY-Komplexes aus *M. jannaschii*. Die Proteinstruktur ist in Cartoon-Darstellung gezeigt. In rosa bzw. rot und gelb bzw. orange sind die beiden Teile der Untereinheit SecY, in grau die Untereinheit SecE und in weiß die Untereinheit Secβ eingefärbt. Der schwarze Stern markiert die Stelle an der die beiden Hälften miteinander verbunden sind (näheres siehe Text). Die C_α-Atome der Aminosäuren der Pore, der engsten Stelle des Kanals, sind in Van der Waals-Darstellung in grün eingezeichnet. (B) Schematische Darstellung des SecY-Komplexes als Seitenansicht (Farbgebung wie in A). Die Darstellung zeigt einen Schnitt durch den Proteinkanal, der in eine Membran eingebaut ist.

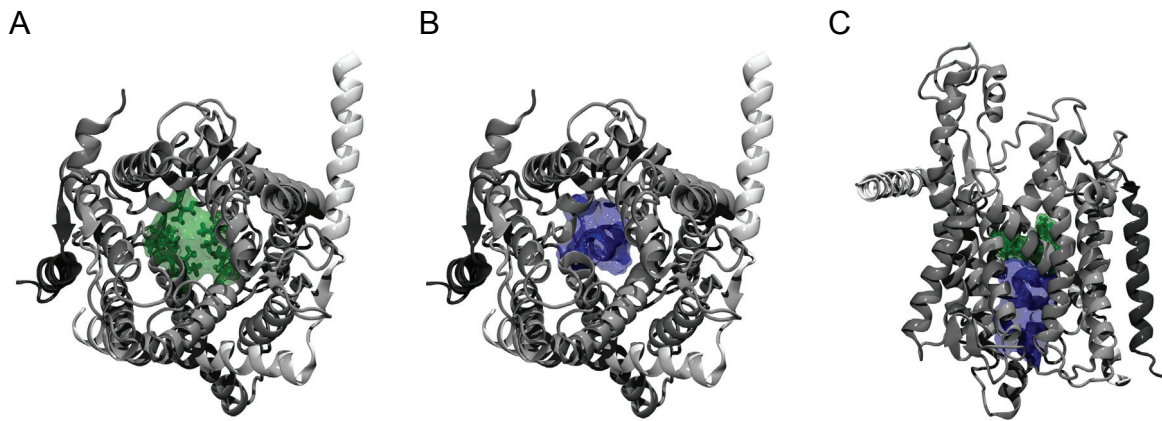
Die Proteinstruktur ist in **Abb. 5.1A** in Cartoon-Darstellung gezeigt. In rosa bzw. rot und gelb bzw. orange ist die Untereinheit SecY, in grau die Untereinheit SecE und in weiß die Untereinheit Secβ eingefärbt. Die SecY- bzw. α-Untereinheit stellt den größten Teil der Struktur dar und besteht aus 10 transmembranen Bereichen (TM-Bereich). Diese sind in zwei Gruppen (TM1 bis TM5, rosa bzw. rot und TM6 bis TM10, gelb bzw. orange) angeordnet, die sich gegenüberstehen. Die transmembranen Bereiche liegen vorwiegend als α-Helizes vor, die über Loop-Strukturen miteinander verbunden sind. Nicht alle Transmembranhelizes durchspannen dabei die Membran vollständig. Die kurzen Untereinheiten SecE bzw. Secβ befinden sich auf den Außenseiten des Proteinkanals. SecE (grau) besteht aus zwei α-Helizes, die über eine kurze Loop-Struktur miteinander verbunden sind. Nur eine der α-Helizes durchspannt die Membran, die andere liegt in der Membranebene auf der intrazellulären Seite. Beide helikalen Bereiche umfassen die SecY-Untereinheit und fungieren wie eine Klammer, die beide SecY-Bereiche zusammenhält. Bei Secβ handelt es sich um eine einzelne α-Helix, die die Membran vollständig durchspannt.

Die vorhandene Kristallstruktur zeigt, dass sich der Kanal im Zentrum eines einzelnen SecY-Komplexes befindet und nicht wie früher angenommen, durch die Zusammenlagerung mehrerer SecY-Komplexe entsteht [115, 116, 119, 121]. Alle konservierten Aminosäuren befinden sich im Zentrum des SecY-Komplexes und nicht auf der Außenseite [120], was auf die essentielle Funktion dieser Aminosäuren schließen lässt. Der Innenbereich, mit Ausnahme

der engsten Stelle des Kanals, besteht aus hydrophilen Aminosäuren. Dadurch wird ein Durchgang durch den Kanal und somit durch die Membran für kleine Moleküle und Proteine aus dem extrazellulären bzw. intrazellulären Bereich möglich.

Die Kristallstruktur zeigt von der Seite betrachtet (entlang der Membranebene) trichterförmige Strukturen auf beiden Seiten, die auf Öffnungen des Kanals hindeuten. Zur Mitte hin verjüngt sich dieser Kanal zu einer sehr engen Stelle, die in der Kristallstruktur geschlossen erscheint (siehe **Abb. 5.1B**). Dieser Bereich wird im Folgenden als Pore oder Porenbereich bezeichnet. Die engste Stelle besteht aus einem Ring von sechs hydrophoben Aminosäuren, bei denen es sich um Isoleucin und Valin handelt.

In **Abb. 5.1A** sind die C_{α} -Atome dieser Aminosäuren in Van der Waals-Darstellung grün eingezeichnet. Direkt unterhalb der Pore, auf der extrazellulären Seite der Membran ist ein kurzes helikales Segment zu sehen, das sich genau im Kanalbereich befindet und diesen blockiert (**Abb. 5.1**, blau). Diese Struktureinheit wird im Folgenden Pfropfen genannt, weil sie den Kanal von einer Seite blockiert. Zusammen mit der Pore könnte dies eine Abdichtung darstellen, was eine der geforderten Eigenschaften dieses Proteinkanals ist. MD-Simulationen an der α -Untereinheit (SecY) dieser Struktur haben gezeigt, dass sich auf einer Zeitskala von ~ 10 ns Wassermoleküle im Innenbereich des Kanals der Pore von beiden Seiten aus nähern, diese aber nicht durchqueren können [122]. Die Kristallstruktur stellt den Kanal also in einer inaktiven (nicht-translozierenden) Konformation dar. Eine Betrachtung des Porenbereichs und des Pfropfens in Surface-Darstellung zeigen, dass die Pore den Kanal bereits komplett verschließt und sich der Pfropfen direkt unterhalb der Pore befindet und eng an diese anliegt (**Abb. 5.2**).

**Abb. 5.2**

Proteinkanal (SecY-Komplex) in Cartoon-Darstellung. Die einzelnen Untereinheiten sind in grau (SecY), dunkelgrau (Sec β) und hellgrau (SecE) dargestellt. In Liccorice- und transparenter Surface-Darstellung sind die Pore in grün und der Pfropfen in blau eingezeichnet. (A) Aufsicht, mit hervorgehobener Pore. (B) Aufsicht, mit hervorgehobenem Pfropfen. (C) Seitenansicht. Die Orientierung ist so gewählt, dass Proteine von oben durch den Kanal nach unten transloziert werden.

Hier ist die Proteinstruktur in Cartoon-Darstellung in grau eingezeichnet. In **Abb. 5.2A** bzw. **B** sind die Pore in grün und der Pfropfen in blau als transparente Surface-Darstellung eingezeichnet. **Abb. 5.2C** zeigt eine Seitenansicht auf den Proteinkanal. Hier sind sowohl Pore als auch Pfropfen in Surface-Darstellung hervorgehoben.

Um den Kanal zu öffnen und somit die Translokation eines Polypeptids zu ermöglichen muss sich die Struktur des Proteinkanals ändern. Zum einen muss der Pfropfen seine Position unterhalb der Pore verlassen, zum anderen muss sich die Pore aufweiten können, um genügend Platz für die translozierte Polypeptidkette zur Verfügung zu stellen.

Der Pfropfen wird durch eine Transmembrandomäne der Untereinheit SecY gebildet, die mit zwei Loop-ähnlichen Strukturen mit SecY verbunden ist. Dadurch kann sich der Pfropfen, ähnlich einer Scharnierbewegung, von der Pore lösen. Eine Aufweitung der Pore könnte durch Bewegungen der α -Helizes im Porenbereich hervorgerufen werden. Diese Aufweitung ist notwendig, um beispielsweise die experimentell beobachtete Translokation einer α -Helix [123] oder den Transport von Aminosäuren mit voluminösen Restgruppen erklären zu können [124].

Simulationen, in denen der Einfluss von Kugeln mit anwachsendem Radius auf die Struktur des inaktiven Kanals untersucht wurde, sowie Simulationen, bei denen Kugeln mit unterschiedlichem Radius durch den Proteinkanal gezogen wurden, haben ergeben, dass die Porenregion eine für die Translokation notwendige Flexibilität besitzt. Die durch die Translokation von Kugeln bedingte Vergrößerung der Pore hatte sich in den Simulationen bereits nach wenigen Nanosekunden teilweise wieder zurückgebildet. Darüber hinaus wurde gezeigt,

dass sich der Pfropfen von der Pore wegbewegen muss, um eine Translokation der Kugeln durch den Proteinkanal zu ermöglichen [125].

In einer weiteren Studie wurde eine α -Helix in einer SMD-Simulation durch den Proteinkanal gezogen, der in der inaktiven Konformation vorlag. Durch die Zugkraft des SMD-Potentials wurde die α -Helix durch die geschlossene Pore gezogen, die sich dadurch geweitet hat. Zusätzlich hat sich der Pfropfen aus der Kanalregion gelöst, wodurch die Pore nicht mehr blockiert war. Auch hier war die Flexibilität des Kanals ausreichend, um eine Translokation der α -Helix zu ermöglichen, ohne die Struktur des Proteinkanals zu beschädigen.

Es stellt sich die Frage, wie ein Übergang aus der inaktiven in die aktive Konformation aussehen kann. Eine Möglichkeit zur Aktivierung kann eine Bindung der Polypeptidkette über ihre Signalsequenz an den Proteinkanal sein. Die Signalsequenz besteht im Falle sekretorischer Proteine aus 15 bis 40 Aminosäuren am N-Terminus des Proteins. Das Signalpeptid besitzt einen hydrophoben Kern und ist von geladenen bzw. polaren Aminosäuren flankiert. Crosslinking-Experimente haben gezeigt, dass der hydrophobe Kern eine α -Helix bildet, die sich zwischen zwei Transmembranhelizes der SecY-Untereinheit einbauen kann [126]. Dies könnte zu einer Konformationsänderung der Untereinheit SecY führen, bei der sich die betroffenen TM-Helizes (TM2b und TM7, in **Abb. 5.1A** in rot bzw. orange dargestellt) auseinander bewegen und möglicherweise zu einer Destabilisierung der Bindung des Pfropfens führen [120].

Eine weitere Möglichkeit, die zum Öffnen des Kanals bzw. Öffnen des Pfropfens führen könnte, ist die Bindung eines an der Translokation beteiligten Proteins (z. B. das Ribosom). Diese Vermutung wird von experimentellen Untersuchungen gestützt, die gezeigt haben, dass sich die Ionenleitfähigkeit erhöht, wenn ein Ribosom im nicht-translozierenden Zustand an dem Proteinkanal gebunden ist [127]. Dies hat zur Folge, dass die Abdichtung des Kanals nicht mehr vollständig gegeben ist. Des Weiteren bindet das Ribosom ausschließlich an den Loop-Bereichen der intrazellulären Seite und würde somit eine Bewegung der TM-Bereiche des Proteinkanals nicht behindern. Neuere Kryo-EM-Daten eines SecY-Komplexes aus *E. coli*, der an ein Ribosom gebunden ist, zeigen einen translozierenden und einen nicht-translozierenden Proteinkanal. Mit Hilfe der bekannten Kristallstruktur des SecY-Komplexes aus *M. jannaschii* konnten somit erstmals Strukturdaten einer möglichen aktiven Konformation eines Proteinkanals modelliert werden [128].

Mit diesen Daten (Kristallstruktur des SecY-Komplexes und modellierte aktive Struktur des Proteinkanals) wurden in dieser Arbeit MD-Simulationen durchgeführt, die den Proteinkanal in einer möglichen translozierenden, sowie einer nicht-translozierenden Konformation unter-

suchen. Es wird angenommen, dass die Aktivierung des Kanals im Falle der cotranslationalen Translokation durch Bindung des Ribosoms an den Proteinkanal ausgelöst wird. Die Translokation eines Polypeptids beruht auf einem Modell, das im Folgenden erklärt wird und in der **Abb. 5.3** schematisch dargestellt ist.

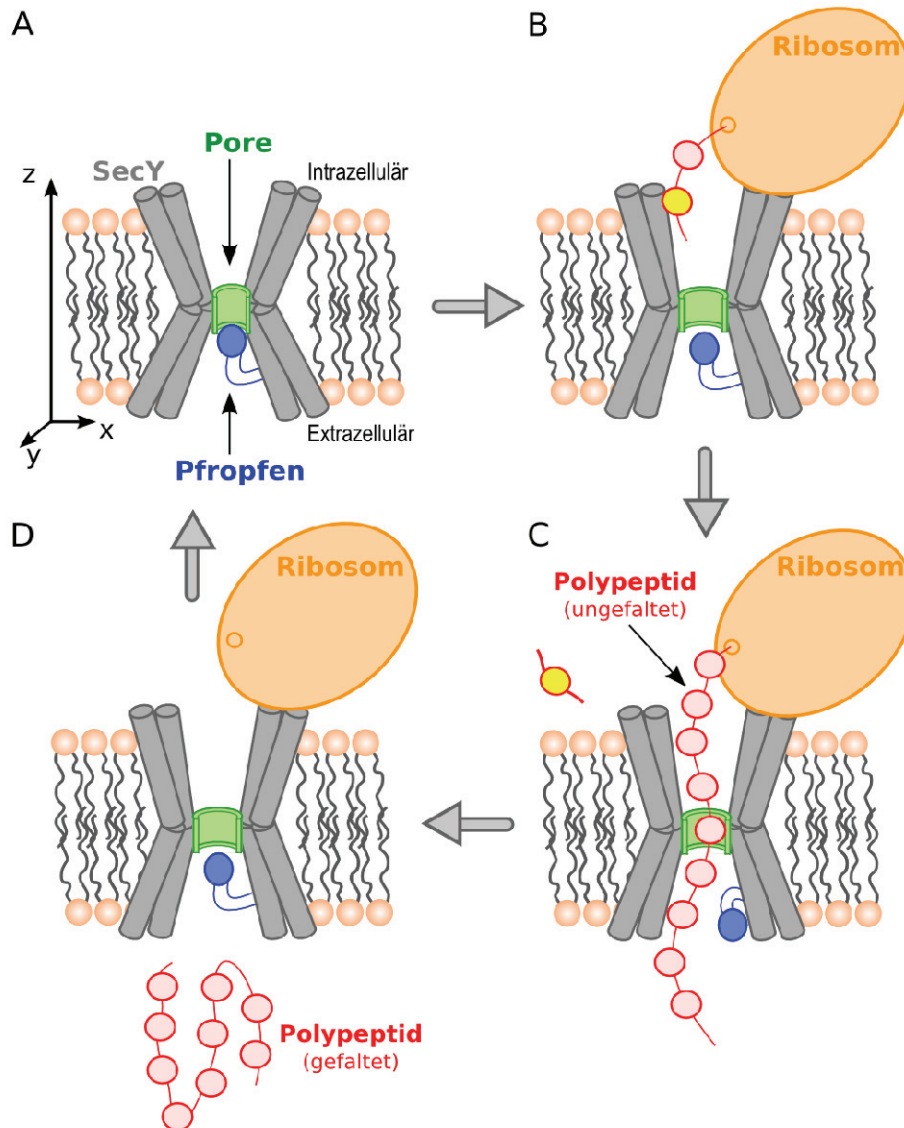


Abb. 5.3

Schematisches Modell zum Ablauf der cotranslationalen Translokation. Der Proteinkanal (hier ist nur die Untereinheit SecY dargestellt) ist in der Membran eingebettet. (A) Im nicht aktivierten Zustand ist die Pore geschlossen und der Pfropfen sitzt fest auf der Pore des Kanals. (B) Nach einer Aktivierung durch das Ribosom (Andocken an den Proteinkanal und Anlagerung der Signalsequenz des Polypeptids – Polypeptidkette als rote Perlenkette, Signalsequenz als roter Kreis mit gelber Füllung gezeigt) wird eine Konformationsänderung in SecY vermutet. Dadurch lockert sich die Bindung des Pfropfens und die Pore vergrößert sich. (C) Das Polypeptid wird direkt vom Ribosom durch den Kanal befördert. (D) Nach vollendeter Translokation schließt sich der Pfropfen wieder und das Polypeptid kann in seinen gefalteten Zustand übergehen. Nach Abdocken des Ribosoms kommt es erneut zu einer Konformationsänderung und der Proteinkanal geht wieder in seinen Ursprungszustand (A) über und dichtet die Membran somit wieder ab.

Der Einfachheit halber ist nur die SecY-Untereinheit, eingebaut in die Membran, dargestellt. Der Kanal ist in grau, die Pore in grün und der Pfropfen in blau gezeigt. Im nicht aktivierten Zustand ist die Pore geschlossen und der Proteinkanal undurchlässig (Abb. 5.3A). Durch Bindung des Ribosoms und Anlagerung der Signalsequenz der Polypeptidkette an die SecY-Untereinheit (Abb. 5.3B), ändert sich die Konformation, wodurch die Bindung des Pfropfens gelockert wird und sich die Pore aufweitet. Im nächsten Schritt wird das ungefaltete Polypeptid durch die Pore auf die andere Seite der Membran geschoben (Abb. 5.3C). In dieser Zeit kann sich der Pfropfen nicht zur Porenöffnung zurückbewegen. Nach vollendeter Translokation kann das Polypeptid in seine native Konformation falten. Die Signalsequenz wird zu einem nicht bekannten Zeitpunkt während der Translokation vom Polypeptid abgeschnitten und kann sich dann vom Proteinkanal lösen (Abb. 5.3D). Anschließend kann sich der Pfropfen wieder zur Porenöffnung bewegen und nach Abdocken des Ribosoms kommt es erneut zu einer Konformationsänderung, die den Proteinkanal in die inaktive, nicht-translozierende Konformation und damit in den Ausgangszustand überführt. Der Proteinkanal bildet wieder eine zuverlässige Abdichtung der Membran. In diesem Modell wird nicht berücksichtigt, ob es sich um einen einzelnen Proteinkanal oder ein Komplex, bestehend aus mehreren Proteinkanälen handelt, wie dies in der Literatur beschrieben wird. Es wird lediglich angenommen, dass der Prozess der Translokation durch den Kanal eines einzelnen SecY- bzw. Sec61-Komplexes erfolgt [129, 130].

MD-Simulationen in Kombination mit Strukturdaten in atomarer Auflösung können einen detaillierten Einblick in die Prozesse der Proteintranslokation geben, was zum allgemeinen Verständnis und zur Aufklärung bislang unbeantworteter Fragestellungen beiträgt. So ist bislang unbekannt, was eine mögliche aktive Konformation, wie sie in den Kryo-EM-Daten gefunden wurde, für Auswirkungen auf die Abdichtung des Kanals oder die Bindung des Pfropfens im Kanal hat. Aufgrund der typischen Zeitskalen der Proteintranslokation, die typischerweise im Millisekunden- bis Sekundenbereich liegen, reichen die heutzutage üblichen Simulationszeiten (\sim ns) nicht aus, um den gesamten Prozessablauf in „Echtzeit“ zu simulieren. In diesem Fall können SMD-Simulationen (siehe Kapitel 2.2.1. *Steered Molecular Dynamics*) Abhilfe schaffen. Durch eine äußere Kraft wird das System getrieben und der untersuchte Prozess auf die verfügbare Simulationszeit beschleunigt.

5.2. Untersuchte Systeme und Simulationsdetails

Die wenigen bislang veröffentlichten Arbeiten zu MD-Simulationen an Proteintranslokationskanälen wurden am SecY-Komplex oder an Untereinheiten dieses Komplexes in der inaktiven Konformation, basierend auf der Kristallstruktur gemacht [125, 131]. Die SMD-Simulationen zur Translokation einer α -Helix ließen qualitative Aussagen über Bindung und Öffnungsmechanismus des Pfropfens bzw. Flexibilität der SecY-Untereinheit zu. Darüber hinaus wurde der Mechanismus zum Einbau von Proteinen in die Membran und eine mögliche Dimerisierung des Proteinkanals untersucht. Ausgangspunkt für diese Simulationen war die inaktive Konformation, d. h. dass sich der Pfropfen in der geschlossenen Position im Kanalbereich befand. Um eine Öffnung zu induzieren wurde eine α -Helix oder eine Kugel durch den Kanal geschoben. Dazu wurden Kräfte bis zu ~ 1000 pN angelegt, wodurch sich die Pore weitete und der Pfropfen aus dem Kanalbereich gedrückt wurde. Eine Konformationsänderung infolge der Bindung eines Ribosoms oder eines weiteren Bindungspartners wurde nicht berücksichtigt. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten MD-Simulationen am Proteinkanal SecY untersuchten die Bindung des Pfropfens, die Abdichtung des Kanals, die Translokation kleiner Moleküle, sowie die Relaxation des Proteinkanals sowohl an der inaktiven Konformation als auch an einer möglichen aktiven Form. Dazu wurden MD- sowie SMD-Simulationen an unterschiedlichen Systemen durchgeführt, bei denen sich einerseits der Pfropfen des Proteinkanals in einer offenen bzw. geschlossenen Stellung befand und andererseits der Proteinkanal in einer inaktiven bzw. aktiven Konformation vorlag. Anhand von multiplen SMD-Simulationen, gekoppelt mit einer statistischen Analyse wurde versucht, nicht nur qualitative Aussagen machen zu können, sondern die Bindung des Pfropfens im Kanal in der inaktiven sowie aktiven Konformation quantitativ zu bewerten. **Abb. 5.4** zeigt einen Überblick über die in diesem Kapitel gemachten Simulationen.

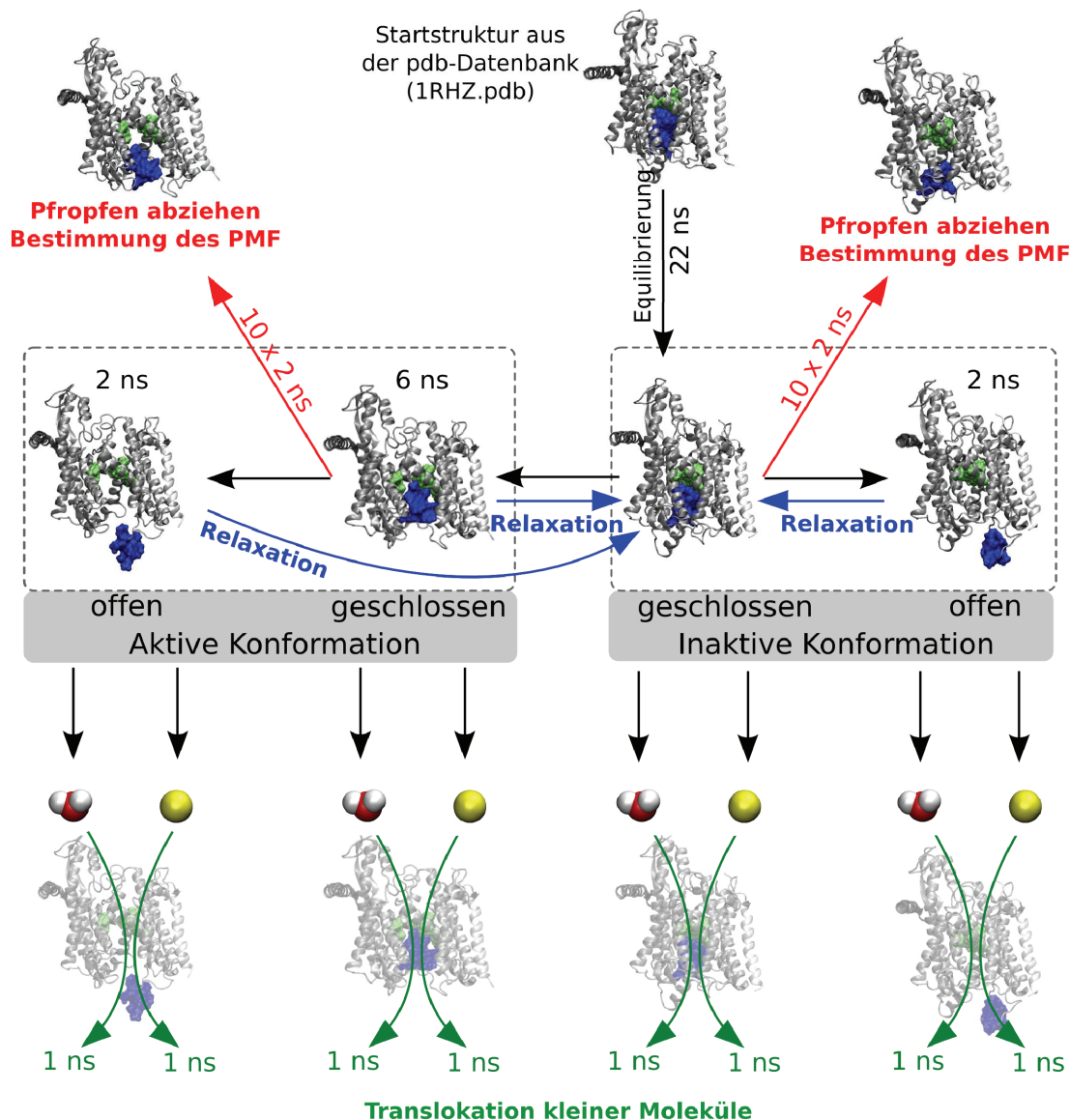


Abb. 5.4

Schematische Darstellung der durchgeführten Simulationen. Ausgangspunkt war die Kristallstruktur 1RHZ.pdb aus der Protein-Datenbank für den SecY-Komplex. Von dieser Struktur wird angenommen, dass sie in einer inaktiven Konformation vorliegt, in dieser Form also keine Proteine transloziert. Eine aktive, translozierende Form wurde anhand von Kryo-EM-Daten eines äquivalenten Proteinkanals modelliert. An diesen Systemen wurden folgende Simulationen durchgeführt: Bestimmung des PMFs beim Abziehen des Pfropfens (rot), Relaxation aus verschiedenen Konformationen in den Ausgangszustand (blau) und Untersuchung der Translokation kleiner Moleküle (grün). Die eingetragenen Zeiten beziehen sich auf die Dauer der Simulationen der jeweiligen Systeme.

Ausgangspunkt war die Kristallstruktur 1RHZ aus der Protein-Datenbank. Diese Startstruktur wurde in einer Lipid-Wasser-Umgebung equilibriert und wird im Folgenden als *inaktiv geschlossene* Konformation bezeichnet. Die Pore dichtet hierbei den Kanal ab (*inaktiv*) und der Pfropfen sitzt im Kanalbereich unterhalb der Pore (*geschlossen*). Aus dieser Struktur wurde mittels SMD-Simulationen der Pfropfen entfernt. Nach erneuter Equilibrierung erhält man eine Struktur, die mit *inaktiv offen* bezeichnet wird. Die Porenregion bleibt hierbei unverändert. Die *inaktiv geschlossene* Konformation wurde mittels MD-Simulationen so verän-

dert, dass die Porenregion der modellierten Struktur, basierend auf Kryo-EM-Daten der translozierenden Konformation, entspricht. Die nach Equilibrierung erhaltene Struktur wird mit *aktiv geschlossen* gekennzeichnet. Auch bei dieser Struktur wurde der Pfropfen mittels SMD-Simulationen aus der Kanalregion herausgezogen; die neue Struktur wurde ebenfalls equilibriert. Sie stellt die *aktiv offene* Konformation dar. An diesen Systemen wurden Simulationen durchgeführt, die im Folgenden kurz vorgestellt werden.

Die Änderung der Freien Energie beim Abziehen des Pfropfens aus der Pore des Proteintranslokationskanals sowohl in *inaktiver* als auch *aktiver* Konformation wurde mittels multiplen SMD-Simulationen bestimmt (Abb. 5.4, rot). Bei den Strukturen *inaktiv offen*, *aktiv geschlossen* und *aktiv offen* wurde mittels MD-Simulationen die Relaxation in den Ausgangszustand, also in die *inaktiv geschlossene* Konformation untersucht (Abb. 5.4, blau). Darüber hinaus wurde in allen Konformationen die Translokation eines Wassermoleküls und eines Ions durch die Porenregion des Proteinkanals simuliert, um Aussagen über die möglichen Einflüsse der Konformationen auf die Abdichtung des Proteinkanals machen zu können (Abb. 5.4, grün).

Alle Simulationen sind mit dem Programm NAMD durchgeführt worden [30]. Als Kraftfeld kam CHARMM 27 zum Einsatz [29]. Der Integrationszeitschritt lag bei 1 fs. Van der Waals-Wechselwirkungen wurden für jeden Zeitschritt mit einem *Cutoff* von 10 Å und einer *Switching function* berechnet. Zur Berechnung der elektrostatischen Wechselwirkung kam die *Particle Mesh Ewald* (PME)-Methode [36] mit einem Multi-Zeitschritt-Algorithmus zum Einsatz. Dabei wurde ein 10 Å Abschneideradius zur Berechnung der Summe im Realraum und ein Rasterabstand von 1 Å für die reziproke Summe im Fourierraum verwendet. Das System wurde mit periodischen Randbedingungen bei einer Temperatur von 300 K und einem Druck von 1 bar unter Verwendung der *Langevin-Piston*-Methode [40], mit einer Oszillationsperiode von 200 fs und einer Dämpfungszeit von 100 fs, simuliert.

5.3. Equilibrierung der Startstruktur von SecY

Die Startstruktur des SecY-Komplexes wurde nach Hinzufügen von Wasserstoffatomen in eine Doppellipidschicht eingebaut, so dass der hydrophobe Bereich des Proteins maximal durch den hydrophoben Bereich der Membran abgedeckt wurde. Anschließend wurde das gesamte System mit einer Wasserbox versehen. Mit Hilfe des VMD-Plugins *Solvate* konnten dem Gesamtsystem Ionen hinzugefügt werden, so dass ein Ladungsausgleich vorhanden war und eine gewünschte Salzkonzentration eingestellt werden konnte. Das Programm verwendet

hierfür Natrium- und Chloridionen als Standardionen. Der Aufbau des Simulationssystems ist in **Abb. 5.5** gezeigt. In der Abbildung sieht man eine Seitenansicht auf die Einheitszelle.

Abb. 5.5A zeigt die Proteinstruktur des Proteintranslokationskanals, in **Abb. 5.5B** sieht man das System nach Einbau der Doppellipidschicht und in **Abb. 5.5C** wurde die Wasserbox hinzugefügt. Die Proteinstruktur ist in grau (Cartoon-Darstellung), die Pore und der Pfropfen sind in grün bzw. blau (Surface-Darstellung) eingezeichnet. Wasser- und Lipidmoleküle wurden der besseren Übersicht wegen zum Teil nicht eingezeichnet. Zu erkennen ist, dass die Lipidmoleküle eine geordnete Struktur aufweisen und die Wassermoleküle nur oberhalb und unterhalb der Doppellipidschicht zu finden sind. Die Kanalregion ist frei von Wassermolekülen. Ionen sind in der Abbildung nicht eingezeichnet.

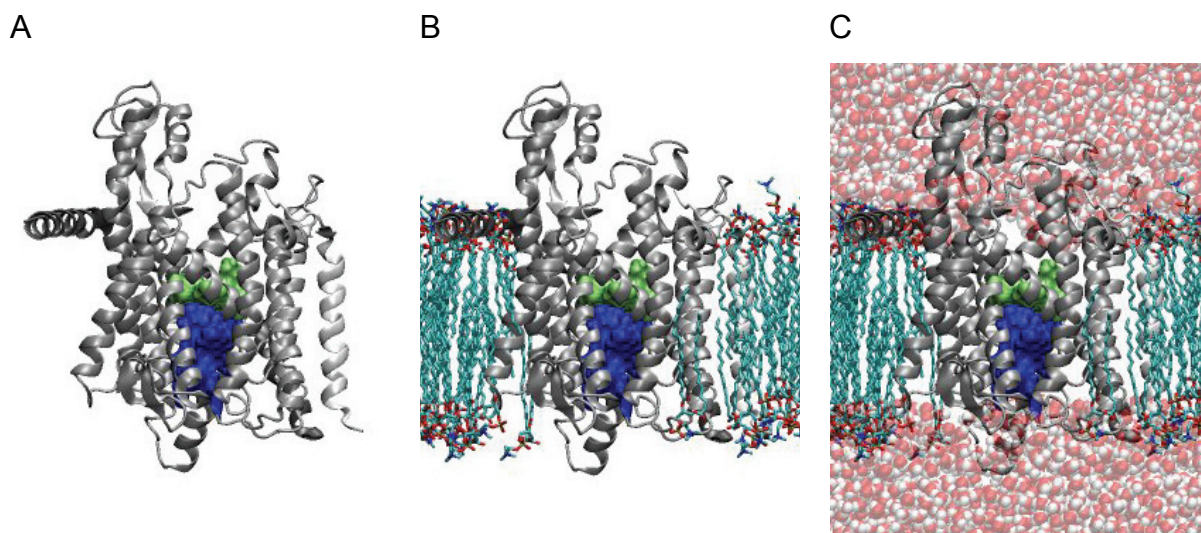


Abb. 5.5

Zusammenbau der Startstruktur. Das Protein ist in grau (Cartoon-Darstellung), die Pore und der Pfropfen sind in grün bzw. blau (Surface-Darstellung) eingezeichnet. Lipide und Wasseratome sind in (B) und (C) zur besseren Übersicht nur teilweise dargestellt. (A) Seitenansicht auf die Proteinstruktur. (B) Einbau des Proteinkanals in die Doppellipidschicht. (C) Hinzufügen der Wasserbox (Ionen sind nicht eingezeichnet).

Das Gesamtsystem besteht aus insgesamt 122320 Atomen. Hiervon entfallen 8464 Atome auf das Protein, 35510 auf die Lipide, 78321 auf die Wassermoleküle und 25 entsprechen den Ionen (7 Natrium- und 18 Chloridionen). Die Einheitszelle hatte nach Zusammenbau die Maße 125 Å x 128 Å x 115 Å). Diese Startstruktur wurde einer Reihe von Energieminimierungs- und Equilibrierungsschritten unterzogen, um überlappende Atome zu beseitigen und die Struktur an die gewünschten Umgebungsbedingungen, wie Temperatur und Druck anzupassen und eine Gleichgewichtsstruktur zu erhalten. Diese Schritte sind im Folgenden kurz zusammengestellt.

Minimierung: Das Proteinrückgrat des Proteinkanals wird mit einem harmonischen Constraint festgehalten, die übrigen Atome wurden energieminiert. Damit lassen sich potentielle „Energiespitzen“, die aufgrund der Van der Waals-Wechselwirkung überlappender, oder dicht beieinander liegender Atome entstehen, bereinigen, indem die Positionen der Atome gemäß dem Gradienten der potentiellen Energie verändert werden, bis ein lokales Minimum erreicht ist, oder ein festgelegter Grenzwert unterschritten wird. Für die Energieminimierung des Systems wurde sowohl die *Steepest Descent*-, als auch die *Conjugate Gradient*-Methode verwendet.

Equilibrierung des Lösungsmittels: Der Proteinkanal wird mit einem harmonischen Constraint von $70 \text{ pN}/\text{\AA}$ festgehalten und die Lipide und Wassermoleküle werden equilibriert. Das System wird von 0 K entsprechend einer Temperaturrampe auf 300 K aufgeheizt. Dabei kommt es zum Auftauen von Freiheitsgraden der Lipide, was dazu führt, dass die Lipidschwänze ihre anfängliche geordnete Struktur verlieren und sich Wassermoleküle zwischen die hydrophilen Kopfgruppen der Lipide einlagern. Die Simulation wurde im NVT-Ensemble durchgeführt. Die Simulationszeit betrug insgesamt 400 ps.

Equilibrierung der Seitenketten der Aminosäuren des Proteinkanals: In einer weiteren Simulation wird der harmonische Constraint der Seitenketten von einem Anfangswert von $70 \text{ pN}/\text{\AA}$ auf $0 \text{ pN}/\text{\AA}$ reduziert. Die Seitenkettenatome können sich am Ende der Simulation frei bewegen. Es wurde im NPT-Ensemble bei einer konstanten Temperatur von 300 K und bei einem konstanten Druck von 1 bar simuliert. Die Simulationszeit betrug 300 ps.

Equilibrierung des Gesamtsystems: In einem letzten Schritt wurde der Constraint auf die Atome des Proteinrückgrats des Proteinkanals innerhalb der ersten Nanosekunde auf $0 \text{ pN}/\text{\AA}$ reduziert, mit dem Ergebnis, dass das System frei equilibrieren kann. Es wurde im NPT-Ensemble bei einer konstanten Temperatur von 300 K und einem konstanten Druck von 1 bar simuliert. Die Simulationszeit betrug 22 ns.

5.3.1. Ergebnisse und Diskussion

Abb. 5.6 zeigt das Gesamtsystem nach der Equilibrierung sowie relevante Simulationsdaten. Die Gesamtenergie des Systems sowie das Systemvolumen sind in **Abb. 5.6A,B** für den Simulationszeitraum von 18 ns bis 22 ns gezeigt. Beide Systemparameter zeigen einen

stabilen Verlauf; es sind keine Trends zu erkennen. **Abb. 5.6C** zeigt die strukturelle Abweichung des Proteinkanals von der Startstruktur über den gesamten Verlauf der Simulation. Der RMSD-Wert wurde für jede Momentaufnahme der Simulation berechnet. Zur Berechnung wurden alle Atome des Proteinrückgrats verwendet und nach bestmöglicher Überlagerung mit der Startstruktur verglichen.

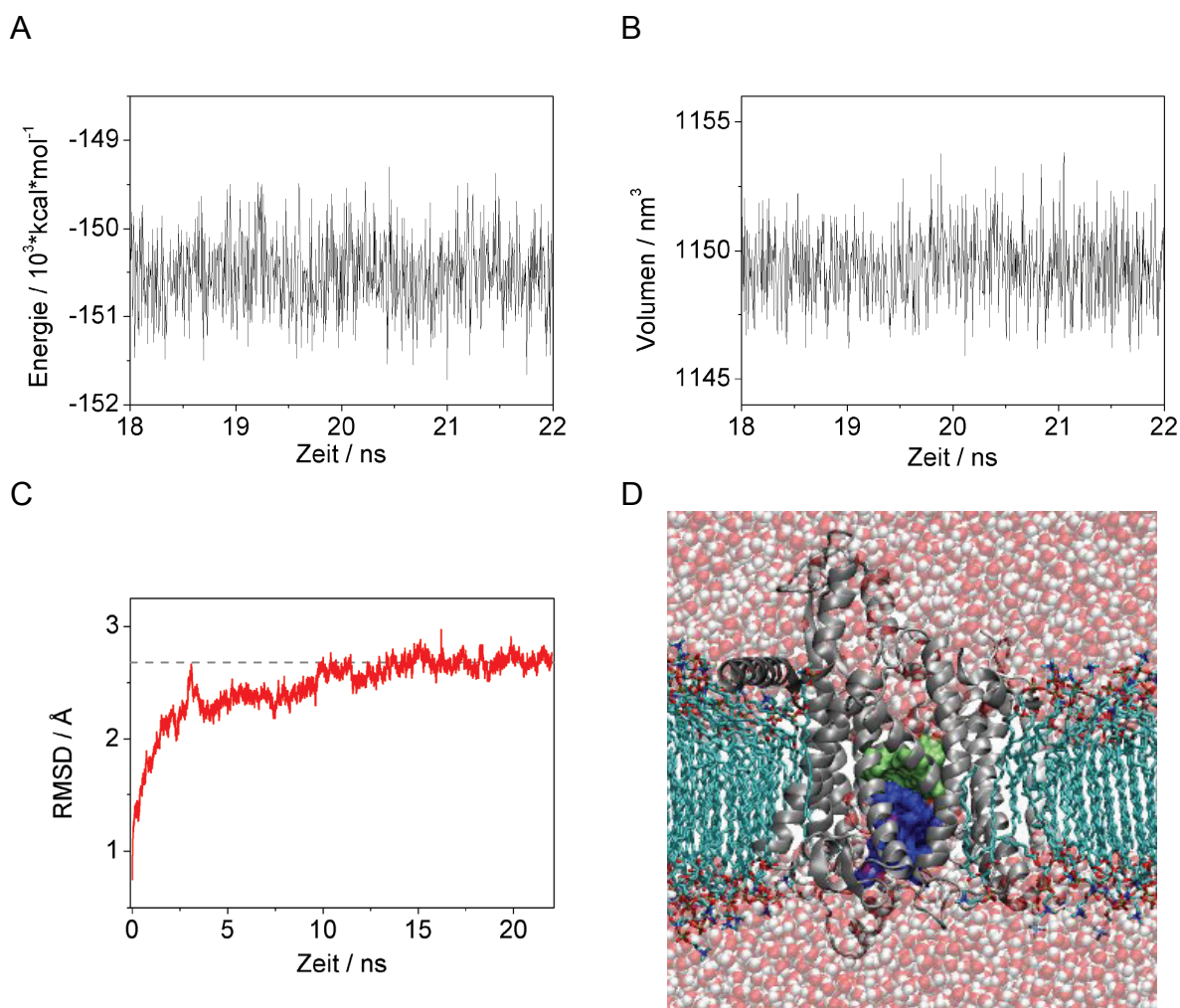


Abb. 5.6

Systemdaten bzw. strukturelle Daten der Equilibrierung der Startstruktur. (A) Gesamtenergie des Systems. (B) Volumen des Gesamtsystems. (C) Strukturelle Abweichung des Proteinrückgrats von der Startstruktur. (D) Seitenansicht auf die equilibrierte Struktur des Proteinkanals. Das Proteinrückgrat ist in grau (Cartoon-Darstellung), der Pfropfen und die Pore in blau bzw. grün (Surface-Darstellung) gezeigt. Lipid- bzw. Wasseratome sind der Übersicht wegen teilweise weggelassen.

Der RMSD-Wert steigt anfänglich auf einen Wert von ca. 2.3 Å in den ersten 5 ns an. Die strukturelle Abweichung stabilisiert sich im weiteren Verlauf der Simulation bei einem RMSD-Wert von ca. 2.7 Å; während der letzten 10 ns bleibt der RMSD-Wert nahezu konstant. Die strukturelle Abweichung des Proteinkanals im Verlauf der Simulation ist vergleichbar mit anderen MD-Simulationen, die an SecY bereits durchgeführt wurden und

liegt im Bereich, den man für einen Proteinkomplex erwartet [132, 133]. Die Sekundärstruktur bleibt während der Simulation größtenteils erhalten. Der Proteinkanal besteht aus insgesamt drei Untereinheiten. Die visuelle Inspektion der Simulation zeigt, dass sich diese gegeneinander verschieben und so zu einem Teil der strukturellen Abweichung beitragen, insbesondere zu strukturellen Veränderungen auf längeren Zeitskalen. Dazu kommt, dass sich im intrazellulären Bereich die hydrophilen Bereiche, insbesondere die Loop-Regionen während der Simulation verändern. Im Transmembranbereich, der für die Untersuchung der Pore und des Pfropfens von besonderer Wichtigkeit ist, kommt es zu keinen merklichen strukturellen Veränderungen oder gar zu einem Verlust der Sekundärstruktur. Der Kanal scheint sich im Verlauf der Simulation im Vergleich zur Kristallstruktur geringfügig zu verdichten. Die Lipide passen sich der hydrophoben Außenseite des Proteins an und bedecken diesen Bereich vollständig. Die Doppellipidschicht stabilisiert sich bei einer Höhe von ca. 37 Å (Mittlerer Abstand der Phosphoratome der Kopfgruppen), was ein typischer Wert für die Membrandicke in Simulationen entspricht [96]. Zu Beginn der Simulation kann man erkennen, dass der Kanalbereich nicht mit Wassermolekülen gefüllt war (siehe **Abb. 5.6C**). Dies ändert sich im Laufe der Equilibrierung, indem Wassermoleküle von beiden Seiten der Membran in den Kanalbereich hinein diffundieren. Zum Ende der Simulation hat sich der Kanalbereich des Proteinkanals komplett mit Wasser gefüllt (siehe **Abb. 5.6D**). Es ist zu erwähnen, dass sowohl die Doppellipidschicht, als auch der Proteinkanal für Wassermoleküle während der Simulation undurchlässig waren und kein Übertritt der Wassermoleküle von der einen Seite der Membran auf die andere Seite der Membran möglich war. Die Wassermoleküle sind weder in der Lage, in die hydrophoben Bereiche der Lipide oder der Lipid-Protein-Grenzfläche einzudringen, noch die Pore bzw. den Pfropfen des Proteinkanals zu passieren. Während der Simulation wurden Wassermoleküle beobachtet, die sich der Pore von beiden Seiten aus genähert haben, diese jedoch nicht überschreiten konnten. Der Pfropfen sitzt während des gesamten Verlaufs der Simulation eng an der Pore. Eine analoge Aussage über das Permeabilitätsverhalten von Ionen kann aufgrund der zu geringen Ionenkonzentration nicht gemacht werden.

Die Equilibrierung der Startstruktur in einer Lipid-Wasser-Umgebung führt zu einem stabilen System, das gerade im wichtigen Transmembranbereich große strukturelle Stabilität zeigt. Der Einbau des Proteinkanals in die Membran führt nicht zu einem Verlust der Abdichtung gegenüber Wassermolekülen. Die equilibrierte Struktur ist in der *inaktiv geschlossenen* Konformation und dient als Ausgangspunkt für weitere Simulation.

5.4. Simulation der aktiv geschlossenen Konformation des Proteinkanals SecY

Elektronenmikroskopische Untersuchungen haben gezeigt, dass der Proteintranslokationskanal SecY aus *E. coli* bei Bindung an das Ribosom in zwei verschiedenen Konformationen auftreten kann: in einer nicht-translozierenden und in einer translozierenden Konformation.

Nach Zugabe von SecY zu einer Ribosom-Lösung konnten zwei unterschiedliche Bindungsstellen identifiziert werden, an denen sich SecY an das Ribosom anlagern konnte. Die Konformation von SecY war an beiden Bindungsstellen unterschiedlich.

Zum einen kann SecY an die Austrittsstelle der Polypeptidkette des Ribosoms binden; diese Bindungsstelle besitzt somit eine physiologische Relevanz. Zum anderen bindet SecY an die Austrittsstelle der mRNA des Ribosoms, einem Bereich des Ribosoms, der nicht direkt an der Proteintranslokation beteiligt und somit als physiologisch nicht relevant in Bezug auf die Proteintranslokation ist.

Aufgrund der physiologischen Relevanz der Bindungsstellen, wird vermutet, dass es sich bei der Konformation des Proteinkanals an der Austrittsstelle der Polypeptidkette des Ribosoms um die translozierende Konformation handelt, wohingegen die Konformation des Proteinkanals, die an der Austrittsstelle der mRNA gefunden wurde, die nicht-translozierende Konformation darstellt.

Ein Vergleich der EM-Daten mit der Kristallstruktur der inaktiven Form des Proteinkanals von *M. jannaschii* bekräftigt diese Aussage. Eine gute Übereinstimmung konnte nur mit der Konformation des Proteinkanals erzielt werden, die an der physiologisch nicht-relevanten Bindungsstelle gefunden wurde. Die EM-Daten des Proteinkanals, gebunden an der physiologisch relevanten Bindungsstelle des Ribosoms, ergaben nur mit einer veränderten Kristallstruktur eine gute Übereinstimmung.

Die benötigten strukturellen Veränderungen wurden mit Hilfe der *Normal Mode Based Flexibe Fitting*-Methode (NMFF) [134], einem flexiblen Fit-Verfahren basierend auf einer Normalmodenanalyse bestimmt. Mit Hilfe von Normalmoden lassen sich kollektive Bewegungen der Struktur berechnen. Auf Basis dieser Bewegungen wurden Konformationsänderungen der Kristallstruktur des Proteinkanals durchgeführt, um eine bestmögliche Übereinstimmung mit den EM-Daten zu erreichen. Aus den EM-Daten konnten somit zwei Strukturen abgeleitet werden.

In der Proteindatenbank sind die translozierende (aktive) Struktur des Proteinkanals mit dem Namen 2AKH und die nicht-translozierende (inaktive) Konformation des Proteinkanals mit

dem Namen 2AKI abgelegt. Zu beachten ist dabei, dass nur die C_{α} -Atome des Proteinrückgrats des Kanals bekannt sind.

Um die Strukturen in dieser Arbeit einsetzen zu können, wurden sie mit der equilibrierten Startstruktur 1RHZ, der *inaktiv geschlossenen* Konformation, bestmöglich überlagert. Für die Überlagerung wurden nur die helikalen Bereiche der SecY-Untereinheit verwendet. Das Ergebnis ist in **Abb. 5.7** in der Aufsicht dargestellt. Die helikalen Bereiche der drei Strukturen sind in Cartoon-Darstellung, die C_{α} -Atome der Aminosäuren, die die Pore bilden, sind in Van der Waals-Darstellung gezeigt. Die Referenzstruktur der SecY-Untereinheit aus 1RHZ ist grün angefärbt, gelb eingefärbt ist die gefittete Struktur der nicht-translozierenden Konformation (2AKI) basierend auf den Kryo-EM-Daten und blau die gefittete Struktur der translozierenden Konformation (2AKH), ebenfalls basierend auf Kryo-EM-Daten.

Eine Übereinstimmung ist zwischen der Referenzstruktur (grün) und der nicht-translozierenden Konformation des Proteinkanals (gelb) zu erkennen. Die translozierende Konformation des Proteinkanals (blau) weicht deutlich von der Referenzstruktur ab.

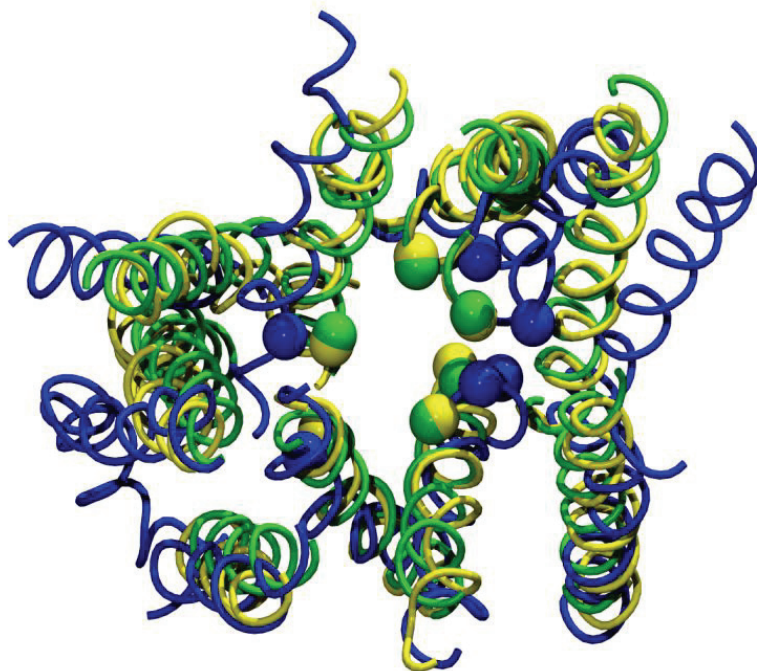


Abb. 5.7

Struktureller Vergleich der Proteinkanäle aus den Strukturen der Proteindatenbank 1RHZ (grün – Kristallstruktur des Proteinkanals), 2AKH (gelb – gefittete nicht-translozierende Struktur basierend auf Kryo-EM-Daten) und 2AKI (blau – gefittete translozierende Struktur basierend auf Kryo-EM-Daten); Die C_{α} -Atome sind in Cartoon-Darstellung gezeigt, die Atome der Pore in Van der Waals-Darstellung.

Die strukturelle Abweichung (RMSD-Werte der C_{α} -Atome der helikalen Bereiche in der Porenregion) zwischen der equilibrierten Startstruktur 1RHZ (*inaktiv geschlossene* Konformation) und der nicht-translozierenden EM-Struktur 2AKI beträgt ca. 1.62 Å, zwischen der equilibrierten Startstruktur 1RHZ und der translozierenden EM-Struktur 2AKH beträgt der RMSD-Wert 4.37 Å. Die Pore, hervorgehoben durch die in Van der Waals-Darstellung gezeigten Atome, ist in der translozierenden Struktur geweitet. Die helikalen Bereiche liegen weiter vom Zentrum der Pore (Mittelpunkt der Abbildung) entfernt als im nicht-translozierenden Fall.

Um die Referenzstruktur (*inaktiv*) in die Konformation der aktiven Struktur (2AKH) zu überführen, wurde eine künstliche Konformationsänderung an der equilibrierten Startstruktur durchgeführt. Hierzu wurden harmonische Constraints auf vier helikale Bereiche in direkter Umgebung der Porenregion angelegt, um diese Helizes während einer MD-Simulation auf die Position der entsprechenden helikalen Bereiche in 2AKH (blaue Struktur in **Abb. 5.7**) zu bewegen. Eine Überlagerung jedes einzelnen helikalen Bereichs auf die entsprechende helikale Struktur der Zielstruktur diente zur Bestimmung der Referenzpositionen der verwendeten Constraints. Dies führte dazu, dass sich die helikalen Strukturen als Ganzes bewegten, und dass die Sekundärstruktur erhalten wurde. Dieser Vorgang ist schematisch in **Abb. 5.8** dargestellt.

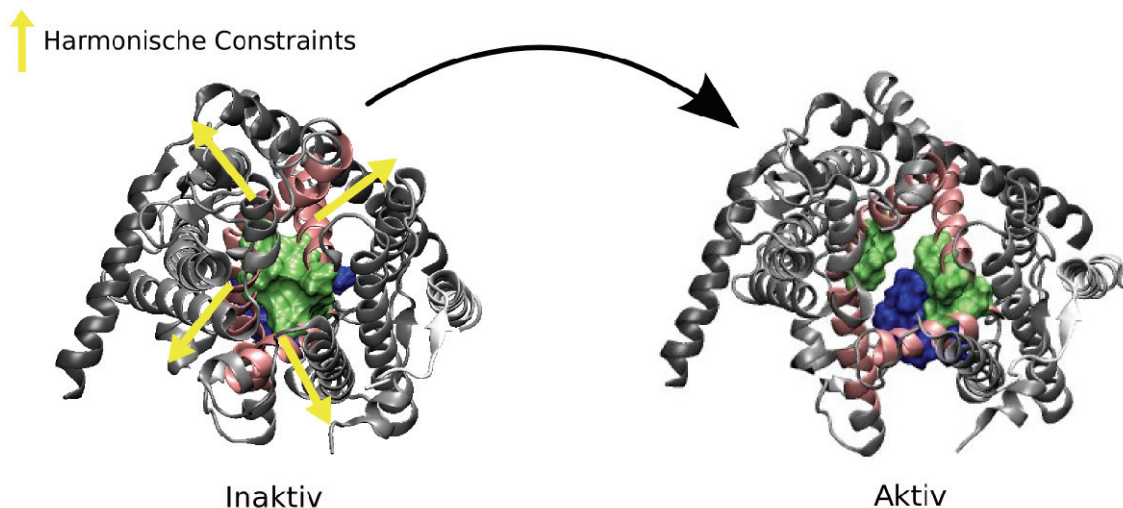


Abb. 5.8

Schematische Darstellung des Übergangs der Referenzstruktur aus der inaktiven in die aktive Konformation. Mit Hilfe von harmonischen Constraints wurden Teile der equilibrierten Startstruktur (rosa eingefärbte α -Helizes) in die neue Konformation überführt (Andeutung der Bewegung durch die gelben Pfeile, linker Teil der Abbildung). Die veränderte Struktur (aktive Konformation) ist im rechten Teil der Abbildung dargestellt. Das Protein ist in grau (Cartoon-Darstellung) gezeigt, die Pore und der Pfropfen sind in grün bzw. blau (Surface-Darstellung) eingezeichnet.

Das Protein ist in grau, die helikalen Bereiche der Porenregion sind in rosa eingefärbt. Zusätzlich zur Proteinstruktur und der Porenregion sind die Pore in grün und der Pfropfen in blau hervorgehoben. Im linken Teil der Abbildung ist die Aufsicht auf die equilibrierte Startstruktur 1RHZ (*inaktiv geschlossene* Konformation) gezeigt. Die Pfeile sollen die Bewegungsrichtungen andeuten, in die die helikalen Bereiche auf Grund der harmonischen Constraints bewegt werden. Im rechten Teil der Abbildung ist die Endstruktur ebenfalls als Aufsicht gezeigt. Es ist deutlich zu erkennen, dass sich die Porenregion (grün) geweitet hat und jetzt keine geschlossene Oberfläche mehr erkennbar ist. Unterhalb der Pore ist bereits der Pfropfen (blau) zu sehen.

Die MD-Simulation erfolgte unter Verwendung derselben Simulationsparameter, wie bei der Equilibrierung der Startstruktur. Zusätzlich kamen harmonische Constraints zum Einsatz, die auf insgesamt 70 C_{α} -Atome der helikalen Bereiche der Porenregion gewirkt haben.

Die Stärke der Constraints erhöhte sich kontinuierlich im Verlauf einer Simulationsdauer von 1 ns von anfänglich 0 pN/Å auf einen Endwert von 70 pN/Å. Die kontinuierliche Zunahme des Constraints gewährleistet, dass die Struktur ausreichend Zeit hat, sich auf die erzwungene Bewegung einzustellen und keine abrupten, hohen Kräfte auf das System wirken, die zu einer strukturellen Schädigung des Proteins führen. Zusätzlich wirkten die Constraints nur auf einen möglichst minimalen Bereich des Proteins. Die restliche Proteinstruktur diente als Puffer und veränderte sich entsprechend der Bewegung des Porenbereichs. Im Anschluss an die Einführung der Constraints, erfolgte eine Equilibrierung der Struktur bei aktiven Constraints für weitere 5 ns.

5.4.1. Ergebnisse und Diskussion

In der **Abb. 5.9** ist das Ergebnis der MD-Simulation der aktiven Struktur anhand der wichtigsten System- und Strukturgrößen zusammengefasst. Die Gesamtenergie des Systems ist in **Abb. 5.9A** dargestellt. Der Kurvenverlauf zeigt zwischen 4 ns und 6 ns einen stabilen Verlauf, zu Beginn ist eine minimale Abweichung der Energie von ihrem anfänglichen Wert zu sehen. Ein deutlicher Trend über den gesamten Verlauf der Simulation ist jedoch nicht zu erkennen. In **Abb. 5.9B,C** sieht man eine Überlagerung der Proteinstruktur des simulierten Proteinkanals (grün) mit der, anhand der Kryo-EM-Daten bestimmten Zielstruktur, translozierenden Konformation (blau). Diese Struktur entstand durch bestmögliche Überlagerung aller helikalen Bereiche der equilibrierten Startstruktur mit der Struktur 2AKH. Zu sehen ist eine Aufsicht von der intrazellulären Seite vor (**Abb. 5.9B**) und nach der Simulation (**Abb. 5.9C**). Die

Strukturen sind in Cartoon-Darstellung gezeichnet. Nur die helikalen Bereiche der SecY-Untereinheit sind zu sehen. Man kann erkennen, dass sich der zentrale Porenbereich (dazugehörige α -Helizes dick gezeichnet) sehr gut an die Zielstruktur angepasst hat.

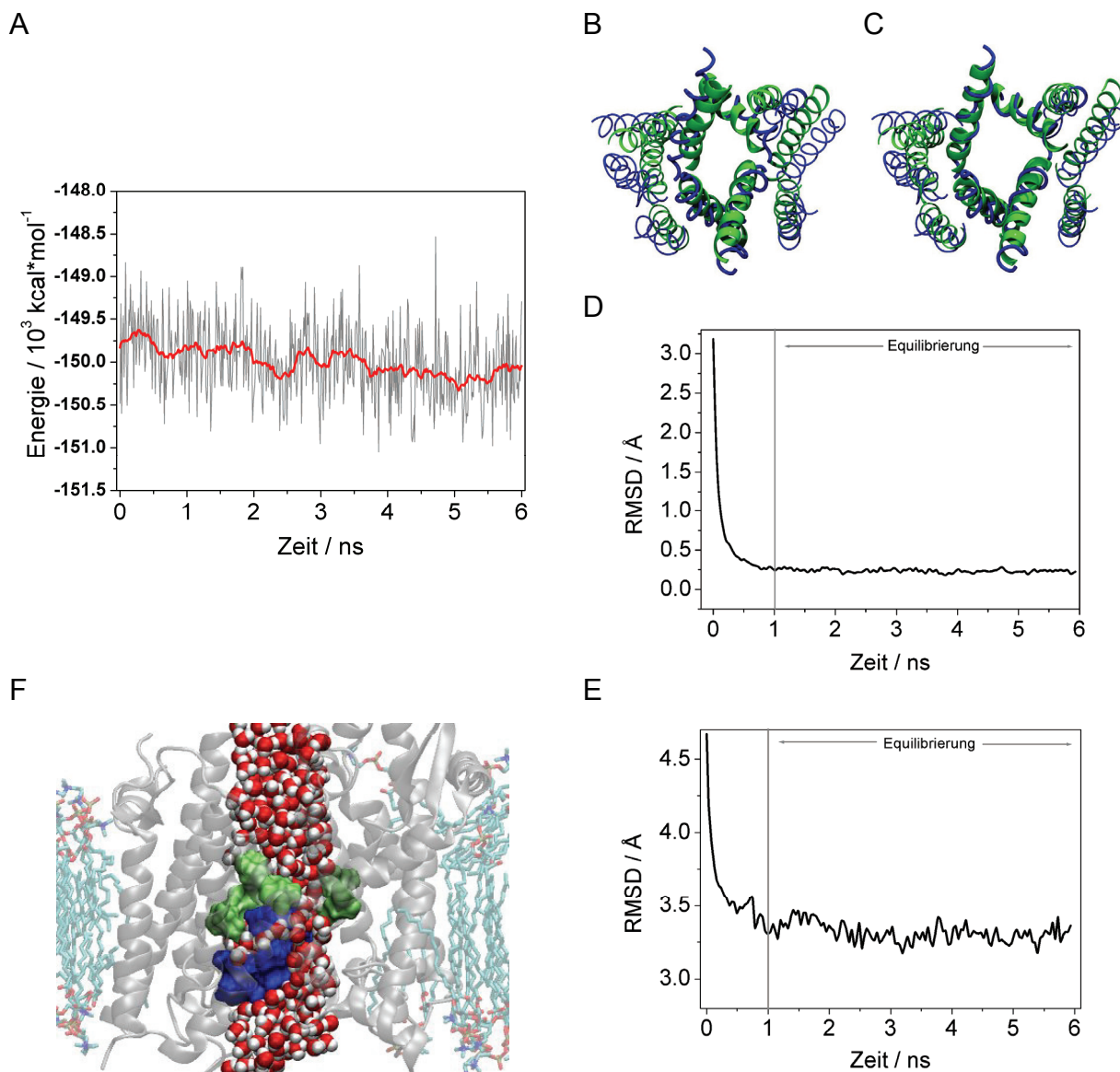


Abb. 5.9

System- und Strukturdaten Daten der Equilibration der aktiv geschlossenen Konformation. (A) Gesamtenergie des Systems. Strukturelle Überlagerung von Ist- und Sollstruktur vor (B) bzw. nach (C) der Simulation. Gezeigt ist das Proteinrückgrat der simulierten Struktur in grün, sowie die Zielstruktur in blau (Cartoon-Darstellung). (D) Strukturelle Abweichung des Proteinrückgrats des helikalen Porenbereichs bezüglich der Zielstruktur. (E) Strukturelle Abweichung des Proteinrückgrats bezüglich der Zielstruktur. (F) Seitenansicht auf den Proteinkanal nach der Equilibration in der aktiv geschlossenen Konformation. Das Proteinrückgrat ist transparent in Cartoon-Darstellung gezeigt. Die Pore und der Pfropfen sind in grün bzw. blau (Surface-Darstellung), relevante Wassermoleküle in Van der Waals-Darstellung eingezeichnet.

Dies ist nicht erstaunlich, da gerade in diesen Bereich der harmonische Constraint angelegt wurde. Die umliegende Struktur wird durch diese Constraints indirekt beeinflusst und reagiert ebenfalls mit einer strukturellen Veränderung. Die helikalen Segmente dieses Außenbereichs

nähern sich ebenfalls der Zielstruktur an, jedoch überlagern sich am Ende die gemittelte Endstruktur und die Zielstruktur nicht vollständig (Abb. 5.9C). Dies spiegelt sich auch in den RMSD-Daten der strukturellen Abweichung wieder. In Abb. 5.9D ist dies für den Verlauf der Simulation für die helikalen Bereiche der Porenregion gezeigt, in Abb. 5.9E für das gesamte Proteinrückgrat. In beiden Fällen erhält man einen qualitativ ähnlichen Gesamtverlauf. Innerhalb der ersten Nanosekunde bewegt sich das System, bedingt durch die harmonischen Constraints, auf die Zielstruktur zu und der RMSD-Wert sinkt im Falle des Porenbereichs von ca. 3 Å auf ca. 0.3 Å (Abb. 5.9D). Dies bedeutet eine nahezu perfekte Übereinstimmung des Proteinrückgrats der helikalen Segmente im Porenbereich. Der RMSD-Wert bleibt im weiteren Verlauf der Simulation konstant. Im Fall des Proteinrückgrats des gesamten Proteinkanals kommt es in der ersten Nanosekunde zu einer Annäherung an die Zielstruktur. Hier bewegt sich der RMSD-Wert von ca. 4.5 Å auf ca. 3.3 Å und stabilisiert sich im weiteren Verlauf der Simulation auf diesen Wert (Abb. 5.9E). Die strukturelle Veränderung der Ausgangsstruktur in die aktive Konformation und die anschließende Equilibrierungssimulation ergibt letztendlich ein strukturell stabiles System, das in der relevanten Porenregion sehr gut mit der modellierten Struktur übereinstimmt. Die Sekundärstruktur bleibt während der gesamten Simulation erhalten.

Die *aktiv geschlossene* Konformation weist eine geweitete Pore auf, was Auswirkungen auf die Abdichtung des Kanals hat. Wie man in der Abb. 5.9F deutlich erkennen kann, öffnet sich dadurch die Pore für Wassermoleküle, die bereits nach kurzer Zeit die Porenregion durchqueren können.

Die Methode der *Normal Mode Based Flexible Fitting* erlaubt die Lokalisierung und Positionierung von Sekundärstrukturelementen, wie z.B. α -Helizes, jedoch nicht mit atomarer Auflösung. Die hier vorgestellte Proteinstruktur basiert auf Kryo-EM-Daten, die mit Hilfe dieser Methode bestimmt wurden. Für die Simulation wurde jedoch nur ein kleiner Teil der vorhandenen Strukturinformation verwendet. Um die equilibrierte Kristallstruktur zu modifizieren, war nur die Lage der α -Helizes des zentralen Porenbereichs von Interesse.

Man erhält so eine mögliche aktive Konformation des Proteinkanals, die durch das Einbringen einer minimalen Anzahl neuer Strukturinformationen entstanden ist. Allgemein wird angenommen, dass sich die Pore aufweiten muss, um eine Translokation eines Polypeptids zu ermöglichen. Eine solche Aufweitung des Kanals ist gegeben, wenn sich der Proteinkanal in der aktiven Konformation befindet. Das Modell der aktiven Struktur des Proteinkanals erlaubt es erstmals, die Auswirkung einer geweiteten Pore auf molekularer Ebene in MD-Simulation zu untersuchen.

5.5. Abziehen des Pfropfens

Die Translokation eines Polypeptids durch den Proteinkanal setzt unter anderem voraus, dass sich der Pfropfen, der direkt unterhalb der Pore sitzt, und somit den Kanal versperrt, aus dieser Position bewegt und den Kanalbereich somit passierbar macht. Mit Hilfe von MD-Simulationen konnte bereits gezeigt werden, dass es möglich ist, eine α -Helix durch den Proteinkanal zu ziehen. Bei ausreichend großer Kraft, mit der die α -Helix durch die Pore gezogen wird, löst sich der Pfropfen von der Pore und kann zur Seite geschoben werden [131]. In diesem Kapitel wird der Frage nachgegangen, wie stark der Pfropfen im Kanal gebunden ist und ob die Bindung des Pfropfens im Kanal in der *inaktiv geschlossenen* Konformation des Proteinkanals anders aussieht als in der *aktiv geschlossenen* Konformation. Dazu wurde der Pfropfen in beiden Systemen mit Hilfe von SMD-Simulationen von der Pore abgezogen. In den durchgeführten Simulationen wurde die Kraft direkt an dem Pfropfen angelegt und bewegt diesen in die negative z-Richtung, d. h. der Pfropfen bewegt sich in Richtung des extrazellulären Raumes. Dies ist schematisch in **Abb. 5.10** dargestellt.

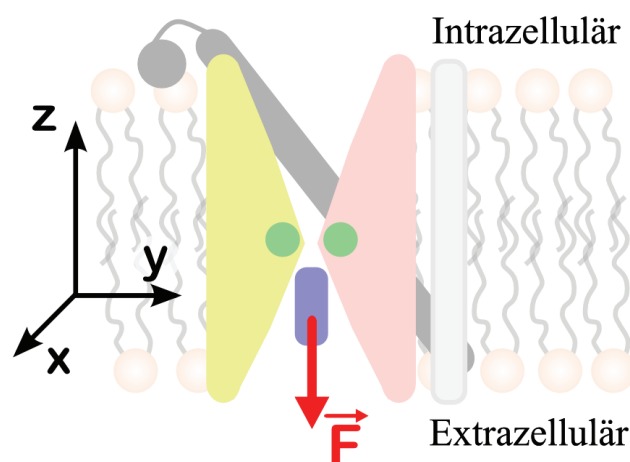


Abb. 5.10

Schematische Darstellung der SMD-Simulation zur Untersuchung des Bindungsverhaltens des Pfropfens im Kanal. Die Kraft wirkt direkt auf den Pfropfen (blau eingezeichnet) und zieht diesen in die negative z-Richtung und somit von der Pore weg in den extrazellulären Raum.

Die notwendige Kraft, die aufgebracht werden muss, um den Pfropfen von der Pore abziehen wird für beide Konformationen ermittelt. Dadurch wird ein qualitativer Vergleich der eingesetzten Kräfte möglich. Eine quantitative Aussage der Bindungsstärke des Pfropfens kann über die Änderung der Freien Energie beim Abziehen des Pfropfens gemacht werden. Aufgrund der notwendigen Zuggeschwindigkeit befinden sich die Systeme während der Simulation nicht mehr im Gleichgewicht. Aus diesem Grund muss die anfallende dissipative

Arbeit berücksichtigt werden. Dies erfolgt mit Hilfe einer statistischen Analyse der Nichtgleichgewichtsdaten aus mehreren SMD-Simulationen. Damit lässt sich das *Potential of Mean Force* (PMF) des Pfropfens beim Abziehen von der Pore entlang der durch das SMD-Potential vorgegebenen Reaktionskoordinate berechnen (siehe Kapitel 2.4.2. *Rekonstruktion des Freien Energieprofils aus SMD-Simulationen*).

5.5.1. Voruntersuchung – Schnelles Abziehen

In einem ersten Versuch wurde der Pfropfen in beiden Systemen (*inaktiv geschlossen* und *aktiv geschlossen*) mit einer Geschwindigkeit von 20 Å/ns in die negative z-Richtung gezogen. Die Kraft wirkte auf den Schwerpunkt des Pfropfens. Die Kraftkonstante des SMD-Constraints betrug 500 pN/Å wodurch sichergestellt wurde, dass der Schwerpunkt des Pfropfens dem Zugpotential eng folgte. Ein harmonisches Zusatzpotential mit einer Stärke von 50 pN/Å, das auf die Kopfgruppen der Lipide wirkte, sorgte dafür, dass sich während der Simulation, aufgrund der einwirkenden Kraft auf den Pfropfen, nicht die gesamte Proteinstruktur in die negative z-Richtung bewegt. Dieser Constraint beeinflusste die Lipide ausschließlich in z-Richtung, so dass sie in ihrer Bewegung entlang der Membranebene nicht eingeschränkt, die z-Positionen sowie die Ausdehnung der Doppellipidschicht aber fixiert waren. Die Simulationsdauer für beide Systeme betrug jeweils 350 ps, was einer Bewegung des Pfropfenschwerpunktes um ca. 7 Å entspricht. Die Ergebnisse dieser Simulationen werden im Folgenden vorgestellt.

5.5.1.1. Ergebnisse und Diskussion

Der Verlauf, der am Pfropfen anliegenden Kraft, ist in **Abb. 5.11** für beide Konformationen des Proteinkanals gezeigt. In blau ist der Verlauf für die Simulation der *inaktiv geschlossenen* Konformation, in rot für die Simulation der *aktiv geschlossenen* Konformation dargestellt.

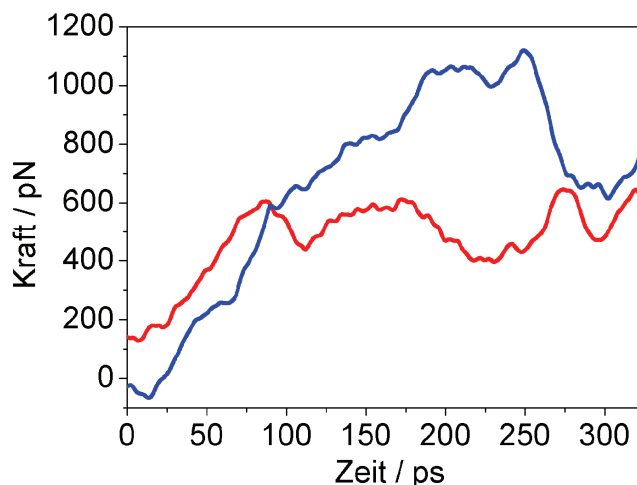


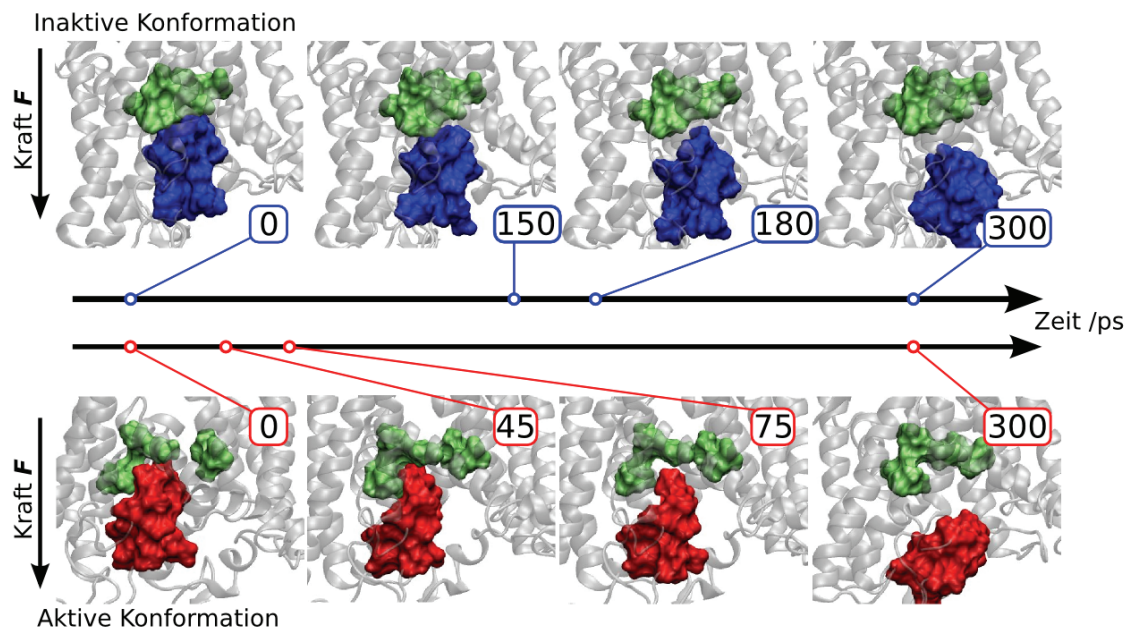
Abb. 5.11

Kraftverlauf während der SMD-Simulation beim Abziehen des Pfropfens. Der Kraftverlauf, der bei der Simulation des inaktiven Systems beobachtet wurde ist in blau, der des aktiven Systems ist in rot dargestellt.

Beide Simulationen zeigen einen unterschiedlichen Kraftverlauf. Im Fall der *inaktiv geschlossenen* Konformation steigt die Kraft in den ersten 250 ps der Simulation stetig an, bis eine Maximalkraft von ca. 1100 pN erreicht ist (Abb. 5.11, blaue Kurve). Danach fällt die Kurve innerhalb der nächsten 25 ps auf 600 pN ab. Im Fall der *aktiv geschlossenen* Konformation liegt bereits zu Beginn der Simulation eine Kraft von ca. 150 pN am Pfropfen an. Die Feder ist aufgrund einer identischen Systempräparation beider Systeme vorgespannt. Nach 100 ps fällt die Kraft von ca. 600 pN auf 450 pN ab. Die Kraft steigt dann im weiteren Verlauf der Simulation mehrfach leicht an und fällt wieder ab. Dabei bewegt sich die Kraft zwischen 400 pN und 600 pN. Gegen Ende der Simulationen liegt die Kraft beider Simulationen auf einem vergleichbaren Kraftniveau und steigt wieder leicht an.

Ein Vergleich der beiden Kraftkurven zeigt, dass die Kraftkurve während der Simulation des *aktiv geschlossenen* Kanals keine extremen Schwankungen zeigt, wie es für den Proteinkanal in der *inaktiv geschlossenen* Konformation der Fall ist. Die aufzuwendende Maximalkraft, um den Pfropfen von der Pore abziehen, ist für den Proteinkanal in der *aktiv geschlossenen* Konformation um den Faktor zwei geringer.

Um sich ein besseres Bild des Abziehprozesses des Pfropfens machen zu können, sind in **Abb. 5.12** Momentaufnahmen des Proteinkanals aus beiden Simulationen in zeitlicher Abfolge zu sehen. Gezeigt sind die ersten 300 ps, was einer Zugdistanz von 6 Å entspricht.

**Abb. 5.12**

Momentaufnahmen der SMD-Simulationen zum Abziehen des Pfropfens. Das Proteingerüst ist in grau im Hintergrund dargestellt, die Pore ist in grün (Surface-Darstellung) gezeigt. Die Kraft wirkt in die negative z -Richtung. Es sind Momentaufnahmen zu unterschiedlichen Zeiten abgebildet. Im oberen Teil sind Momentaufnahmen des inaktiven Systems zu sehen. Hier ist der Pfropfen in blau gezeigt. Im unteren Teil der Abbildung ist das aktive System dargestellt. Hier ist der Pfropfen in rot gezeigt.

Das Proteingerüst des Kanals ist in grau im Hintergrund zu sehen, die Pore ist in beiden Fällen in grün eingefärbt. Der Pfropfen der *inaktiv geschlossenen* Konformation ist im oberen Teil des Bildes in blau gezeigt. Im unteren Teil der Abbildung ist der Pfropfen der *aktiv geschlossenen* Konformation in rot zu sehen. Aus beiden Simulationen wurden Momentaufnahmen gewählt, bei denen der Pfropfen in einer vergleichbaren Stellung bezüglich der Pore liegt. Die Simulationszeit ist in beiden Fällen in einem roten bzw. blauen Kasten vermerkt. Die erste Momentaufnahme wurde zu Beginn jeder Simulation gemacht, bei der Propfen und Pore noch in engem Kontakt miteinander sind (blau: 0 ps, rot: 0 ps). Nach Einwirken einer Kraft auf den Schwerpunkt des Propfens bewegt sich dieser kontinuierlich nach unten und verliert somit nach und nach den Kontakt zu der Pore. Für die zweite Momentaufnahme wurde eine Situation gewählt, bei der die Bindung bereits gelockert ist, der Pfropfen sich aber immer noch in der Nähe der Pore befindet (blau: 150 ps, rot: 45 ps). Hier fällt auf, dass sich dieser Zustand, im Fall der aktiven Struktur (rot) deutlich schneller einstellt als in der *inaktiven* Konformation des Proteinkanals (blau). Dies entspricht dem Kraftverlauf, bei der die Kraft zum Abziehen des Pfropfens im Fall der *aktiv geschlossenen* Konformation deutlich geringer ist und die Kraft viel schneller abfällt. Die dritte Momentaufnahme zeigt die Systeme, zu dem Zeitpunkt, an dem sich der Pfropfen von der Pore löst (blau: 180 ps, rot: 75 ps). In der letzten Momentaufnahme ist zu sehen, dass sich nach 300 ps der Pfropfen

komplett von der Pore gelöst hat und sich von dieser wegbewegt. Die Momentaufnahmen wurden gegen Ende der Simulationen gemacht. Beide Systeme zeichnen sich zu diesem Zeitpunkt durch einen ähnlichen Kraftverlauf aus.

Die Kraftverläufe und die visuelle Inspektion haben gezeigt, dass es qualitativ einen deutlichen Unterschied in der Bindung des Pfropfens an die Pore zwischen dem inaktiven und dem aktiven System gibt. Die Kraft, die notwendig ist, um den Pfropfen von der Pore abziehen ist für die *inaktiv geschlossene* Konformation um einen Faktor zwei größer als für den Proteinkanal in der *aktiv geschlossenen* Konformation. Daraus resultiert ein Kraftprofil für beide Konformationen, aus dem ersichtlich ist, dass der Pfropfen im Proteinkanal in der *inaktiv geschlossenen* Konformation später „abreißt“ als der Pfropfen im Proteinkanal in der *aktiv geschlossenen* Konformation. In **Abb. 5.13** ist die Van der Waals-Wechselwirkung zwischen Pfropfen und Porenregion dargestellt.

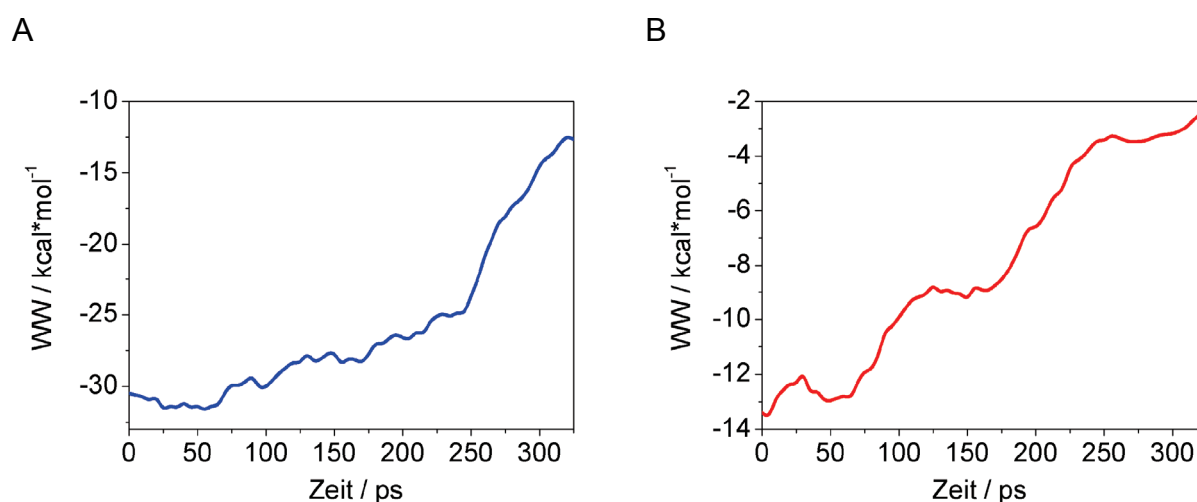


Abb. 5.13

Verlauf der Van der Waals-Wechselwirkung (WW) zwischen Pfropfen und Pore bei Abziehen des Pfropfens für den Proteinkanal in der *inaktiv geschlossenen* Konformation (A) und in der *aktiv geschlossenen* Konformation (B).

Im Fall der *inaktiv geschlossenen* Konformation (**Abb. 5.13A**) sieht man bis ca. 250 ps eine langsame stetige Abnahme der Wechselwirkungsenergie von ca. -30 kcal/mol auf ca. -25 kcal/mol. Danach knickt die Kurve ab, und die Wechselwirkungsenergie nimmt um ca. 15 kcal/mol innerhalb der nächsten 50 ps ab. Genau zu diesem Zeitpunkt ist ebenso ein deutlicher Abriss der Kraft in **Abb. 5.11** zu sehen und der Pfropfen löst sich komplett von der Pore (**Abb. 5.12** obere Reihe, vierte Momentaufnahme).

Im Fall der *aktiv geschlossenen* Konformation (**Abb. 5.13B**) ist die Wechselwirkungsenergie von Beginn an geringer und liegt bei ca. -13 kcal/mol. Im Verlauf der Simulation sind zwei markante Anstiege im Profil der Wechselwirkungsenergie zu beobachten: Zwischen 70 ps und 125 ps nimmt die Wechselwirkungsenergie von -13 kcal/mol auf -9 kcal/mol ab;

zwischen 175 ps und ca. 250 ps kommt es zu einer erneuten Abnahme von -9 kcal/mol auf -3 kcal/mol.

Die unterschiedliche Van der Waals-Wechselwirkungsenergie zwischen Pfropfen und Porenregion in den beiden Systemen lässt sich dadurch erklären, dass der Pfropfen der *inaktiv geschlossenen* Konformation eng am gesamten Porenbereich anliegt und ihm somit eine größere Wechselwirkungsfläche zur Verfügung steht. Dies ist bei der *aktiv geschlossenen* Konformation nicht der Fall. Die Pore ist geweitet, der Pfropfen kann nicht mehr mit dem gesamten Porenbereich über Van der Waals-Wechselwirkungen interagieren, was zu einer geringeren Wechselwirkungsenergie führt. Diese Betrachtungsweise liefert erste Hinweise zur Bindung des Pfropfens im Kanal. Ein strukturell veränderter Porenbereich setzt die Wechselwirkung zwischen Pfropfen und Pore herab, wodurch sich der Pfropfen leichter von der Pore abziehen lässt.

In dieser Betrachtung wurden ausschließlich Van der Waals-Wechselwirkungen zwischen dem Porenbereich und dem Pfropfen betrachtet, da sowohl an der Oberfläche des Pfropfens, als auch an der Pore größtenteils hydrophobe Aminosäuren liegen. Um jedoch quantitative Aussagen machen zu können, muss die Änderung der Freien Energie bestimmt werden.

5.5.2. Bestimmung des Potential of Mean Force

Zur Bestimmung der Änderung der Freien Energie des Pfropfen beim Abziehen von der Pore entlang der Reaktionskoordinate, wurden SMD-Simulationen an dem Proteinkanal in der *inaktiv geschlossenen* sowie in der *aktiv geschlossenen* Konformation durchgeführt. Aus MD-Simulationen an beiden Systemen mit fixiertem Schwerpunkt des Pfropfens in z-Richtung wurde jeweils ein Ensemble, aus 10 Startstrukturen extrahiert. Für jedes dieser Ensemble-Mitglieder wurde eine SMD-Simulation mit den Simulationsdetails entsprechend Unterkapitel *Voruntersuchung – Schnelles Abziehen* durchgeführt, um den Pfropfen, entsprechend der gemachten Voruntersuchungen, von der Pore in die negative z-Richtung abziehen zu lassen. Lediglich die SMD-Geschwindigkeit war mit 5 Å/ns um den Faktor vier verlangsamt, um das System während der Simulation möglichst nahe am Gleichgewicht zu halten. Die Simulationszeit pro SMD-Simulation betrug insgesamt 1400 ps (*inaktiv geschlossene* Konformation) und 1200 ps (*aktiv geschlossene* Konformation), was eine Bewegung des Pfropfens von ca. 7 Å bzw. 6 Å ergab. Im Unterkapitel *Voruntersuchung – Schnelles Abziehen* hat sich gezeigt, dass innerhalb dieser Distanz die Wechselwirkungsenergie deutlich zurückging und sich der Pfropfen sichtbar von der Pore entfernt hatte.

5.5.2.1. Ergebnisse

Aus den Profilen der Kraft der einzelnen Simulationen lässt sich die Arbeit bestimmen, die von außen am System verrichtet wird (**Abb. 5.14**).

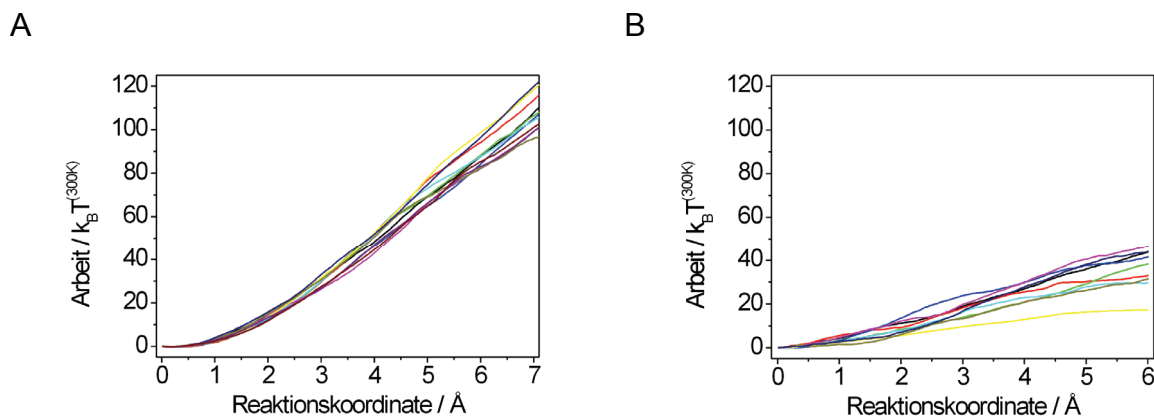


Abb. 5.14

Arbeitsprofile aus den SMD-Simulationen, bei denen der Pfropfen aus der Pore gezogen wurde; für den Proteinkanal in der *inaktiv geschlossenen* Konformation (A) und in der *aktiv geschlossenen* Konformation (B).

Für das Ensemble des Proteinkanals in der *inaktiv geschlossenen* Konformation (**Abb. 5.14A**) ergeben sich Arbeitsprofile, die alle im Verlauf der Simulation ansteigen und nach einer Distanz von ca. 6 Å im Bereich zwischen 80 - 100 $k_B T^{(300K)}$ liegen. Innerhalb der letzten Nanosekunde steigen die Arbeitswerte bereits auf über 100 $k_B T^{(300K)}$ an. Die Arbeitswerte des Ensembles des Proteinkanals in der *aktiv geschlossenen* Konformation (**Abb. 5.14B**) liegen alle deutlich unter diesen Werten. Sie steigen ebenfalls im Lauf der Simulation an und haben zum Ende, mit Ausnahme einer Simulation, einen Wert im Bereich zwischen 30 - 50 $k_B T^{(300K)}$. Die Verteilung der Arbeitswerte wird in beiden Fällen entlang der Trajektorie breiter, was ein Anzeichen dafür ist, dass die Dissipation entlang der Reaktionskoordinate zunimmt. Aus den Arbeitsprofilen, den Nichtgleichgewichtsdaten, lässt sich mit Hilfe von Fluktuationstheoremen die Änderung der Freien Energie entlang einer gewählten Reaktionskoordinate (in diesem Fall der zurückgelegten Strecke des Pfropfens in Zugrichtung) extrahieren (siehe Kapitel 2.4.2 *Rekonstruktion des Freien Energieprofils aus SMD-Simulationen*).

Pro Simulationssystem konnten 10 Arbeitsprofile mit Hilfe der Kumulantenentwicklung bis zur zweiten Ordnung analysiert werden. Die Verwendung dieser Näherung ist gerechtfertigt, da für das Potential eine harte Feder (*stiff spring approximation*) zum Einsatz kam und zusätzlich eine SMD-Geschwindigkeit von 5 Å/ns gewählt wurde, was halb so schnell ist, wie die langsamste Geschwindigkeit in den SMD-Simulationen von Deka-Alanin. Anhand der Breite, der als Gaußförmig angenommenen Arbeitsverteilungen, konnte die dissipierte Arbeit

abgeschätzt werden, die für den Großteil der Reaktionskoordinate kleiner $7 k_B T^{(300K)}$ und das System somit in der Nähe des Gleichgewichts war.

Die Änderung der Freien Energie ΔG entlang der Reaktionskoordinate ist in **Abb. 5.15** dargestellt. **Abb. 5.15A** zeigt den Verlauf der Freien Energie während des Abziehens des Pfropfs aus dem Proteinkanal für die *inaktiv geschlossenen* Konformation, **Abb. 5.15B** für die *aktiv geschlossene* Konformation. Die Reaktionskoordinate ist im *inaktiven* System bis 7 \AA , im *aktiven* System bis 6 \AA rekonstruiert worden.

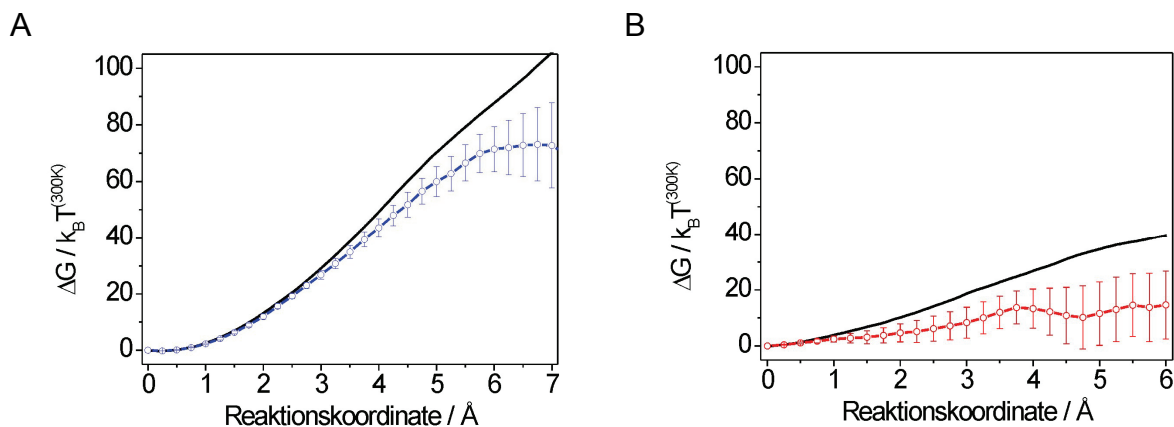


Abb. 5.15

PMF bei Abziehen des Pfropfs, berechnet aus den Arbeitprofilen aus **Abb. 5.14**, für den Proteinkanal in der *inaktiv geschlossenen* Konformation (A) und für den Proteinkanal in der *aktiv geschlossenen* Konformation (B).

Der Mittelwert der Arbeit ist als schwarze Kurve zu sehen, blau bzw. rot zeigen die Potentialverläufe der entsprechenden Systeme, berechnet mit der Kumulantenentwicklung.

PMF-inaktiv geschlossen

Für den Proteinkanal in der *inaktiv geschlossenen* Konformation steigen die Potentialwerte im während der Simulation an. Am Ende der Reaktionskoordinate ist ein Abflachen des Potentialverlaufs zu erkennen. Nach 7 \AA liegt die Änderung der Freien Energie bei ca. $70 k_B T^{(300K)}$. Dieser Betrag an Freier Energie muss investiert werden, um den Pfropfen um 7 \AA von der Pore zu ziehen.

PMF-aktiv geschlossen

Ein anderes Bild ergibt sich bei Betrachtung des Potentialverlaufs, wenn sich der Proteinkanal in der *aktiv geschlossenen* Konformation befindet. Hier liegen sowohl der Mittelwert der Arbeit sowie die Kumulantenentwicklung bis zur zweiten Ordnung bei deutlich geringeren Werten als dies für den Proteinkanal in der *inaktiv geschlossenen* Konformation der Fall ist. Die Potentialwerte steigen im ersten Teil der Reaktionskoordinate bis ca. 3.75 \AA auf ca.

$10 k_B T^{(300K)}$ an. Bei 4.75 \AA ist ein kleiner „Dip“ zu erkennen, danach steigen die Potentialwerte wieder leicht an. Am Ende des rekonstruierten Teils der Reaktionskoordinate (bei 6 \AA), liegt der Potentialwert bei ca. $13 k_B T^{(300K)}$.

Fehlerbetrachtung

Für beide Potentialverläufe sind in **Abb. 5.15** Fehlerbalken eingezeichnet. Bei den Fehlerbalken handelt sich um einen statistischen Fehler, der im Wesentlichen aus der Bestimmung der Varianz der Arbeitsverteilung anhand von zehn Werten folgt. Dieser wird analog zu Kapitel 4.9.1.1. *Fehlerbetrachtung* berechnet. In beiden Fällen wird der Fehler im Laufe der Simulation größer, da die Varianz der Arbeitsverteilung bzw. die Dissipation zunimmt. Dies bedeutet, dass die Potentialbarriere, die überwunden werden muss, um den Pfropfen die ersten 7 \AA bzw. 6 \AA von der Pore zu bewegen, für die *inaktiv geschlossene* Konformation des Proteinkanals bei $72 \pm 13 k_B T^{(300K)}$ und für die *aktiv geschlossene* Konformation des Proteinkanals bei $13 \pm 11 k_B T^{(300K)}$ liegt.

Vergleich der Potentialbarrieren

Vergleicht man die Potentialbarrieren, kann man sagen, dass durch die Konformationsänderung vom *inaktiven* in das *aktive* System die Potentialbarriere deutlich herabgesetzt und damit die Bindung des Pfropfens im Porenbereich gelockert wird. Selbst bei maximal ungünstiger Kombination der gemachten Fehler, d. h. einem minimalen Potential im *inaktiven* und einem maximalen Potential im *aktiven* Fall, besteht immer noch ein deutlicher Unterschied der Potentialbarrieren von $35 k_B T^{(300K)}$.

Um die hier auftretenden Größenordnungen der Potentialbarrieren besser einschätzen zu können, soll ein kurzer Vergleich mit Potentialbarrieren von typischen biologischen und chemischen Systemen gemacht werden. Eine Zusammenfassung ist in **Tab. 5.2** gezeigt. Hier sind die Potentialbarrieren nach ihrer Barrierenhöhe geordnet aufgelistet.

Tab. 5.2

Vergleich von Potentialbarrieren chemischer und biologischer Prozesse.

Art der Potentialbarriere	$\Delta E / k_B T^{(300K)}$
C-C Bindungsdissoziation (Kovalente Bindung) [135]	~ 140
<i>Inaktiv geschlossene</i> Konformation des Proteinkanals	72 ± 13
Dissoziation von Biotin gebunden an Streptavidin [136]	~ 33
<i>Aktiv geschlossene</i> Konformation des Proteinkanals	13 ± 11
Selektivitätsfilter des Aqua-Glyceroporins [100]	~ 10

Die Dissoziationsenergien der Ionenbindung und der kovalenten Bindung sind mit $> 100 k_B T^{(300K)}$ sehr groß. Diese Art von Bindungen ist somit am stabilsten. Die Potentialbarriere einer der stärksten, nicht-kovalent gebundenen Protein-Ligand-Paare, die Bindung von Biotin an das Protein Streptavidin liegt bei ca. $33 k_B T^{(300K)}$. Dazwischen liegt mit ca. $72 k_B T^{(300K)}$ die rekonstruierte Potentialbarriere des Pfropfens in der *inaktiv geschlossenen* Konformation. Dies würde bedeuten, dass die Bindung des Pfropfens im Porenbereich sehr stabil ist, da dieser Wert nur den minimalen Energiebetrag darstellt. Der weitere Verlauf des Potentials ist nicht bekannt und könnte somit zu einer noch höheren Potentialbarriere führen. Eine sehr stabile Bindung des Pfropfens an die Pore des Proteinkanals in der *inaktiv geschlossenen* Konformation erscheint aus biologischer Sicht nicht unlogisch, da der Proteinkanal in dieser Konformation für Polypeptide, und andere kleine Moleküle, wie Wasser, Ionen, etc. undurchlässig sein sollte.

Die Potentialbarriere des aktiven Systems des Proteinkanals findet sich mit $13 k_B T^{(300K)}$ im Bereich „schwächerer“ Bindungen (siehe **Tab. 5.2**). Damit liegt die Potentialbarriere bei einem Wert, den beispielsweise ein Glycerolmolekül aufbringen muss, um den so genannten Selektivitätsfilter des Aqua-Glycero-Kanals zu passieren. Als Selektivitätsfilter wird eine bestimmte Stelle im Zentrum dieses Kanals bezeichnet. Dabei handelt es sich um einen Prozess, der auf biologisch relevanten Zeitskalen im μ s-Bereich abläuft. Eine Barriere, wie sie für den Proteinkanal in der *aktiv geschlossenen* Konformation bestimmt wurde, stellt aus biologischer Sicht, in Bezug auf biologisch relevante Zeitskalen ein leicht zu überwindendes Hindernis dar.

Um den hier bestimmten Potentialbarrieren noch mehr Aussagekraft zu verleihen, ist es hilfreich diesen Größen eine Zeitskala zuzuweisen.

Mean First Passage Time

Mit Hilfe des berechneten Potentialverlaufs, kann die MFPT abgeschätzt werden, d. h. die Zeit, die der Pfropfen im Mittel benötigt, um durch thermische Energie angetrieben, die berechnete Potentialbarriere zu überwinden. In einer ersten Annahme soll dies mit einem kompletten Abgehen des Pfropfens von der Pore gleichgesetzt werden. Als Modell wird eine 1D-Diffusion des Pfropfens im berechneten Potential angenommen. Unter Verwendung folgender Randbedingungen lässt sich eine Abschätzung der Größenordnung der MFPT analog zu Kapitel 4.9.1.2. *Mean First Passage Time* durchführen.

1) Auf der linken Seite des Potentials wird eine reflektierende Barriere angenommen. Das entspricht der Ausgangssituation, in der der Pfropfen fest auf der Pore sitzt. Dies ist möglich, da sich der Pfropfen nur unter hohem Energieaufwand weiter in Richtung Pore bewegen lässt,

was aufgrund der Van der Waals-Abstoßung einen stark ansteigenden Potentialverlauf zur Folge hätte.

2) Als zweite Randbedingung wird eine absorbierende Barriere am rechten Rand des Potentials angenommen. Hierzu stellt man sich folgende Situation vor: Bei Translokation eines Polypeptides durch den Proteinkanal muss der Pfropfen den Porenbereich verlassen. Zusätzlich wird angenommen, dass das Polypeptid nicht am Öffnungsprozess beteiligt ist. Erst nach Abgehen des Pfropfens kann das Polypeptid durch die Pore gleiten und dem Pfropfen ist somit der Weg zurück zur Pore verbaut. Eine absorbierende Barriere beschreibt diesen Fall. Der Pfropfen wird dem System quasi für die Zeit entzogen, in der sich ein Polypeptid im Proteinkanal befindet. Unter Annahme dieser Bedingungen sagt die MFPT aus, wie lange es im Mittel dauert, bis sich der Schwerpunkt des Pfropfens bei thermischer Aktivierung um ca. 6 Å von der Pore entfernt.

MFPT-inaktiv

Mit Hilfe von Gleichung (4.4) und unter Berücksichtigung des Fehlers, d. h. unter Verwendung des minimal möglichen Potentials, ergibt sich für die MFPT des Proteinkanals in der *inaktiv geschlossenen* Konformation ein Wert von ca. 10^8 s. Man kann also davon ausgehen, dass sich der Pfropfen in dieser Konformation auf biologisch relevanten Zeitskalen nicht von alleine von der Pore lösen kann.

MFPT-aktiv

Im Fall der *aktiv geschlossenen* Konformation ergibt sich für die MFPT unter Verwendung des maximal möglichen Potentials ein Wert von ca. 450 ms. Dies liegt innerhalb der für die Proteintranslokation relevanten Zeitskalen, die sich bis in den Sekundenbereich bewegen [137]. Zieht man den tatsächlich berechneten Potentialverlauf in Betracht reduziert sich die MFPT nochmals deutlich. Man kommt hier sogar in den Bereich von 1 ms.

5.5.2.2. Diskussion

Aus Sicht der berechneten Potentialbarrieren und den daraus abgeschätzten Zeitskalen für ein thermisch aktiviertes Abgehen des Pfropfens aus dem Porenbereich, wird durch die MD-Simulationen bestätigt, dass der Proteinkanal zur Translokation eines Polypeptids eine Konformationsänderung von einer inaktiven in eine aktive Struktur durchführen muss. Das Entfernen des Pfropfens aus der inaktiven Struktur des Proteinkanals würde einen sehr hohen

Energieaufwand für das System bedeuten. Die Hydrolyse eines GTP-Moleküls in GDP, die unter anderem am Ribosom ablaufen kann, setzt lediglich ca. $10 k_B T^{(300K)}$ an Energie frei.

Die hohe Potentialbarriere steht im Einklang mit Ergebnissen aus molekulardynamischen Untersuchungen. Wenn sich der Proteinkanal in der *inaktiv geschlossenen* Konformation befindet, sind Kräfte bis zu 1500 pN notwendig, um eine kurze α -Helix durch die Pore zu drücken [131]. Des Weiteren konnten experimentelle Untersuchungen eine notwendige Reduzierung der Potentialbarriere untermauern. Im Rahmen dieser Studie konnte gezeigt werden, dass eine Translokation von Polypeptiden innerhalb relevanter Zeitskalen möglich ist, selbst wenn dem System der Energieträger ATP entzogen wird [112]. Eine mathematische Modellierung hat zudem gezeigt, dass sich der Translokationsprozess in diesem Fall mit einem thermisch getriebenen Ratschenmechanismus beschreiben lässt [113].

Um eine Translokation von Proteinen zu ermöglichen, ist eine Konformationsänderung aus der *inaktiven* in die *aktive* Struktur notwendig. Auslöser für diese Konformationsänderung ist die Bindung des Ribosoms an den Proteinkanal. Die Modellierung des Proteinkanals in der *aktiven* Konformation wurde auf der Grundlage von Kryo-EM-Daten durchgeführt; dabei wurde das Ribosom in einer physiologisch relevanten Position an den Proteinkanal gebunden. Die Potentialbarriere dieser *aktiven* Konformation ist im Vergleich zur *inaktiven* Konformation deutlich geringer. Dies wird zum einen durch eine aufgeweitete Porengeometrie verursacht, die eine verkleinerte Interaktionsfläche mit dem Pfropfen nach sich zieht und zum anderen durch einen vergrößerten Kanalbereich unterhalb der Pore. Die berechnete Potentialbarriere liegt in diesem Fall in einem Bereich, der für biologische Systeme bzw. für den Ablauf biologisch relevanter Prozesse realistisch ist. $13 \pm 11 k_B T^{(300K)}$ müssen überwunden werden, um den Pfropfen 6 \AA von der Pore wegzubewegen. Die Zeit von ca. 450 ms im ungünstigsten Fall, liegt damit noch auf einer, für die Proteintranslokation relevanten Zeitskala. Durch Zuführen einer geringen Menge an Energie, lässt sich diese Zeitdauer deutlich verringern. Dies könnte beispielsweise durch die Polypeptidkette geschehen, die bei der cotranslationalen Translokation aus dem Ribosom direkt in den Proteinkanal gedrückt wird.

5.6. Translokation von kleinen Molekülen

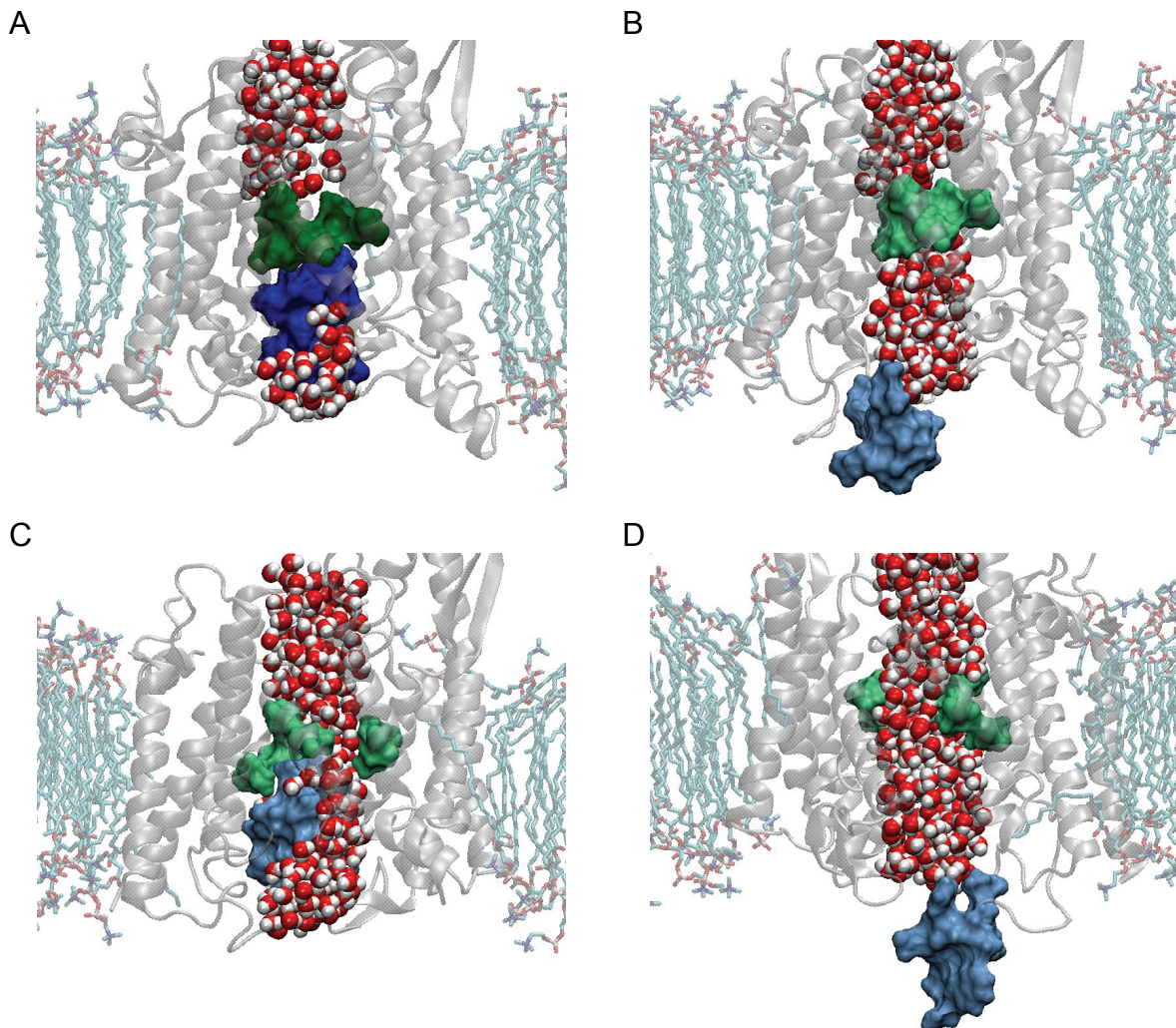
Eine wichtige Eigenschaft des Proteinkanals besteht darin, in seiner *inaktiven* Konformation für kleine Moleküle, wie z.B. Wasser oder Ionen, undurchlässig zu sein. Dies ist für das Überleben der Zelle eine Voraussetzung, damit das Konzentrationsverhältnis zwischen Außen- und Innenbereich der Zelle bzw. zwischen unterschiedlichen Zellkompartimenten nicht ungewollt

gestört wird. Aus der Kristallstruktur ist ersichtlich, dass im SecY-Komplex zur Abdichtung der Pore der Pfropfen verantwortlich ist, da dieser die Pore und damit den Kanalbereich verschließt. MD-Simulationen an der SecY-Untereinheit haben gezeigt, dass eine Abdichtung auf einer Zeitskala von 10 ns bestätigt werden kann [122]. In diesem Zeitraum durchqueren keine Wassermoleküle den Porenbereich.

Im Folgenden wird anhand von MD-Simulationen untersucht, wie sich dieses Verhalten ändert, wenn der Pfropfen von der Pore abgezogen wird, oder sich das System in der *aktiven* Konformation befindet. Zusätzlich soll mit Hilfe von SMD-Simulationen qualitativ abgeschätzt werden, mit welchem Aufwand sich ein Wassermolekül oder ein Natriumion durch die Pore bewegen lässt. Die durchgeführten Simulationen erfolgten für ein Wassermolekül und ein Natriumion an dem Proteinkanal in den Konformationen *inaktiv geschlossen*, *inaktiv offen*, *aktiv geschlossen* und *aktiv offen* (siehe **Abb. 5.4**).

5.6.1. Abdichtung des Proteinkanals

Um eine mögliche spontane Translokation von Wassermolekülen oder Ionen zu beobachten, wurden MD-Simulationen an vier unterschiedlichen Konformationen des Proteinkanals durchgeführt. Simulationsdetails entsprechen denen zur Equilibrierung der Startstruktur (siehe Unterkapitel *Equilibrierung der Startstruktur von SecY*). Im Fall der *aktiven* Konformation kam ein harmonischer Constraint zur Stabilisierung der Struktur hinzu (siehe Unterkapitel *Simulation der aktiv geschlossenen Konformation des Proteinkanals SecY*). In den Simulationen mit abgezogenem Pfropfen wurde der Schwerpunkt des Pfropfens mit einem harmonischen Constraint der Stärke 500 pN/\AA in z-Richtung stabilisiert, um zu verhindern, dass sich der Pfropfen wieder in Richtung Pore bewegt. Die Simulationsdauer der *inaktiv geschlossenen* Konformation betrug 20 ns, der *inaktiv offenen* Konformation 9 ns, der *aktiv geschlossenen* Konformation sowie der *aktiv offenen* Konformation 5 ns. Mittels der Simulationen soll untersucht werden, ob Wassermoleküle oder Ionen den Porenbereich im Kanal über Diffusion von der einen auf die andere Seite durchqueren können. Momentaufnahmen der einzelnen Simulationen sind in **Abb. 5.16** gezeigt.

**Abb. 5.16**

Abdichtung des Proteinkanals. Die Proteinstruktur ist in grau (Cartoon-Darstellung), die Lipide sind in Liccorice-Darstellung gezeichnet. Die Pore und der Pfropfen sind in grün bzw. blau (Surface-Darstellung) zu sehen. Die Wasseratome sind in Van der Waals-Darstellung gezeichnet. Protein und Lipide sind transparent dargestellt und einige Lipide bzw. Wassermoleküle wurden der Übersicht wegen nicht eingezeichnet. (A) Inaktiv geschlossene, (B) inaktiv offene, (C) aktiv geschlossene und (D) aktiv offene Konformation des Proteinkanals.

In **Abb. 5.16** sind Seitenansichten auf den Proteinkanal in den unterschiedlichen Konformationen zu sehen. Die Proteinstruktur ist in grau (Cartoon-Darstellung), die Lipide in Liccorice-Darstellung gezeichnet. Die Pore und der Pfropfen sind in grün bzw. blau (Surface-Darstellung) gezeigt. Wassermoleküle und Ionen in der Nähe der Pore bzw. des Pfropfens sind in Van der Waals-Darstellung eingezeichnet. **Abb. 5.16A** zeigt die *inaktiv geschlossene* Konformation des Proteinkanals, **Abb. 5.16B** die *inaktiv offene*, **Abb. 5.16C** die *aktiv geschlossene* und **Abb. 5.16D** die *aktiv offene* Konformation. Für die *inaktiven* bzw. *aktiven* Systeme wurden der Klarheit wegen unterschiedliche Blickwinkel verwendet.

5.6.1.1. Ergebnisse und Diskussion

Während der gesamten Simulation der *inaktiv geschlossenen*, sowie der *inaktiv offenen* Konformation konnte keine spontane Translokation eines Wassermoleküls oder eines Ions beobachtet werden, trotz dass sich in beiden Fällen Wassermoleküle der Pore ungehindert nähern konnten. In der *inaktiv geschlossenen* Konformation ist dies nur von der intrazellulären Seite aus möglich, die andere Seite wird von dem Pfropfen blockiert. Eine Annäherung von Ionen konnte nicht nachgewiesen werden, was auf die geringe Ionenkonzentration zurückzuführen ist.

Auf der Zeitskala von Nanosekunden scheint der Kanal im *inaktiven* Zustand (ohne Bindung des Ribosoms) für kleine Moleküle undurchlässig zu sein. Dabei ist dies unabhängig davon, ob sich der Pfropfen auf der Pore befindet oder nicht (Abb. 5.16A,B). Die Pore allein reicht im *inaktiven* System bereits aus, um die Translokation von Wasser während der Simulation zu verhindern.

Die Simulationen des Proteinkanals in der *aktiv geschlossenen* (Abb. 5.16C) sowie der *aktiv offenen* Konformation (Abb. 5.16D) zeigen, dass sich während der Simulation von 5 ns ein Durchgang für Wassermoleküle ausbildet, eine Translokation von Ionen wurde auch hier nicht beobachtet. Wassermoleküle können den Porenbereich nahezu ungehindert passieren. Der Porenbereich ist in dieser Konformation aufgeweitet, so dass er keine sterische Barriere zur Abdichtung des Proteinkanals ausbilden kann. Im Fall des Proteinkanals in der *aktiv offenen* Konformation ist dies noch ausgeprägter zu beobachten als für den Proteinkanal, der sich in der *aktiv geschlossenen* Konformation befindet. In diesem Fall ist die Pore mit abgezogenem Pfropfen noch weniger in der Lage, den Proteinkanal gegenüber Wassermolekülen abzudichten.

SMD-Simulationen zum Transport eines Wassermoleküls und eines Natriumions aus dem Intrazellulärraum durch die Pore geben einen genaueren Einblick in das Translokationsverhalten der vier Systeme.

5.6.2. Translokation von Wasser und Ionen

In den durchgeführten SMD-Simulationen wurde ein Wassermolekül und ein Natriumion mit einem harmonischen Constraint der Stärke $500 \text{ pN}/\text{Å}$ und einer Geschwindigkeit von 20 Å/ns in die negative z -Richtung durch den Porenbereich bewegt. Die übrigen Simulationsbedingungen entsprachen denen aus Unterkapitel *Equilibrierung der Startstruktur von SecY* bzw. *Abdichtung des Proteinkanals*.

Abb. 5.17 zeigt einzelne Momentaufnahmen der Simulationen zur Untersuchung der Translokation eines Wassermoleküls für die vier unterschiedlichen Konformationen, in denen sich der Proteinkanal befinden kann – zu Beginn und am Ende der jeweiligen Simulation.

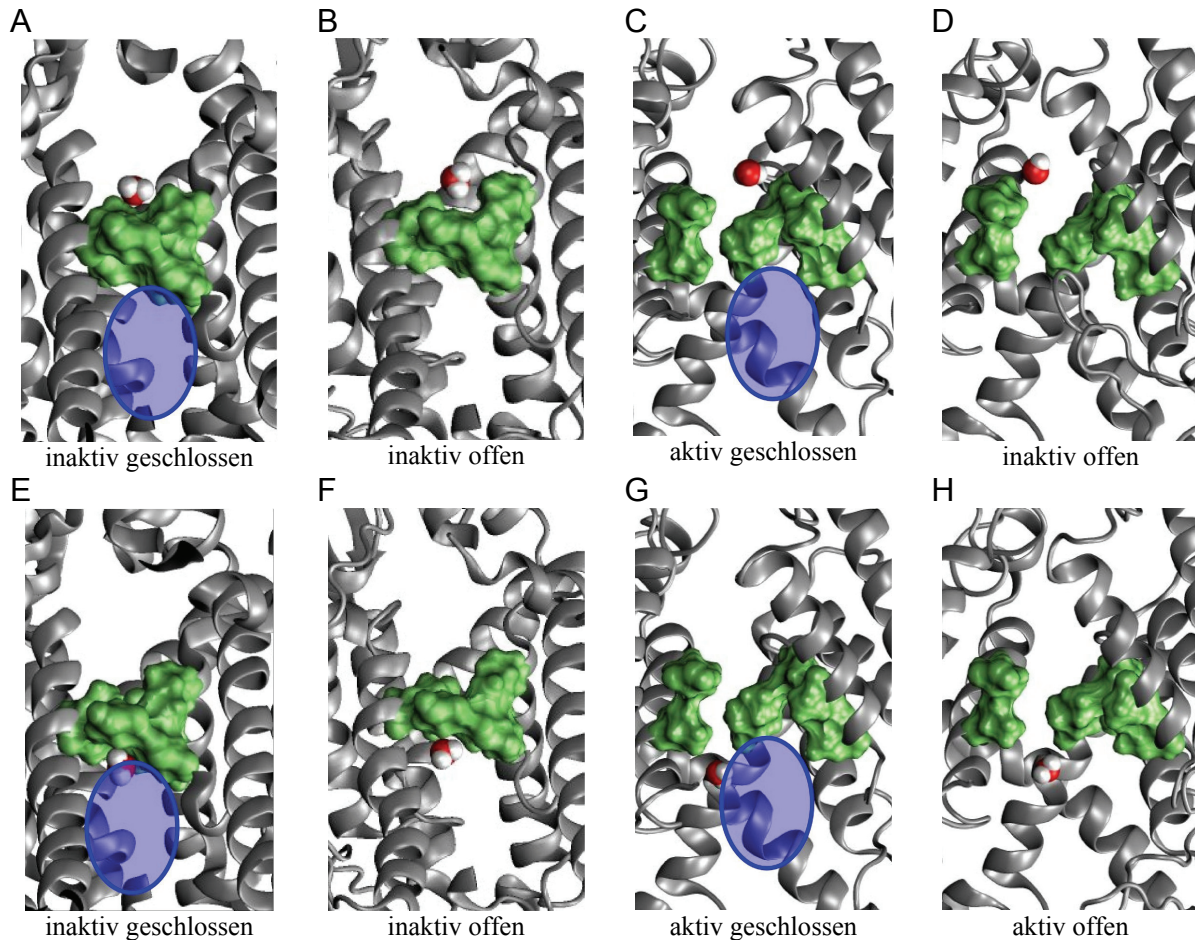


Abb. 5.17

Translokation eines Wassermoleküls über den Porenbereich des Proteinkanals. Zu sehen sind Momentaufnahmen zu Beginn (A-D) und zum Ende (E-H) der jeweiligen Simulation. Das Proteinrückgrat ist in grau (Cartoon-Darstellung), die Pore in grün (Surface-Darstellung) und das Wassermolekül in Van der Waals-Darstellung gezeigt. Der Pfropfen ist als transparente Ellipse in blau angedeutet. Wasser, Lipide und ein Teil der Proteinstruktur sind der Übersicht wegen nicht eingezeichnet. (A), (E) Inaktiv geschlossene Konformation. (B), (F) Inaktiv offene Konformation (C), (G) Aktiv geschlossene Konformation. (D), (H) Aktiv offene Konformation des Proteinkanals.

Das Proteinrückgrat ist in grau (Cartoon-Darstellung), die Pore in grün (Surface-Darstellung) und das Wassermolekül in Van der Waals-Darstellung gezeigt. Der Pfropfen ist als transparente Ellipse in blau in den geschlossenen Konformationen des Proteinkanals angedeutet. Wasser, Lipide und ein Teil der Proteinstruktur sind der Klarheit wegen nicht vollständig eingezeichnet. Das Wassermolekül befindet sich zu Beginn der Simulationen in allen Systemen oberhalb der Pore auf der intrazellulären Seite (**Abb. 5.17A-D**), am Ende der Simulation unterhalb der Pore auf der extrazellulären Seite (**Abb. 5.17E-F**).

5.6.2.1. Ergebnisse

Die am System verrichtete Arbeit, um das Wassermolekül bzw. das Natriumion während der Simulation über den Porenbereich zu bewegen, lässt sich aus dem Kraftverlauf entlang der Trajektorie berechnen und ist in **Abb. 5.18** für das Wassermolekül und in **Abb. 5.19** für das Natriumion dargestellt. Im linken Teil der Abbildung ist der Kraftverlauf während der Simulation für die vier Konformationen des Proteinkanals zu sehen, im rechten Teil der Abbildung ist die daraus resultierende Arbeit aufgetragen. Eine eventuell unterschiedliche z-Position des Wassermoleküls zu Beginn der Simulation ist für die vier untersuchten Systeme durch einen offset berücksichtigt.

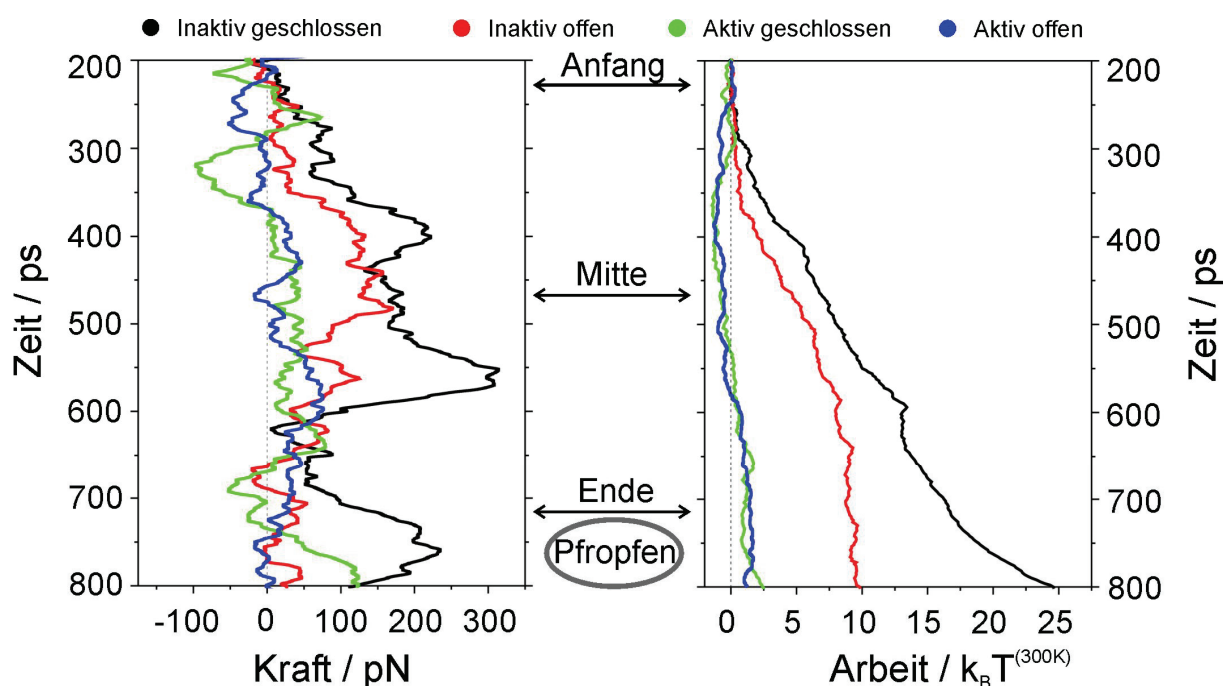


Abb. 5.18

SMD-Simulationen zur Translokation eines Wassermoleküls durch den Porenbereich für die vier Konformationen des Proteinkanals. Das linke Diagramm zeigt die Kraft, die am Schwerpunkt des Wassermoleküls während der Simulation anlag, im Diagramm rechts ist die resultierende Arbeit zu sehen.

Wassermolekül

Anhand des Kraftverlaufs in den Simulationen (**Abb. 5.18**, linke Abbildung) ist zu entnehmen, dass für den Proteinkanal in der *inaktiv geschlossenen* Konformation (schwarze Kurve) die größte Kraft notwendig ist, um das Wassermolekül durch die Pore zu ziehen. Kurz nach Mitte der Porenregion nimmt die Kraft den maximalen Wert von ca. 300 pN an. Danach bricht die Kraft kurz ein und steigt im weiteren Verlauf wieder an.

Für die *inaktiv offene* Konformation (rote Kurve) konnte ein Kraftverlauf aufgezeichnet werden, der von Beginn des Porenbereichs zur Mitte hin ansteigt und dann nach Überqueren der Mitte wieder abnimmt. Die Maximalkraft erreicht mit ca. 150 pN nicht den Maximalwert,

der während der Simulation für die *inaktiv geschlossene* Konformation aufgewendet werden musste. Die Kraftverläufe für die beiden *aktiven* Konformationen des Proteinkanals (grüne und blaue Kurve) ähneln sich. Im Bereich von -100 pN bis +100 pN treten Fluktuationen der Kraft auf, ein systematischer Anstieg der Kraft ist während der gesamten Simulation nicht zu erkennen.

Im rechten Teil von **Abb. 5.18** ist die aus den Kräften berechnete Arbeit gezeigt. Der größte Arbeitsaufwand ist im Fall des Proteinkanals in der *inaktiv geschlossenen* Konformation zu leisten (schwarze Kurve). Um das Wassermolekül durch die Pore zu ziehen, müssen ca. $25 k_B T^{(300K)}$ an Arbeit am System verrichtet werden. Ohne Pfropfen ist für das *inaktiv offene* System mit ca. $10 k_B T^{(300K)}$ deutlich weniger Arbeit zu leisten (rote Kurve). Fast kein Arbeitsaufwand ist für die beiden *aktiven* Systemen zu leisten (grüne und blaue Kurve); hier liegt der zu leistende Arbeitsaufwand im Bereich weniger $k_B T^{(300K)}$.

Natriumion

Die Simulationen zur Translokation des Natriumions zeigen ähnliche Kraft- bzw. Arbeitsverläufe, wie im Fall der Translokation des Wassermoleküls.

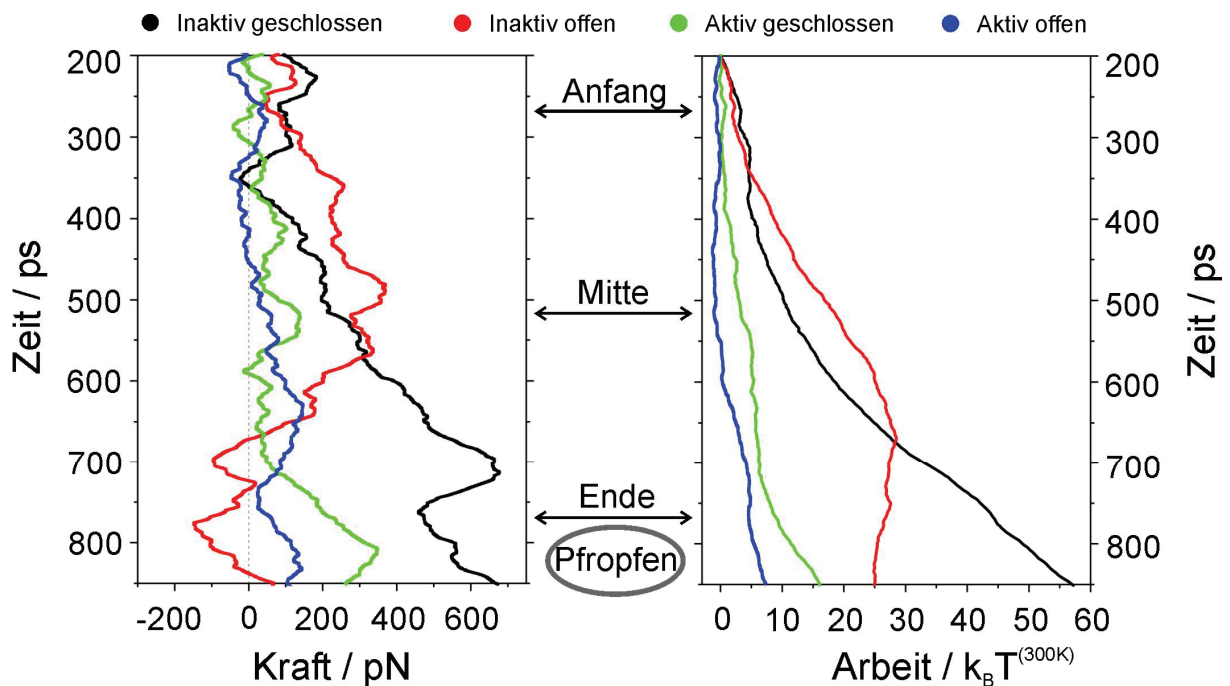


Abb. 5.19

SMD-Simulationen zur Translokation eines Natriumions durch den Porenbereich für die vier Konformationen des Proteinkanals. Das linke Diagramm zeigt die Kraft, die am Natriumion während der Simulation anlag, im Diagramm rechts ist die resultierende Arbeit zu sehen.

In der Simulation zur Translokation eines Natriumions durch den Proteinkanal in der *inaktiv geschlossenen* Konformation werden die größten Kräfte gemessen, die Maximalkraft liegt bei ca. 650 pN (schwarze Kurve). Die Kraft steigt beim „Durchlaufen“ der Pore von Beginn bis zum Ende der Pore an, bricht ein und erfährt danach einen erneuten Anstieg.

Für die *inaktiv offene* Konformation sieht man einen bis zur Mitte ansteigenden Kraftverlauf (bis ca. 350 pN), der dann bis zum Ende des Porenbereichs wieder abnimmt (rote Kurve).

Die beiden *aktiven* Konformationen zeigen für die Translokation eines Natriumions einen ähnlichen Verlauf wie für die Translokation eines Wassermoleküls, mit Kräften im Bereich von ca. 150 pN in weiten Teilen der Simulation (grüne und blaue Kurve). Lediglich am Ende des Porenbereichs steigt die Kraft für die *aktiv geschlossene* Konformation auf einen Wert von ca. 350 pN an (grüne Kurve).

Auf der rechten Seite der **Abb. 5.19** ist die aus den Kräften berechnete Arbeit gezeigt. Zur Translokation eines Natriumions durch den Proteinkanal in der *inaktiv geschlossenen* Konformation muss Arbeit von bis zu $55 k_B T^{(300K)}$ verrichtet werden (schwarze Kurve). Diese aufzubringende Arbeit liegt damit weit über dem Arbeitsaufwand, der für alle anderen Simulationen (die drei anderen Konformationen sowie die Simulationen zur Translokation eines Wassermoleküls) berechnet wurde. Im *inaktiv offenen* System sind nur ca. $25 k_B T^{(300K)}$ für die Translokation eines Natriumions aufzubringen (rote Kurve); der Arbeitsaufwand für den Proteinkanal in der *aktiv geschlossenen* Konformation liegt bei ca. $15 k_B T^{(300K)}$ (grüne Kurve), für den Proteinkanal in der *aktiv offenen* Konformation bei nur ca. $8 k_B T^{(300K)}$ (blaue Kurve).

5.6.2.2. Diskussion

Die ermittelten Kräfte und berechneten Arbeitswerte der verschiedenen Konformationen zeigen für die Translokation eines Wassermoleküls und eines Natriumions einen ähnlichen Verlauf. Einziger Unterschied ist, dass die Werte bei Translokation eines Natriumions größer sind als bei Translokation eines Wassermoleküls. Dies kann auf den größeren Van der Waals-Radius des Natriumions zurückgeführt werden; zusätzlich ist das Ion von einer Hydrathülle umgeben. Bei der Translokation durch den engen, hydrophoben Porenbereich muss diese Hydrathülle abgestreift werden, was einen zusätzlichen Energiebeitrag erfordert. Die Form der Kraftverläufe der einzelnen Konformationen lässt sich durch die strukturellen Eigenschaften von Pfropfen und Pore erklären.

Inaktiv geschlossene Konformation des Proteinkanals

Der Pfropfen sitzt fest unterhalb der geschlossenen Pore. Dies führt dazu, dass die Pore zusätzlich stabilisiert wird und eine Translokation sowohl von einem Wassermolekül (300 pN) wie auch von einem Natriumion (650 pN) die größte Kraft im Vergleich zu allen anderen Konformationen erfordert. Nachdem das Wassermolekül bzw. das Natriumion die Pore durchquert hat, sinkt die aufzubringende Kraft kurzzeitig ab. Die Kraft steigt aber erneut an, da der Pfropfen ein weiteres Hindernis darstellt, das überwunden werden muss. Als direkte Folge ist in dieser Konformation auch der größte Arbeitsbeitrag zur Translokation eines Wassermoleküls ($25 k_B T^{(300K)}$) bzw. Natriumions ($55 k_B T^{(300K)}$) zu leisten.

Inaktiv offene Konformation des Proteinkanals

Die Kraft steigt bis zur Mitte der Pore an, da die Pore in dieser Konformation auch ohne den Pfropfen geschlossen ist und ein Hindernis für Wassermoleküle und Ionen darstellt. Hier fehlt jedoch der stabilisierende Effekt des Pfropfens und die Kraft zur Translokation eines Wassermoleküls (150 pN) wie auch eines Natriumions (350 pN) ist deutlich geringer als für den Proteinkanal in der *inaktiv geschlossenen* Konformation. Da sich der Pfropfen nicht mehr unterhalb der Pore befindet, steigt die Kraft nach Überwinden der Pore nicht mehr an. Die am System verrichtete Arbeit ist mit $10 k_B T^{(300K)}$ für das Wassermolekül und $25 k_B T^{(300K)}$ für das Natriumion ebenfalls stark reduziert.

Aktiv geschlossene Konformation des Proteinkanals

Die Pore ist durch die Konformationsänderung in die *aktiv geschlossene* Konformation im Porenbereich destabilisiert, wodurch sich der Kanal nicht mehr vollständig schließen kann. Die zur Translokation notwendige Kraft ist nochmals deutlich geringer als für die *inaktiven* Konformationen des Proteinkanals, da die geöffnete Pore kein größeres Hindernis mehr für Wassermoleküle bzw. Ionen darstellt. Lediglich am Ende der Simulation steigt die Kraft wieder leicht an, was durch das Vorhandensein des Pfropfens unterhalb der Pore erklärt werden kann. Wie in der Simulation zur Abdichtung des Proteinkanals bereits gesehen, durchqueren Wassermoleküle bereits innerhalb der Simulationszeit ohne einwirkende Kraft den Porenbereich. Die am System verrichtete Arbeit beläuft sich lediglich auf ca. $3 k_B T^{(300K)}$, für das Natriumion liegt der Wert bei $15 k_B T^{(300K)}$.

Aktiv offene Konformation des Proteinkanals

Der Proteinkanal in der *aktiv offenen* Konformation zeigt einen ähnlichen Verlauf der Kraft und der berechneten Arbeit wie der Proteinkanal in der *aktiv geschlossenen* Konformation. Weil aber der Pfropfen aus dem Porenbereich entfernt ist, steigt die Kraft nach Überwinden der Pore nicht mehr an. Die am System verrichtete Arbeit beläuft sich auf ca. $2 k_B T^{(300K)}$, für das Natriumion liegt der Wert bei $8 k_B T^{(300K)}$.

Die in diesem Abschnitt gemachten Aussagen sind qualitative Aussagen, da für die einzelnen Konformationen nur jeweils eine Trajektorie simuliert wurde und somit keine statistische Analyse durchführbar ist, um die auftretenden Fluktuationen bzw. die Dissipation zu berücksichtigen und die Änderung der Freien Energie zu bestimmen. Es lässt sich aber anhand der Ergebnisse der MD- bzw. SMD-Simulationen sagen, dass der Proteinkanal in der *inaktiv geschlossenen* Konformation durch Zusammenspiel von Pfropfen und Pore sehr gut abgedichtet wird und der Proteinkanal eine große Barriere für Wasser bzw. Ionen darstellt.

Dieses Ergebnis stimmt mit den Ergebnissen einer experimentellen Studie überein, in der Ionenleitfähigkeitsmessungen an SecY-Komplexen, eingebaut in einer Doppellipidschicht, durchgeführt wurden [138]. Beim Proteinkanal-Wildtyp (dies entspricht der *inaktiv geschlossenen* Konformation) wurde keine erhöhte Ionenleitfähigkeit und auch keine erhöhte Permeabilität von Wasser im Vergleich zu einer Doppellipidschicht ohne SecY-Komplexe gemessen.

Durch den Einbau von zwei Cystein-Resten in die Porenregion des Proteinkanals, sowie durch anschließende Oxidation entstand ein Proteinkanal, in dem sich der Pfropfen permanent in einem offenen Zustand befand. Für diesen veränderten Proteinkanal konnte ein massiver Anstieg der Ionenleitfähigkeit und der Permeabilität von Wasser beobachtet werden. Ein solches Verhalten lässt sich nur durch die Reduktion der Potentialbarriere für die Translokation eines Wassermoleküls bzw. eines Ions erklären. Anhand der Simulationen kann keine Aussage über den Verlauf der Potentialbarriere gemacht werden, die notwendige Arbeit reduzierte sich aber deutlich, sowohl für das Wassermolekül als auch für das Natriumion, nachdem der Pfropfen von der Pore entfernt war.

Die *inaktiv offene* Konformation des Proteinkanals zeigte zwar während der Simulation keine Translokation von Wasser bzw. Natriumionen im Nanosekundenbereich, dies stellt aber keinen Widerspruch zu den experimentellen Untersuchungen dar, die auf Zeitskalen im Sekundenbereich durchgeführt wurden. Außerdem kann nicht mit Sicherheit davon ausge-

gangen werden, ob sich das Entfernen des Pfropfens im Experiment nicht auch auf die Struktur der Pore auswirkt.

Anhand der experimentellen Daten konnte der Porendurchmesser abgeschätzt werden. Aufgrund der unterschiedlichen Werte, kann man davon ausgehen, dass sich der SecY-Komplex teilweise in einer *aktiven* Konformation befindet. Dann ist auch ein Vergleich der Daten mit den Ergebnissen aus der Simulation für den Proteinkanal in der *aktiv offenen* Konformation sinnvoll. Die notwendigen Arbeitswerte sind nochmals deutlich geringer und eine spontane Translokation von Wasser konnte bereits während der Simulationszeit beobachtet werden.

Von der *aktiven* Konformation wird angenommen, dass sie *in vivo* nur während des Translokationsprozesses eingenommen und durch die Bindung des Ribosoms initiiert wird. Nach Translokation eines Polypeptides und Abdocken des Ribosoms, muss der Kanal wieder in seine *inaktive* Form übergehen, um die Membran für Wasser und Ionen abzudichten. Dazu ist sowohl ein geschlossener Porenbereich als auch der Pfropfen unterhalb der Pore notwendig. Dieser Relaxationsprozess wird im Folgenden anhand von MD-Simulationen untersucht.

5.7. Relaxation des Proteinkanals

Es stellt sich abschließend die Frage, wie sich die Struktur des Proteinkanals nach der Translokation eines Polypeptids verhält. Damit der Proteinkanal wieder in seinem Ursprungszustand vorliegt, sind mindestens drei Schritte notwendig.

Zunächst muss es zu einem Abdocken des Ribosoms kommen. Um den Proteinkanal danach aus seiner *aktiven* in die *inaktive* Konformation zu überführen, muss sich einerseits der Porenbereich verengen, andererseits muss der Pfropfen, der sich während der Translokation aus dem Kanalbereich bewegt hat, seine Position direkt unterhalb des Porenbereichs wieder einnehmen. Dabei ist nicht bekannt, in welcher Reihenfolge die einzelnen Schritte ablaufen und ob die strukturellen Veränderungen miteinander verknüpft sind. Nach vollendeter Translokation muss der Proteinkanal aber möglichst schnell in einen Zustand übergehen, in dem Wassermoleküle und Ionen den Kanal nicht passieren können. Um eine ausreichende Abdichtung zu gewährleisten sollte dieser Prozess auf der Sub-Mikrosekundskaala ablaufen [125]. Um einen Einblick in die Dynamik dieser Relaxationsprozesse zu erhalten, wurden daher weitere MD-Simulationen am Proteinkanal in der *inaktiv offenen*, der *aktiv geschlossenen* und der *aktiv offenen* Konformation durchgeführt. Ziel dieser Simulationen war es, zu ermitteln, wie schnell der Proteinkanal in den jeweiligen Konformationen wieder einen abgedichteten Zustand einnimmt und wie sich das System strukturell in den Anfangszustand zurück

entwickelt. Zu diesem Zweck wurden bei allen Simulationen alle Constraints innerhalb der ersten 500 ps auf Null reduziert, was einem Abdocken des Ribosoms entsprechen sollte. Anschließend wurden weitere 9.5 ns unter Beibehaltung der Simulationsparameter (*Equilibrierung der Startstruktur von SecY*) simuliert. Für den Fall der *inaktiv offenen* Konformation wurde nur die Relaxation des Pfropfens bei unveränderter Porteinstruktur untersucht. Bei der *aktiv geschlossenen* Konformation lag das Augenmerk auf den strukturellen Veränderungen des Proteins, da der Pfropfen nicht aus dem Porenbereich entfernt wurde. Für den Fall der *aktiv offenen* Konformation des Proteinkanals wurde die Dynamik der Relaxation beider Veränderungen untersucht; der Proteinkanal liegt in der aktiven Konformation vor, gleichzeitig befindet sich der Pfropfen außerhalb der Porenregion.

5.7.1. Ergebnisse

Zur Analyse des Relaxationsprozesses wurde die strukturelle Abweichung entlang der Trajektorie für verschiedene Teile der Struktur bezüglich einer Referenzstruktur berechnet. Als Referenz diente die equilibrierte Struktur der *inaktiv geschlossenen* Konformation des Proteinkanals. Sie steht stellvertretend für den Proteinkanal im nicht-translozierenden Zustand. Die Berechnung des RMSD-Wertes erfolgte für die SecY-Untereinheit, den Propfen, sowie für die Pore. Bei der SecY-Untereinheit wurden Atome des Pfropfens nicht berücksichtigt, da diese sehr beweglich sind und damit die Relaxation der relevanten Proteinstruktur in den Systemen mit abgezogenem Pfropfen überlagern würden. Zur visuellen Bewertung des Relaxationsprozesses wurden zusätzlich Momentaufnahmen der Proteinstruktur vom Start und vom Ende der Simulation mit der Referenzstruktur überlagert und das System auf Abdichtung des Kanals geprüft. Die Ergebnisse der Analyse werden getrennt für die einzelnen simulierten Systeme vorgestellt (**Abb. 5.20**, **Abb. 5.21** und **Abb. 5.22**) und im Anschluss diskutiert.

5.7.1.1. Relaxation des Proteinkanals in der inaktiv offenen Konformation

Die Simulation des Proteinkanals in der *inaktiv offenen* Konformation startet aus einem Zustand, bei dem der Pfropfen aus der inaktiven Struktur des Proteinkanals entfernt wurde. In **Abb. 5.20A** sind die strukturellen Abweichungen der Substrukturen gezeigt. Die strukturelle Abweichung der SecY-Untereinheit ohne Pfropfen ist gering (ca. 1.7 Å) und während der gesamten Simulationszeit stabil (oberer Graph). Durch Abziehen des Pfropfens kommt es zu einer Veränderung der Loop-Regionen in diesem Bereich, was zu dem leicht erhöhten RMSD-Wert führt (mittlerer Graph). Deutliche Veränderungen der Gesamtstruktur, bzw. der

Verlust von Sekundärstruktur-Elementen konnten nicht beobachtet werden. In **Abb. 5.20B** ist eine gute Übereinstimmung zwischen der simulierten Struktur und der Referenzstruktur sowohl zu Beginn ($t = 0$ ns) als auch am Ende ($t = 10$ ns) der Trajektorie erkennbar.

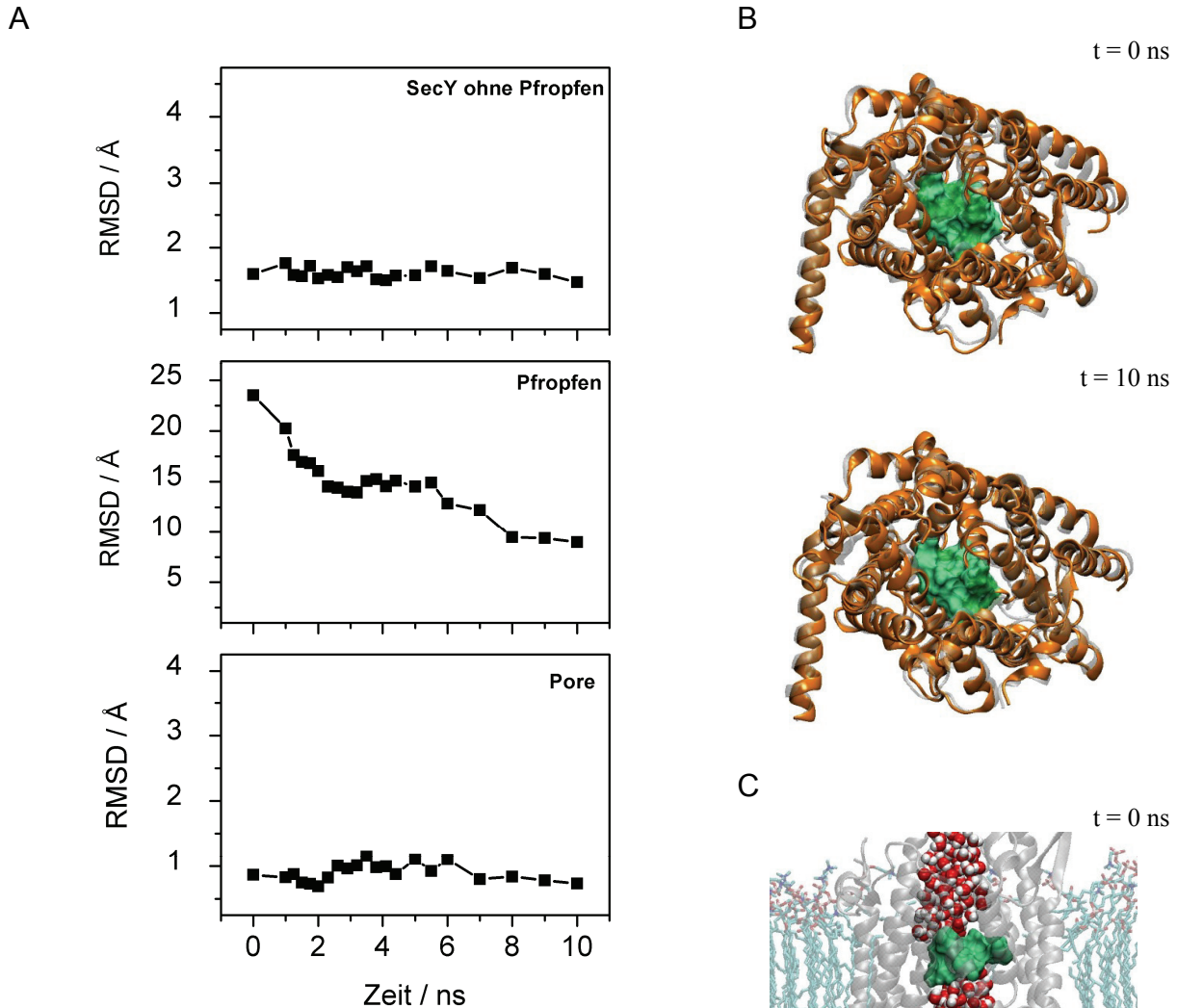


Abb. 5.20

Simulation des Proteinkanals in der inaktiv offenen Konformation zur Untersuchung des Relaxationsverhaltens. (A) Strukturelle Abweichung verschiedener Substrukturen (SecY-Untereinheit, Pfropfen, Pore). (B) Überlagerung der Startstruktur ($t = 0$ ns) und der Struktur am Ende der Simulation ($t = 10$ ns) mit der Referenzstruktur. Gezeigt ist die Aufsicht aus dem Cytoplasma auf den Proteinkanal. Die Proteinstruktur ist in orange (Cartoon-Darstellung), die Pore in grün (Surface-Darstellung) gezeigt. Die Referenzstruktur ist in grau bzw. dunkelgrün transparent im Hintergrund zu sehen. Wassermoleküle und Lipide sind nicht eingezeichnet. (C) Seitenansicht des Proteinkanals zu Beginn ($t = 0$ ns) und zum Ende ($t = 10$ ns) der Simulation. Das Proteinrückgrat ist transparent in grau (Cartoon-Darstellung), die Lipide transparent in Liccorice-Darstellung gezeigt. Die Pore und der Pfropfen sind in grün bzw. blau (Surface-Darstellung) eingezeichnet. Relevante Wassermoleküle sind in Van der Waals-Darstellung hervorgehoben.

Der Pfropfen nähert sich im Verlauf der Simulation an die Referenzstruktur an (Abb. 5.20A, mittlerer Graph). Die Ausrichtung der Struktur bezieht sich auf die SecY-Untereinheit ohne die Pfropfenregion. Aus diesem Grund sieht man im mittleren Bild nicht nur die strukturelle Abweichung des Pfropfens, sondern auch, die Translations- und Rotationsbewegung des Pfropfens bezogen auf die Referenzstruktur. Es sind Bereiche mit größerer struktureller Veränderung zu erkennen, sowie Bereiche mit konstantem RMSD-Wert (zwischen ca. 2 ns und ca. 6 ns). Der Pfropfen muss, um wieder komplett im Proteinkanal integriert zu sein, die sich dort befindlichen Wassermoleküle verdrängen. Diese haben sich beim Herausziehen des Pfropfens in den Proteinkanal hinein bewegt und liegen nun zwischen Pfropfen und Pore (siehe Abb. 5.20C, $t = 0$ ns). Aufgrund thermischer Fluktuationen können die Wassermoleküle von dieser Position wegdiffundieren und der Pfropfen kann sich wieder in Richtung Pore bewegen (siehe Abb. 5.20C, $t = 10$ ns). Am Ende der Simulation hat sich der Pfropfen sichtbar an die Pore angenähert, der RMSD-Wert sinkt von ca. 24 Å auf unter 8 Å. Der Pfropfen hat am Ende der Simulation noch nicht vollständig die Ausgangsposition, in der er in der *inaktiv geschlossenen* Konformation vorliegt, erreicht.

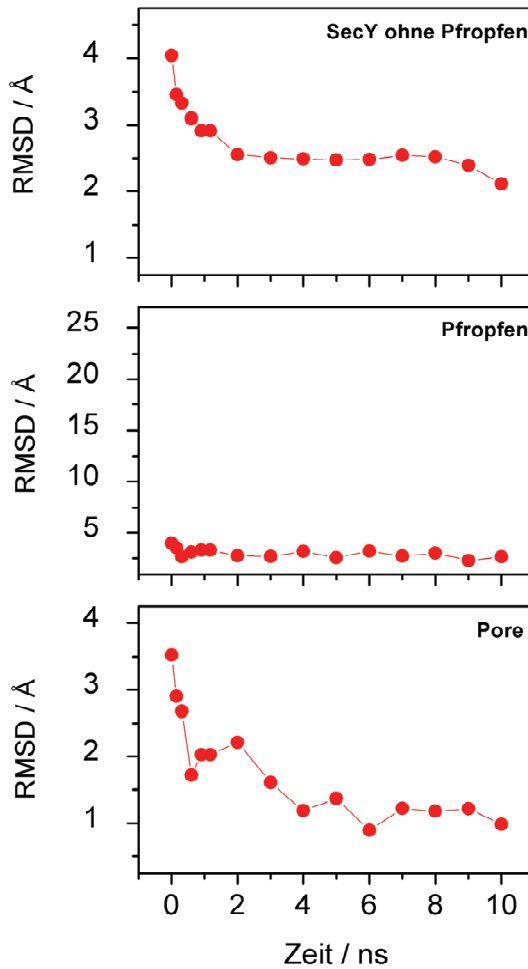
Die Pore zeigt im Verlauf der Simulation keine strukturellen Veränderungen und ist mit einem RMSD-Wert von nur ca. 1 Å sehr nahe an der Referenzstruktur (Abb. 5.20A, unterer Graph). Dies ist in Abb. 5.20B sowohl zu Beginn, wie auch zum Ende der Simulation deutlich zu erkennen. Über den gesamten Verlauf der Simulation bildet die Pore eine geschlossene Oberfläche und dichtet, wie auch in Abb. 5.20C zu sehen ist, den Kanal ab. Dadurch wird die Translokation von Wassermolekülen durch die Pore verhindert, obwohl der Pfropfen zu Beginn der Simulation komplett aus dem Porenbereich entfernt wurde.

5.7.1.2. Relaxation des Proteinkanals in der aktiv geschlossenen Konformation

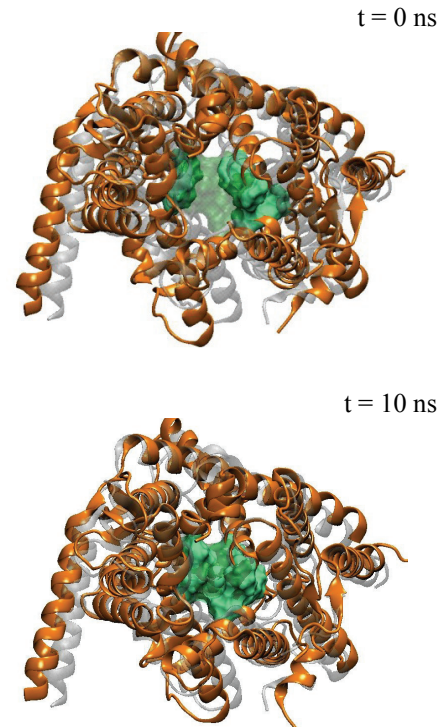
Die SecY-Untereinheit des Proteinkanals in der *aktiv geschlossenen* Konformation zeigt zu Beginn der Simulation eine strukturelle Abweichung von ca. 4 Å (Abb. 5.21A, oberer Graph), was auf eine veränderte Struktur der helikalen Bereiche der Pore zurückzuführen ist. Nach einer deutlichen Abnahme des RMSD-Wertes zu Beginn der Simulation bleibt er von 2 ns bis 8 ns konstant; das simulierte System nähert sich in dieser Zeit der Referenzstruktur nicht an. In den letzten beiden Nanosekunden setzt erneut eine strukturelle Annäherung des Systems an die Referenzstruktur ein. In Abb. 5.21B ($t = 0$ ns) ist der strukturelle Unterschied von simulierter Struktur und Referenzstruktur durch Überlagerung beider Strukturen verdeutlicht. Die veränderte Struktur der Untereinheit SecY hat auch Auswirkungen auf die Untereinheiten SecE und Secβ. Die Constraints, die in den bisherigen Simulationen zur Stabilisierung der

Struktur in der *aktiven* Konformation notwendig waren, sind nicht mehr vorhanden, da das System in den *inaktiven* Zustand relaxieren soll. Im Verlauf der Simulation (10 ns Simulationsdauer) hat sich die strukturelle Abweichung des simulierten Systems von der Referenzstruktur auf ca. 2.2 Å reduziert. Die Überlagerung beider Strukturen am Ende der Simulation (Abb. 5.21B, $t = 10$ ns) zeigt bereits eine sichtbare Annäherung der simulierten Struktur an die Referenzstruktur.

A



B



C

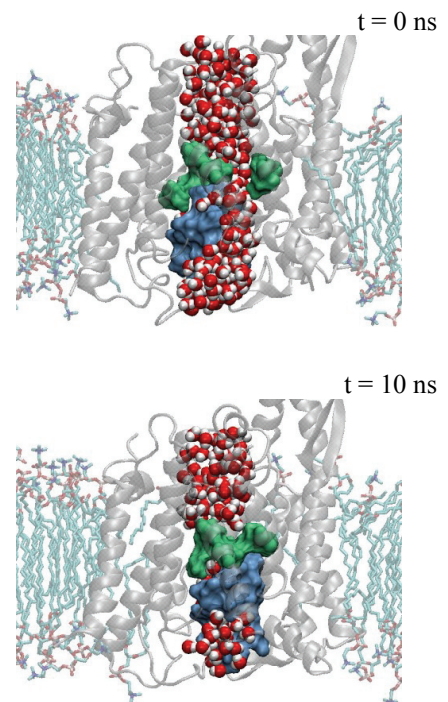


Abb. 5.21

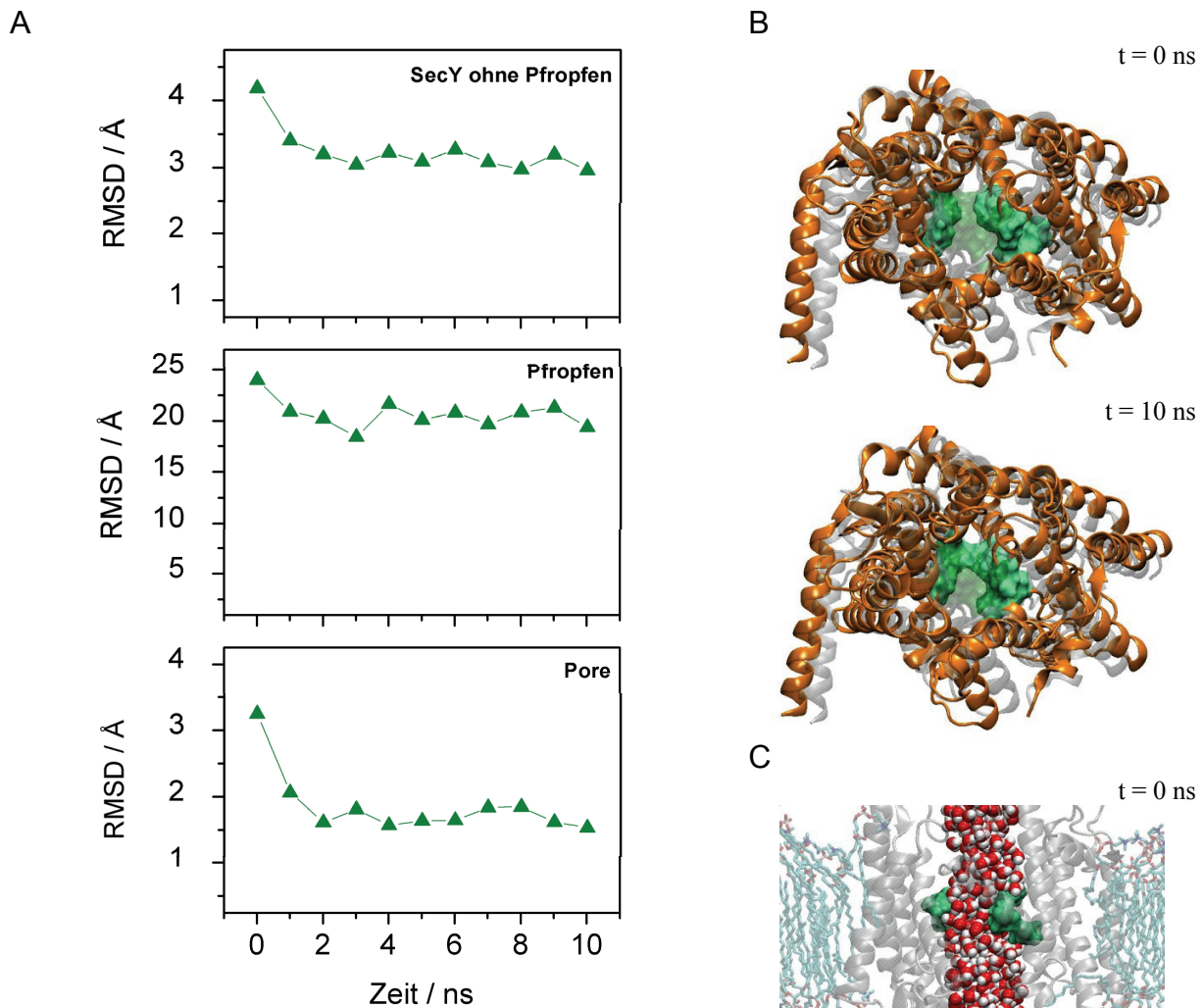
Simulation des Proteinkanals in der aktiv geschlossenen Konformation zur Untersuchung des Relaxationsverhaltens. (A) Strukturelle Abweichung verschiedener Substrukturen (SecY-Untereinheit, Pfropfen, Pore). (B) Überlagerung der Startstruktur ($t = 0$ ns) und der Struktur am Ende der Simulation ($t = 10$ ns) mit der Referenzstruktur. Gezeigt ist die Aufsicht aus dem Cytoplasma auf den Proteinkanal. Die Proteinstruktur ist in orange (Cartoon-Darstellung), die Pore in grün (Surface-Darstellung) gezeigt. Die Referenzstruktur ist in grau bzw. dunkelgrün transparent im Hintergrund zu sehen. Wassermoleküle und Lipide sind nicht eingezeichnet. (C) Seitenansicht des Proteinkanals zu Beginn ($t = 0$ ns) und zum Ende ($t = 10$ ns) der Simulation. Das Proteinrückgrat ist transparent in grau (Cartoon-Darstellung), die Lipide transparent in Licorice-Darstellung gezeigt. Die Pore und der Pfropfen sind in grün bzw. blau (Surface-Darstellung) eingezeichnet. Relevante Wassermoleküle sind in Van der Waals-Darstellung hervorgehoben.

Die strukturelle Abweichung des Pfropfens bleibt während der gesamten Simulationszeit annähernd auf einem konstanten Wert von ca. 2.5 Å (Abb. 5.21A, mittlerer Graph). Dies liegt an der Tatsache, dass sich die Position und die Struktur des Pfropfens beim Übergang von der *inaktiven* in die *aktive* Konformation nicht merklich verändert haben. Der leicht erhöhte RMSD-Wert der aktiven Konformation im Vergleich zur *inaktiv geschlossenen* Konformation kann darauf zurückgeführt werden, dass sich durch das Aufweiten der Porenregion, die Wechselwirkung zum Pfropfen verändert hat und dieser unterhalb der Pore eine leicht veränderte Position im Vergleich zur Referenzstruktur einnimmt.

Die Pore hat zu Beginn der Simulation einen RMSD-Wert von ca. 3.6 Å bezogen auf die Referenzstruktur. Der Unterschied ist in der Überlagerung beider Strukturen deutlich zu erkennen (Abb. 5.21B, $t = 0$ ns). Die Pore ist aufgeweitet und bildet in der Aufsicht keine geschlossene Oberfläche. Als Konsequenz können Wassermoleküle beobachtet werden, die sich während der Simulation durch die Pore bewegen (Abb. 5.21C, $t = 0$ ns). Im Verlauf der Simulation nähert sich die Struktur der Pore der Referenzstruktur an, was an dem abnehmenden RMSD-Wert zu erkennen ist. Am Ende der Simulation ist dieser Wert auf ca. 1 Å gesunken (Abb. 5.21A, mittlerer Graph). Die Pore des simulierten Systems ähnelt jetzt der Pore der Referenzstruktur, was deutlich in der Überlagerung beider Strukturen zu erkennen ist (Abb. 5.21B, $t = 10$ ns). Darüber hinaus sieht man, dass die Pore nun eine geschlossene Oberfläche bildet und den Kanal wieder verschließt. Es werden keine Wassermoleküle mehr beobachtet, die die Pore durchqueren (Abb. 5.21C, $t = 10$ ns).

5.7.1.3. Relaxation des Proteinkanals in der aktiv offenen Konformation

Der Verlauf der strukturellen Abweichung für die SecY-Untereinheit (Abb. 5.22A, oberer Graph) ähnelt dem Verlauf, der für den Proteinkanal in der *aktiv geschlossenen Konformation* aufgezeichnet werden konnte. Zu Beginn der Simulation liegt der RMSD-Wert bei ca. 4.1 Å. Der RMSD-Wert fällt bis ca. 2 ns ab und bleibt bis um Ende der Simulation annähernd konstant. Die Struktur der Untereinheit SecY relaxiert nicht so schnell, wie die Untereinheit SecY des Proteinkanals in der *aktiv geschlossenen* Konformation. In der Plateau-Phase (zwischen 2 ns und 8 ns) liegt die strukturelle Abweichung bei ca. 3.2 Å im Vergleich zu 2.5 Å für den RMSD-Wert in der *aktiv geschlossenen* Konformation. In der Überlagerung der Anfangs- und Endstrukturen mit der Referenzstruktur (Abb. 5.22B) ist eine Annäherung nach 10 ns Simulation zu erkennen, die aber geringer ausfällt als für die simulierte Struktur des Proteinkanals in der *aktiv geschlossenen* Konformation (Abb. 5.21B).

**Abb. 5.22**

Simulation des Proteinkanals in der aktiv offenen Konformation zur Untersuchung des Relaxationsverhaltens. (A) Strukturelle Abweichung verschiedener Substrukturen (SecY-Untereinheit, Pfropfen, Pore). (B) Überlagerung der Startstruktur ($t = 0$ ns) und der Struktur am Ende der Simulation ($t = 10$ ns) mit der Referenzstruktur. Gezeigt ist die Aufsicht aus dem Cytoplasma auf den Proteinkanal. Die Proteinstruktur ist in orange (Cartoon-Darstellung), die Pore in grün (Surface-Darstellung) gezeigt. Die Referenzstruktur ist in grau bzw. dunkelgrün transparent im Hintergrund zu sehen. Wassermoleküle und Lipide sind nicht eingezeichnet. (C) Seitenansicht des Proteinkanals zu Beginn ($t = 0$ ns) und zum Ende ($t = 10$ ns) der Simulation. Das Proteinrückgrat ist transparent in grau (Cartoon-Darstellung), die Lipide transparent in Liccorice-Darstellung gezeigt. Die Pore und der Pfropfen sind in grün bzw. blau (Surface-Darstellung) eingezeichnet. Relevante Wassermoleküle sind in Van der Waals-Darstellung hervorgehoben.

Der RMSD-Wert des Pfropfens sinkt in den ersten 2.5 ns von einem Anfangswert von ca. 24 Å auf ca. 19 Å. Dieser Wert bleibt bis zum Ende der Simulation konstant (Abb. 5.22A, mittlerer Graph). Der Pfropfen nähert sich, im Vergleich zum Pfropfen des Proteinkanals in der *inaktiv offenen* Konformation deutlich weniger bzw. langsamer an die Referenzstruktur

an. Die visuelle Inspektion zeigt, dass sich der Pfropfen zum Ende der Simulation zwar sichtbar in Richtung Pore bewegt hat, von dieser aber noch weit entfernt ist (Abb. 5.22C).

Die Pore ist am Anfang der Simulation aufgeweitet und kann den Kanal nicht abdichten. Dies ist sowohl in der Aufsicht (Abb. 5.22B, $t = 0$ ns) als auch in der Seitenansicht des Proteinkanals zu erkennen (Abb. 5.22C, $t = 0$ ns). Die Struktur der Pore ist vergleichbar mit der Porenstruktur in der *aktiv geschlossenen* Konformation, jedoch sind deutlich mehr Wassermoleküle zu erkennen, die sich im Porenbereich befinden. In der *aktiv offenen* Konformation des Proteinkanals fehlt der Pfropfen als zusätzlich abdichtendes Element. Der RMSD-Wert sinkt in den ersten 2 ns von anfänglich 3.3 Å auf ca. 1.6 Å, wo er sich im weiteren Verlauf der Simulation stabilisiert (Abb. 5.22A, unterer Graph). In der visuellen Inspektion der Struktur (Abb. 5.22B,C) kann man erkennen, dass sich der durchlässige Porenbereich verkleinert und es für Wassermoleküle immer schwieriger wird, den Porenbereich zu durchqueren. Am Ende der Simulation ist die Pore nicht vollständig geschlossen (Abb. 5.22B, $t = 10$ ns); es können somit immer noch Wassermoleküle im Porenbereich nachgewiesen werden (Abb. 5.22C, $t = 10$ ns).

5.7.2. Diskussion

Die drei vorgestellten Simulationen konnten einen ersten Einblick in den Relaxationsprozess des Proteinkanals SecY aus einer modellierten translozierenden in die nicht-translozierende Struktur geben.

Für die drei simulierten Systeme konnten unterschiedliche Relaxationsverhalten nachgewiesen werden. Keines der drei simulierten Systeme lag am Ende der Simulation (nach 10 ns) vollständig relaxiert vor. Von vollständig relaxiert kann ausgegangen werden, wenn der Proteinkanal in der *inaktiv geschlossenen* Konformation vorliegt. Die Simulationen lassen jedoch erste Aussagen über wichtige Voraussetzungen für eine effiziente Relaxation zu. Durch den Vergleich der verschiedenen Systeme konnte festgestellt werden, dass der Übergang aus der *aktiv geschlossen* in die *inaktiv geschlossene* Konformation schneller verläuft, als der Übergang von der *aktiv offenen* in die *inaktiv geschlossene* Konformation; gemeint ist die strukturelle Veränderung der Pore bzw. der SecY-Untereinheit ohne Pfropfen. Die Pore des Proteinkanals in der *aktiv geschlossenen* Konformation schließt vollständig nach ca. 2 ns und lässt im weiteren Verlauf der Simulation keine Wassermoleküle durch den Porenbereich hindurch. In der *aktiv offenen* Konformation ist dies nicht der Fall; hier finden sich auch noch nach einer Simulationsdauer von 10 ns Wassermoleküle in der Pore, da diese nicht vollständig geschlossen ist.

Ähnlich verhält sich die Untereinheit SecY des Proteinkanals in der *aktiv geschlossenen* Konformation, deren Struktur sich während der Simulation von 10 ns schneller der Referenzstruktur annähert und somit auch schneller in die relaxierte Struktur übergeht, als dies für die *aktiv offene* Konformation der Fall ist. Eine Erklärung für dieses Verhalten liefert die Tatsache, dass der Pfropfen nicht nur einen abdichtenden Effekt in der Pore hat, sondern die SecY-Untereinheit mit ihrer Porenregion in der *inaktiv geschlossenen* Konformation stabilisiert. Eine effiziente Relaxation in den nicht-translozierenden Zustand wird durch den Pfropfen unterhalb des Porenbereichs beschleunigt. Durch das Entfernen des Pfropfens hingegen kann der Proteinkanal einfacher in den aktiven, translozierenden Zustand übergehen, was die Pore für Polypeptide durchlässig macht.

MD-Simulationen der SecY-Untereinheit, mit dem Pfropfen in der geschlossenen Position, haben gezeigt, dass man Kugeln mit einem Durchmesser von bis zu 16 Å aus Richtung des Cytoplasmas (intrazelluläre Seite) in den Kanal einbringen kann und dieser nach Entfernen der Kugel innerhalb von Nanosekunden wieder in seine Ausgangsstruktur zurückkehrt [125]. Diese Entdeckung stimmt mit den Ergebnissen, die in dieser Arbeit bezüglich des Relaxationsverhaltens gemacht wurden überein. Darüber hinaus zeigen Crosslinking-Experimente [139], dass bei der Fixierung des Pfropfens im abgezogenen (offenen) Zustand des Proteinkanals, die Zellen nicht lebensfähig sind und sterben. Ursache hierfür könnte sein, dass der Kanal nicht in den *inaktiven* Zustand übergehen kann, da er nicht durch den Pfropfen stabilisiert wird und somit der Kanal nicht vollständig schließt. Der Pfropfen ist nicht nur für die Abdichtung des Kanals verantwortlich, sondern es könnte auch sein, dass der Relaxationsprozess der übrigen Proteinstruktur ohne Stabilisierung des Pfropfens zu langsam ist, um die Pore ausreichend schnell zu schließen. Eine gegenseitige Beeinflussung von Pfropfen und Porenstruktur ist auch beim Vergleich der Pfropfen-Relaxation in der Simulation der *offenen* Konformationen zu sehen. Der Pfropfen des Proteinkanals in der *inaktiv offenen* Konformation relaxiert schneller als die Pfropfenstruktur des Proteinkanals in der *aktiv offenen* Konformation.

5.8. Zusammenfassung des Kapitels

In diesem Kapitel wurden MD-Simulationen am Proteinkanal SecY aus dem Archaeobakterium *M. jannaschii* in einer *inaktiven* Form, basierend auf einer Kristallstruktur und einer modellierten, *aktiven* Form, basierend auf Kryo-EM-Daten, vorgestellt. Das Hauptaugenmerk dieser Untersuchung lag auf funktionellen Unterschieden, die durch die verschiedenen Konformationen hervorgerufen werden. Insgesamt wurden vier verschiedene Konformationen (*inaktiv geschlossen*, *inaktiv offen*, *aktiv geschlossen* und *aktiv offen*) untersucht. Die Strukturen wurden nicht nur in *inaktiv* und *aktiv* unterteilt; die Position des Pfropfens lieferte ein weiteres Unterscheidungskriterium. Es wurde zusätzlich unterschieden, ob sich der Pfropfen direkt unterhalb der Pore befindet (*geschlossen*) oder aus dem Kanalbereich gezogen war (*offen*).

In einem ersten Schritt wurde der Proteinkanal in der *inaktiv geschlossenen* Konformation in einer Lipid-Wasser-Umgebung für eine Gesamtdauer von 22 ns equilibriert. Die Simulation resultierte in einer stabilen Struktur, die mit den Vorgaben der Kristallstruktur gut übereinstimmte und als Startstruktur für weitere Simulationen diente.

Durch Veränderung der Lage der helikalen Segmente im Porenbereich des Kanals, mit Hilfe von harmonischen Constraints und anschließender Equilibrierung, konnte eine stabile Modellstruktur des Proteinkanals in der *aktiv geschlossenen* Konformation erzeugt werden.

Die beiden Konformationen (*inaktiv geschlossen* und *aktiv geschlossen*) unterscheiden sich somit im Porenbereich des Proteinkanals. In der *inaktiv geschlossenen* Konformation bildet die Pore eine geschlossene Struktur und dichtet so den Kanal ab. Die Pore in der *aktiv geschlossenen* Konformation ist geweitet und der Kanal somit nicht vollständig geschlossen. Der Proteinkanal in der *aktiv geschlossenen* Konformation stellt eine mögliche Struktur des Proteinkanals während des Translokationsprozesses dar.

Eine Voraussetzung für die Translokation eines Polypeptides ist, dass sich der Pfropfen aus dem Porenbereich bewegen muss, um genügend Platz für das translozierte Polypeptid zu schaffen. Mit Hilfe von SMD-Simulationen, die den Pfropfen aus der Pore entfernt haben, konnte gezeigt werden, dass die dazu notwendige Kraft in der *inaktiv geschlossenen* Konformation des Proteinkanals mit 1100 pN deutlich größer ist, als für den Proteinkanal in der *aktiv geschlossenen* Konformation (600 pN). Eine Berechnung der Änderung der Freien Energie, um den Pfropfen aus der Pore zu entfernen, konnte anhand einer statistischen Analyse von je 10 SMD-Simulationen pro System durchgeführt werden. Im Fall der *inaktiv geschlossenen* Konformation muss bereits eine Potentialbarriere von $72 \pm 13 \text{ k}_B\text{T}^{(300\text{K})}$ über-

wunden werden, um den Pfropfen um 6 \AA von der Pore zu ziehen; im *aktiv geschlossenen* Fall sind es lediglich $13 \pm 11 k_B T^{(300K)}$. Ein Vergleich mit biologisch relevanten Potentialbarrieren zeigt, dass der Pfropfen in der *inaktiv geschlossenen* Konformation sehr fest im Porenbereich sitzt und eine Abschätzung der MFPT ergibt, dass sich der Pfropfen in einer biologisch relevanten Zeit thermisch nicht von der Pore lösen kann. Im Fall der *aktiv geschlossenen* Konformation zeigt sich, dass hier ein thermisch aktiviertes Abgehen des Pfropfens im Millisekundenbereich möglich ist. Die Konformationsänderung von der *inaktiven* in die modellierte *aktive* Form weitet den Porenbereich und destabilisiert damit die Wechselwirkung des Porenbereichs zum Pfropfen. Zu einer effizienten Öffnung des Proteinkanals ist eine Konformationsänderung notwendig, die durch Bindung des Ribosoms ausgelöst wird. Damit lässt sich der Pfropfen mit moderatem Energieaufwand aus dem Porenbereich entfernen.

Eine weitere wichtige Eigenschaft ist die Abdichtung des Proteinkanals gegen Wassermoleküle und Ionen. MD-Simulationen zur Untersuchung der Abdichtung des Kanals sowie SMD-Simulationen, bei denen ein Wassermolekül bzw. ein Natriumion gezielt durch den Porenbereich bewegt wurden, haben gezeigt, dass die *inaktiv geschlossene* Konformation den Proteinkanal durch Zusammenspiel von Pfropfen und Pore sehr gut abdichtet; sie erfordert einen hohen Arbeitsaufwand, um Wasser bzw. Natriumionen durch den Porenbereich zu ziehen (ca. $25 k_B T^{(300)}$ bzw. $55 k_B T^{(300K)}$). Wird nur der Pfropfen entfernt, so ist die Pore immer noch in der Lage den Kanal im Verlauf der Simulation abzudichten, die aufzubringende Arbeit ist jedoch deutlich geringer (ca. $10 k_B T^{(300)}$ bzw. $25 k_B T^{(300K)}$). Der Proteinkanal in seiner *aktiven* Konformation ist sowohl *offen* als auch *geschlossen* nicht in der Lage, eine Barriere für Wassermoleküle zu bilden.

Nach vollendeter Translokation des Polypeptids muss ein rascher Übergang aus der *aktiven* in die *inaktive* Konformation stattfinden, um den unkontrollierten Austausch von Wassermolekülen und Ionen zu verhindern. MD-Simulationen des Proteinkanals in der *inaktiv offenen*, *aktiv geschlossenen* und *aktiv offenen* Konformation, zeigten nach Entfernung aller Constraints innerhalb von 10 ns ein unterschiedliches Relaxationsverhalten in die *inaktiv geschlossene* Konformation.

Die Abdichtung des Porenbereichs erfolgte in der *aktiv geschlossenen* Konformation deutlich schneller als im Fall der *aktiv offenen* Konformation. Bereits nach 2 ns war der Kanal für den weiteren Verlauf der Simulation für Wassermoleküle undurchlässig. Für die *aktiv offene* Konformation des Proteinkanals, war dieser Zustand bis zum Ende der Simulation noch nicht erreicht. Ähnliches war für die gesamte SecY-Untereinheit zu beobachten. Auch hier verlief

der Relaxationsprozess in der *aktiv geschlossenen* Konformation merklich schneller ab als im Fall der *aktiv offenen* Konformation.

Der Pfropfen war sowohl in der *inaktiv offenen*, wie auch in der *aktiv offenen* Konformation aus dem Porenreich entfernt worden. Die Relaxation des Pfropfens zurück in den Zustand direkt unterhalb der Pore verlief in der *inaktiv offenen* Konformation wesentlich schneller als in der *aktiv offenen* Konformation. Dieses unterschiedliche Relaxationsverhalten lässt die Schlussfolgerung zu, dass sich die Struktur des Pfropfens und die des Porenbereichs gegenseitig beeinflussen. Der Pfropfen dichtet nicht nur den Kanals ab, sondern stabilisiert auch den gesamten Porenbereich in der *inaktiven* Konformation. Umgekehrt sorgt die Porenstruktur in der *inaktiven* Konformation für eine beschleunigte Relaxation des Pfropfens in seine ursprüngliche Position (unterhalb des Porenbereichs).

6. Zusammenfassung der Dissertation

Die Molekulardynamik (MD)-Simulation stellt eine wichtige Methode zur theoretischen Untersuchung biologischer Systeme dar. Die Hauptanwendung heutiger MD-Simulationen ist die Beschreibung der Dynamik und der Funktion von Proteinen und Proteinkomplexen auf mikroskopischer Ebene, um einen detaillierten Einblick in die ablaufenden Prozesse einer Zelle zu erhalten. Hierbei kann die Methode der MD-Simulation einen wichtigen Beitrag leisten, denn sie erlaubt es, ein atomistisches Bild der Dynamik von Proteinen zu liefern; eine Eigenschaft, die bislang von keiner experimentellen Untersuchungsmethode erbracht wird. Durch numerische Integration der Newtonschen Bewegungsgleichungen erhält man, für jedes Atom i im System, die Trajektorie $r_i(t)$. Heutzutage lassen sich routinemäßig Systeme bis zu 10^5 Atome auf Zeitskalen im Nanosekundenbereich simulieren. Viele biologisch relevante Prozesse laufen auf Zeitskalen ab, die mit der konventionellen MD-Simulation nicht erreicht werden können. Mit Hilfe von beschleunigten Simulationsverfahren wie *Steered Molecular Dynamics* (SMD) in Kombination mit statistischen Analyseverfahren wie beispielsweise Fluktuationstheoremen, lassen sich diese Prozesse quantitativ erfassen.

In dieser Arbeit werden MD- sowie SMD-Simulationen an drei biologischen Systemen vorgestellt. Das Hauptaugenmerk liegt dabei in der Verknüpfung von strukturellen Eigenschaften der Proteine oder Proteinkomplexe mit ihrer Funktionalität. Im Folgenden werden die wichtigsten Ergebnisse aus diesen Untersuchungen vorgestellt.

Strukturelle Stabilität verschiedener Mutanten und Fragmente des Tumornekrosefaktor-Rezeptors 1

Der Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1 (TNFR1) ist ein Membranprotein, das eine wichtige Rolle in der Tumornekrosefaktor (TNF)-vermittelten Apoptose spielt und für die Weiterleitung des initialen Signals in die Zelle verantwortlich ist. Seine extrazelluläre Domäne lässt eine strukturelle Unterteilung in vier so genannte cysteinreiche Domänen (CRD1-4) zu, denen bestimmte Funktionen zugeordnet werden können. CRD2 und CRD3 sind für Ligandenbindung zu TNF verantwortlich; von CRD1 wird angenommen, dass sie für die Rezeptor-Rezeptor-Wechselwirkung notwendig ist. Für eine erfolgreiche Signaltransduktion sind sowohl eine Rezeptor-Ligand- als auch eine Rezeptor-Rezeptor-Wechselwirkung notwendig. Die CRDs wiederum lassen sich in zwei Untereinheiten A1 und B2 unterteilen.

Experimentelle Studien zeigen, dass eine Entfernung der CRD1 nicht nur zur Unterbindung der Rezeptor-Rezeptor-Wechselwirkung führt, sondern auch zu einem Verlust der Bindungsaffinität des Rezeptors zum Liganden. Diese Eigenschaft ist anhand der bisher angenommenen Struktur-Funktions-Beziehung nicht zu erklären.

MD-Simulationen zeigen, dass die extrazelluläre Domäne des TNFR ($TNFR_{ex}$) aus einer alternierenden Reihenfolge von A1- und B2-Subdomänen besteht, die die kleinste, strukturell stabile Einheit darstellen. Die Flexibilität von $TNFR1_{ex}$ ist auf die Relativbewegung dieser Subdomänen zurückzuführen. Die Intra-CRD-Bewegung tritt dabei ausgeprägter auf als die Inter-CRD-Bewegung. Nach Deletion von CRD1 ($\Delta CRD1-TNFR1_{ex}$) tritt in der nachfolgenden Subdomäne $A1_{CRD2}$ eine deutliche Konformationsänderung auf. Dies ist auf die nicht mehr vorhandene Stabilisierung der Subdomäne B2 aus CRD1 zurückzuführen und kann den experimentell gemessenen Verlust der Ligandenbindung erklären. Eine Mutante $\Delta A1_{CRD1}-TNFR1_{ex}$, bei der lediglich die erste Subdomäne der CRD1 $A1_{CRD1}$ entfernt wurde, zeigte diese Destabilisierung von $A1_{CRD2}$ nicht. In diesem Fall war der stabilisierende Effekt durch die verbliebene Subdomäne $B2_{CRD1}$ gegeben. Experimentell kann bei dieser Mutante eine Ligandenbindung nachgewiesen werden, eine Rezeptor-Rezeptor-Interaktion ist jedoch nicht vorhanden. Ein ähnliches Bild zeigt sich bei der Untersuchung des isolierten Proteinfragmentes CRD1 ($A1B2_{CRD1}$). Hier erwartet man eine CRD1-CRD1-Interaktion, die im Experiment nicht nachgewiesen werden konnte. MD-Simulationen zeigen, dass es hier zu einer erhöhten Flexibilität von $B2_{CRD1}$ kommt. Diese strukturelle Flexibilität kann reduziert werden, indem das Fragment zusätzlich um die Subdomäne $A1_{CRD2}$ erweitert wird ($A1B2_{CRD1}A1_{CRD2}$). Die Stabilisierung von CRD1 sollte sich in einer CRD1-CRD1-Interaktion widerspiegeln, was experimentell noch gezeigt werden muss. Bei isolierter CRD1 mit

einem Glutathion-S-Transferase (GST)-tag konnte eine solche CRD1-CRD1-Interaktion bereits nachgewiesen werden.

Die MD-Simulationen am TNFR1_{ex}-System zeigen, dass die CRDs der extrazellulären Domäne von TNFR1 bestimmte Funktionen erfüllen. Diese Funktionen treten aber nur im Verbund mit benachbarten Subdomänen auf, da die benachbarten Subdomänen für die Stabilisierung der CRDs notwendig sind. Diese Erkenntnis ist für die Entwicklung eines Arzneimittels zur spezifischen Unterdrückung der Apoptose wichtig. Als mögliche Arzneimittel kommen TNFR1-Mutanten oder TNFR1-Fragmente in Frage, die speziell angepasste Funktionen besitzen.

Untersuchung eines möglichen Pfades für Ubichinon-Diffusion durch den LH1-Ring im Purpurbakterium *Rhodospirillum rubrum*

Der Lichtsammelkomplex 1 (LH1) und das Reaktionszentrum (RC) der photosynthetischen Einheit aus dem Purpurbakterium *Rhodospirillum rubrum* sind für die Absorption von Licht und die Erzeugung von Elektronen verantwortlich. Elektronen werden von dem mobilen Elektronencarrier Ubichinon vom RC zu weiteren Pigment-Protein-Komplexen in der Membran befördert. Anhand struktureller Daten ist bekannt, dass der LH1-Ring in dieser Spezies eine geschlossene Struktur um das RC bildet. Hierbei stellt sich die Frage, wie das Ubichinon diese Proteinbarriere überwinden kann.

MD-Simulationen an einer Modellstruktur des LH1-RC-Komplexes zeigen, dass es durch die Flexibilität, der im LH1-Ring eingebauten Chlorophylle, zur Ausbildung von Kanälen bzw. Lücken im LH1-Ring kommen kann. Mit Hilfe von SMD-Simulationen an einem Minimalmodell des LH1-Rings, lässt sich das Ubichinon durch einen dieser Kanäle ziehen. Die SMD-Simulation führt zu keiner strukturellen Veränderung des LH1-Rings. SMD-Simulationen in umgekehrter Richtung ergeben ein vergleichbares Ergebnis; die Simulationspfade des Ubichinon-Moleküls sind sehr ähnlich.

Die Änderung der Freien Energie entlang des gefundenen Pfades wird in beiden Richtungen mit Hilfe von mehrfach durchgeführten SMD-Simulationen und einer statistischen Analyse der resultierenden Arbeitsverteilungen mit der Kumulantenentwicklung bis zur zweiten Ordnung rekonstruiert. Beide Potentialverläufe weisen ähnliche Merkmale auf, die mit strukturellen Gegebenheiten in Verbindung gebracht werden können. Durch Bestimmung des statistischen Fehlers und Kombination von Daten beider Potentialverläufe mit minimalem Fehler, ergibt sich ein kombinierter Potentialverlauf mit der kleinsten statistischen Ungenauigkeit. Dieser Potentialverlauf kann noch alle strukturellen Merkmale wiedergeben. Aus-

gehend von einer eindimensionalen Diffusionsbewegung des Ubichinons entlang des ermittelten Pfades, lässt sich im ungünstigsten Fall (bei Berücksichtigung aller Fehler) eine mittlere Diffusionszeit von 8 ms bestimmen, mit der das Ubichinon durch den LH1-Ring diffundiert. Daraus ergibt sich eine Abschätzung der Turnover-Rate des LH1-RC-Systems von ca. 50 Hz. Ein Vergleich der Turnover-Rate mit experimentellen Daten unterstützt das Ergebnis der Simulationen, dass das Ubichinon in einer biologisch relevanten Zeit durch den geschlossenen LH1-Ring diffundieren kann. Dies erklärt, warum alle bislang bekannten experimentellen Strukturdaten von LH1 bzw. LH1-RC-Komplexen aus *R. rubrum* eine geschlossene Ringstruktur aufweisen und dies kein Widerspruch zum Ubichinon-Transport darstellt.

Untersuchung des Proteintranslokationskanals SecY aus *Methanococcus jannaschii*

Der Proteintranslokationskanal (SecY-Komplex) aus dem Archaeobakterium *Methanococcus jannaschii* (*M. jannaschii*) ist für die Translokation von Proteinen durch die Membran bzw. für deren Einbau in die Membran verantwortlich. Zwei Hauptmerkmale der Struktur sind zum einen die Pore, bestehend aus sechs hydrophoben Aminosäuren, und zum anderen der Pfropfen, der von einer kurzen α -Helix gebildet wird. Im nicht-translozierenden Fall (*inaktive* Konformation), ist die Pore geschlossen und der Pfropfen sitzt direkt unterhalb der Pore. Um ein Protein durch den Kanal zu transportieren muss sich der Pfropfen aus dem Porenbereich bewegen und die Pore muss sich aufweiten (*aktive* Konformation). Von SecY sind sowohl eine Kristallstruktur in der *inaktiven* Konformation, als auch Kryo-EM-Daten der *aktiven* Konformation, gebunden an ein Ribosom vorhanden. Mit Hilfe von MD-Simulationen lässt sich die Kristallstruktur aus der *inaktiven* in die *aktive* Struktur überführen. Diese Modellstruktur stimmt mit den Kryo-EM-Daten gut überein. Zwischen den beiden Strukturen gibt es klare Unterschiede in Bezug auf die Bindung des Pfropfens und die Abdichtung des Kanals.

In der *inaktiven* Konformation sitzt der Pfropfen fest gebunden direkt unterhalb der Pore und es muss eine Potentialbarriere von $72 \pm 13 \text{ k}_B T^{(300K)}$ überwunden werden, um den Pfropfen 6 Å von der Pore wegzubewegen. Diese Potentialbarriere ist in der *aktiven* Konformation mit $13 \pm 11 \text{ k}_B T^{(300K)}$ deutlich reduziert. Um ein Abgehen des Pfropfens auf einer Millisekunden-Zeitskala (relevant für die Proteintranslokation) zu ermöglichen, ist eine Konformationsänderung aus der *inaktiven* in die *aktive* Konformation notwendig. Die Bindung des Ribosoms kann eine solche Konformationsänderung induzieren.

In Übereinstimmung mit experimentellen Ergebnissen einer Studie zur Ionenleitfähigkeit und Wasserpermeabilität des SecY-Proteinkanals, zeigen die MD-Simulationen, dass SecY in der *inaktiven* Konformation das größte Hindernis für die Translokation eines Wassermoleküls bzw. eines Natriumions durch den Porenbereich darstellt. Wird der Pfropfen entfernt, oder geht der Proteintranslokationskanal in die *aktive* Form über, nimmt die notwendige Arbeit zur Translokation von Wasser bzw. Natriumionen deutlich ab. In der *aktiven* Konformation können Wassermoleküle den Porenbereich sogar spontan im Nanosekundenbereich durchqueren.

Bei Relaxation des Proteinkanals in der *aktiven* sowie der *inaktiven* Form ist der Pfropfen nicht nur an der Abdichtung des Kanals beteiligt, sondern trägt auch zur Stabilisierung der kompletten Proteinstruktur im Porenbereich bei. Befindet sich der Pfropfen unterhalb der Pore, so wird die Relaxation in die *inaktive* Konformation beschleunigt. Liegt SecY umgekehrt in der *inaktiven* Konformation vor, dann bewegt sich der Pfropfen schneller aus der abgezogenen Position in Richtung Pore zurück, als wenn sich SecY in der *aktiven* Konformation befindet.

Literaturverzeichnis

1. Alder, B. J., and T. E. Wainwright. 1957. Phase Transition for a Hard Sphere System. *J. Chem. Phys.* 27:1208-1209.
2. Alder, B. J., and T. E. Wainwright. 1959. Studies in Molecular Dynamics .1. General Method. *J. Chem. Phys.* 31:459-466.
3. McCammon, J. A., B. R. Gelin, and M. Karplus. 1977. Dynamics of Folded Proteins. *Nature* 267:585-590.
4. Jorgensen, W. L., J. Chandrasekhar, J. D. Madura, R. W. Impey, and M. L. Klein. 1983. Comparison of Simple Potential Functions for Simulating Liquid Water. *J. Chem. Phys.* 79:926-935.
5. Ryckaert, J. P., G. Ciccotti, and H. J. C. Berendsen. 1977. Numerical-Integration of Cartesian Equations of Motion of a System with Constraints - Molecular-Dynamics of N-Alkanes. *J. Comput. Phys.* 23:327-341.
6. Cornell, W. D., P. Cieplak, C. I. Bayly, I. R. Gould, K. M. Merz, D. M. Ferguson, D. C. Spellmeyer, T. Fox, J. W. Caldwell, and P. A. Kollman. 1995. A 2nd Generation Force-Field for the Simulation of Proteins, Nucleic-Acids, and Organic-Molecules. *J. Am. Chem. Soc.* 117:5179-5197.
7. Weiner, S. J., P. A. Kollman, D. A. Case, U. C. Singh, C. Ghio, G. Alagona, S. Profeta, and P. Weiner. 1984. A New Force-Field for Molecular Mechanical Simulation of Nucleic-Acids and Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* 106:765-784.
8. MacKerell, A. D., D. Bashford, M. Bellott, R. L. Dunbrack, J. D. Evanseck, M. J. Field, S. Fischer, J. Gao, H. Guo, S. Ha, D. Joseph-McCarthy, L. Kuchnir, K. Kuczera, F. T. K. Lau, C. Mattos, S. Michnick, T. Ngo, D. T. Nguyen, B. Prodhom, W. E. Reiher, B. Roux, M. Schlenkrich, J. C. Smith, R. Stote, J. Straub, M. Watanabe, J. Wiorkiewicz-Kuczera, D. Yin, and M. Karplus. 1998. All-Atom Empirical Potential for Molecular Modeling and Dynamics Studies of Proteins. *J. Phys. Chem. B* 102:3586-3616.
9. Lamoureux, G., and B. Roux. 2003. Modeling Induced Polarization with Classical Drude Oscillators: Theory and Molecular Dynamics Simulation Algorithm. *J. Chem. Phys.* 119:3025-3039.
10. Eurenium, K. P., D. C. Chatfield, B. R. Brooks, and M. Hodoseck. 1996. Enzyme Mechanisms with Hybrid Quantum and Molecular Mechanical Potentials: 1. Theoretical Considerations. *International Journal of Quantum Chemistry* 60:1189-1200.
11. www.rcsb.org.
12. Moore, G. E. 1998. Cramming More Components onto Integrated Circuits (Reprinted from *Electronics*, Pg 114-117, April 19, 1965). *Proceedings of the Ieee* 86:82-85.
13. Freddolino, P. L., A. S. Arhipov, S. B. Larson, A. McPherson, and K. Schulten. 2006. Molecular Dynamics Simulations of the Complete Satellite Tobacco Mosaic Virus. *Structure* 14:437-449.
14. Jayachandran, G., V. Vishal, and V. S. Pande. 2006. Using Massively Parallel Simulation and Markovian Models to Study Protein Folding: Examining the Dynamics of the Villin Headpiece. *J. Chem. Phys.* 124.
15. Torrie, G. M., and J. P. Valleau. 1974. Monte-Carlo Free-Energy Estimates Using Non-Boltzmann Sampling - Application to Subcritical Lennard-Jones Fluid. *Chem. Phys. Lett.* 28:578-581.
16. Amadei, A., A. B. M. Linssen, and H. J. C. Berendsen. 1993. Essential Dynamics of Proteins. *Proteins-Structure Function and Genetics* 17:412-425.
17. Isralewitz, B., M. Gao, and K. Schulten. 2001. Steered Molecular Dynamics and Mechanical Functions of Proteins. *Curr. Opin. Struc. Biol.* 11:224-230.

18. Kumar, S., D. Bouzida, R. H. Swendsen, P. A. Kollman, and J. M. Rosenberg. 1992. The Weighted Histogram Analysis Method for Free-Energy Calculations on Biomolecules: 1. The Method. *J. Comput. Chem.* 13:1011-1021.
19. Jarzynski, C. 1997. Nonequilibrium Equality for Free Energy Differences. *Phys. Rev. Lett.* 78:2690-2693.
20. Allen, M. P., and D. J. Tildesley. 1989. *Computer Simulation of Liquids*. Clarendon Press.
21. Leach, A. R. 2001. *Molecular Modelling - Principles and Application*. Pearson Education Limited.
22. Schlick, T. 2002. *Molecular Modeling and Simulation: An Interdisciplinary Guide*. Springer Verlag.
23. Hansson, T., C. Oostenbrink, and W. F. van Gunsteren. 2002. Molecular Dynamics Simulations. *Curr. Opin. Struc. Biol.* 12:190-196.
24. van Gunsteren, W. F., and H. J. C. Berendsen. 1990. *Computer-Simulation of Molecular-Dynamics - Methodology, Applications, and Perspectives in Chemistry*. *Angewandte Chemie-International Edition in English* 29:992-1023.
25. Haken, H., and H. C. Wolf. 1992. *Molekülphysik und Quantenchemie*. Springer-Verlag.
26. Schuler, L. D., X. Daura, and W. F. Van Gunsteren. 2001. An Improved Gromos96 Force Field for Aliphatic Hydrocarbons in the Condensed Phase. *J. Comput. Chem.* 22:1205-1218.
27. Allinger, N. L., K. S. Chen, and J. H. Lii. 1996. An Improved Force Field (MM4) for Saturated Hydrocarbons. *J. Comput. Chem.* 17:642-668.
28. Halgren, T. A., and B. L. Bush. 1996. The Merck Molecular Force Field (MMff94). Extension and Application. *Abstr. Pap. Am. Chem. S.* 212:2-COMP.
29. MacKerell, A. D., N. Banavali, and N. Foloppe. 2000. Development and Current Status of the CHARMM Force Field for Nucleic Acids. *Biopolymers* 56:257-265.
30. Kale, L., R. Skeel, M. Bhandarkar, R. Brunner, A. Gursoy, N. Krawetz, J. Phillips, A. Shinozaki, K. Varadarajan, and K. Schulten. 1999. NAMD2: Greater Scalability for Parallel Molecular Dynamics. *J. Comput. Phys.* 151:283-312.
31. Verlet, L. 1967. Computer Experiments on Classical Fluids: I. Thermodynamical Properties of Lennard-Jones Molecules. *Physical Review* 159:98-&.
32. Hockney, R. W. 1970. *The Potential Calculation and Some Applications*. Academic Press.
33. Swope, W. C., H. C. Andersen, P. H. Berens, and K. R. Wilson. 1982. A Computer-Simulation Method for the Calculation of Equilibrium-Constants for the Formation of Physical Clusters of Molecules - Application to Small Water Clusters. *J. Chem. Phys.* 76:637-649.
34. Schlick, T., E. Barth, and M. Mandziuk. 1997. Biomolecular Dynamics at Long Timesteps: Bridging the Timescale Gap between Simulation and Experimentation. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 26:181-222.
35. Ewald, P. P. 1921. The Calculation of Optical and Electrostatic Grid Potential. *Annalen Der Physik* 64:253-287.
36. Darden, T., D. York, and L. Pedersen. 1993. Particle Mesh Ewald - an N Log(N) Method for Ewald Sums in Large Systems. *J. Chem. Phys.* 98:10089-10092.
37. Woodcock, L. V. 1971. Isothermal Molecular Dynamics Calculations for Liquid Salts. *Chem. Phys. Lett.* 10:257-&.
38. Berendsen, H. J. C., J. P. M. Postma, W. F. Vangunsteren, A. Dinola, and J. R. Haak. 1984. Molecular-Dynamics with Coupling to an External Bath. *J. Chem. Phys.* 81:3684-3690.
39. Andersen, H. C. 1980. Molecular-Dynamics Simulations at Constant Pressure and/or Temperature. *J. Chem. Phys.* 72:2384-2393.

40. Feller, S. E., Y. H. Zhang, R. W. Pastor, and B. R. Brooks. 1995. Constant-Pressure Molecular-Dynamics Simulation - The Langevin Piston Method. *J. Chem. Phys.* 103:4613-4621.
41. Sotomayor, M., and K. Schulten. 2007. Single-Molecule Experiments in Vitro and in Silico. *Science* 316:1144-1148.
42. Wriggers, W., and K. Schulten. 1997. Protein Domain Movements: Detection of Rigid Domains and Visualization of Hinges in Comparisons of Atomic Coordinates. *Proteins-Structure Function and Genetics* 29:1-14.
43. Park, S., F. Khalili-Araghi, E. Tajkhorshid, and K. Schulten. 2003. Free Energy Calculation from Steered Molecular Dynamics Simulations Using Jarzynski's Equality. *J. Chem. Phys.* 119:3559-3566.
44. Park, S., and K. Schulten. 2004. Calculating Potentials of Mean Force from Steered Molecular Dynamics Simulations. *J. Chem. Phys.* 120:5946-5961.
45. Kosztin, I., B. Barz, and L. Janosi. 2006. Calculating Potentials of Mean Force and Diffusion Coefficients from Nonequilibrium Processes without Jarzynski's Equality. *J. Chem. Phys.* 124:064106.
46. Wajant, H., K. Pfizenmaier, and P. Scheurich. 2003. Tumor Necrosis Factor Signaling. *Cell Death Differ.* 10:45-65.
47. Locksley, R. M., N. Killeen, and M. J. Lenardo. 2001. The TNF and TNF Receptor Superfamilies: Integrating Mammalian Biology. *Cell* 104:487-501.
48. Aggarwal, B. B. 2003. Signalling Pathways of the TNF Superfamily: A Double-Edged Sword. *Nat. Rev. Immunol.* 3:745-756.
49. Naismith, J. H., and S. R. Sprang. 1998. Modularity in the TNF-Receptor Family. *Trends Biochem Sci* 23:74-79.
50. Krippner-Heidenreich, A., F. Tubing, S. Bryde, S. Willi, G. Zimmermann, and P. Scheurich. 2002. Control of Receptor-Induced Signaling Complex Formation by the Kinetics of Ligand/Receptor Interaction. *J. Biol. Chem.* 277:44155-44163.
51. Siegel, R. M., J. R. Muppidi, M. Sarker, A. Lobito, M. Jen, D. Martin, S. E. Straus, and M. J. Lenardo. 2004. Spots: Signaling Protein Oligomeric Transduction Structures Are Early Mediators of Death Receptor-Induced Apoptosis at the Plasma Membrane. *J. Cell Biol.* 167:735-744.
52. Papoff, G., I. Cascino, A. Eramo, G. Starace, D. H. Lynch, and G. Ruberti. 1996. An N-Terminal Domain Shared by Fas/Apo-1 (Cd95) Soluble Variants Prevents Cell Death in Vitro. *J. Immunol.* 156:4622-4630.
53. Chan, F. K. M., H. J. Chun, L. X. Zheng, R. M. Siegel, K. L. Bui, and M. J. Lenardo. 2000. A Domain in TNF Receptors that Mediates Ligand-Independent Receptor Assembly and Signaling. *Science* 288:2351-2354.
54. Siegel, R. M., J. K. Frederiksen, D. A. Zacharias, F. K. M. Chan, M. Johnson, D. Lynch, R. Y. Tsien, and M. J. Lenardo. 2000. Fas Preassociation Required for Apoptosis Signaling and Dominant Inhibition by Pathogenic Mutations. *Science* 288:2354-2357.
55. Clancy, L., K. Mruk, K. Archer, M. Woelfel, J. Mongkolsapaya, G. Screaton, M. J. Lenardo, and F. K. M. Chan. 2005. Preligand Assembly Domain-Mediated Ligand-Independent Association between Trail Receptor 4 (Tr4) and Tr2 Regulates Trail-Induced Apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:18099-18104.
56. Branschädel, M. 2007. Analysis of Molecular Components Essential for the Formation of Signaling Competent TNF-TNFR Complexes. Dissertation. Institut für Zellbiologie und Immunologie. Universität Stuttgart, Stuttgart.
57. Banner, D. W., A. Darcy, W. Janes, R. Gentz, H. J. Schoenfeld, C. Broger, H. Loetscher, and W. Lesslauer. 1993. Crystal-Structure of the Soluble Human 55 Kd TNF Receptor-Human TNF-Beta Complex - Implications for TNF Receptor Activation. *Cell* 73:431-445.

58. Loetscher, H., R. Gentz, M. Zulauf, A. Lustig, H. Tabuchi, E. J. Schlaeger, M. Brockhaus, H. Gallati, M. Manneberg, and W. Lesslauer. 1991. Recombinant 55-Kda Tumor-Necrosis-Factor (TNF) Receptor - Stoichiometry of Binding to TNF-alpha and TNF-beta and Inhibition of TNF Activity. *J. Biol. Chem.* 266:18324-18329.
59. Humphrey, W., A. Dalke, and K. Schulten. 1996. VMD: Visual Molecular Dynamics. *J Mol Graphics* 14:33-&.
60. Bhandarkar, M., R. Brunner, C. Chipot, A. Dalke, S. Dixit, P. Grayson, J. Gullingsrud, A. Gursoy, D. Hardy, J. Héning, W. Humphrey, D. Hurwitz, N. Krawetz, S. Kumar, M. Nelson, J. Phillips, A. Shinozaki, G. Zheng, and F. Zhu. 2006. NAMD User's Guide, Version 2.6. Theoretical Biophysics Group, University of Illinois and Beckman Institute.
61. Bazan, J. F. 1993. Emerging Families of Cytokines and Receptors. *Curr Biol* 3:603-606.
62. Naismith, J. H., T. Q. Devine, T. Kohno, and S. R. Sprang. 1996. Structures of the Extracellular Domain of the Type I Tumor Necrosis Factor Receptor. *Structure* 4:1251-1262.
63. Feldmann, M., F. M. Brennan, and R. N. Maini. 1996. Role of Cytokines in Rheumatoid Arthritis. *Annual Review of Immunology* 14:397-440.
64. Deng, G. M., L. X. Zheng, F. K. M. Chan, and M. Lenardo. 2005. Amelioration of Inflammatory Arthritis by Targeting the Pre-Ligand Assembly Domain of Tumor Necrosis Factor Receptors. *Nat Med* 11:1066-1072.
65. Hsu, K. C., and M. V. Chao. 1993. Differential Expression and Ligand-Binding Properties of Tumor-Necrosis-Factor Receptor Chimeric Mutants. *J. Biol. Chem.* 268:16430-16436.
66. Corcoran, A. E., K. Barrett, M. Turner, A. Brown, A. M. Kissonerghis, M. Gadnell, P. W. Gray, Y. Chernajovsky, and M. Feldmann. 1994. Characterization of Ligand-Binding by the Human P55 Tumor-Necrosis-Factor Receptor - Involvement of Individual Cysteine-Rich Repeats. *Eur. J. Biochem.* 223:831-840.
67. Deisenhofer, J., O. Epp, K. Miki, R. Huber, and H. Michel. 1985. Structure of the Protein Subunits in the Photosynthetic Reaction Center of *Rhodospseudomonas viridis* at 3 Å Resolution. *Nature* 318:618-624.
68. Koepke, J., X. C. Hu, C. Muenke, K. Schulten, and H. Michel. 1996. The Crystal Structure of the Light-Harvesting Complex I (B800-850) from *Rhodospirillum molischianum*. *Structure* 4:581-597.
69. McDermott, G., S. M. Prince, A. A. Freer, A. M. Hawthornthwaite-Lawless, M. Z. Papiz, R. J. Cogdell, and N. W. Isaacs. 1995. Crystal-Structure of an Integral Membrane Light-Harvesting Complex from Photosynthetic Bacteria. *Nature* 374:517-521.
70. Iwata, S., J. W. Lee, K. Okada, J. K. Lee, M. Iwata, B. Rasmussen, T. A. Link, S. Ramaswamy, and B. K. Jap. 1998. Complete Structure of the 11-Subunit Bovine Mitochondrial Cytochrome Bc(1) Complex. *Science* 281:64-71.
71. Abrahams, J. P., A. G. W. Leslie, R. Lutter, and J. E. Walker. 1994. Structure at 2.8-Angstrom Resolution of F1-ATPase from Bovine Heart-Mitochondria. *Nature* 370:621-628.
72. Roszak, A. W., T. D. Howard, J. Southall, A. T. Gardiner, C. J. Law, N. W. Isaacs, and R. J. Cogdell. 2003. Crystal Structure of the RC-LH1 Core Complex from *Rhodospseudomonas palustris*. *Science* 302:1969-1972.
73. Bahatyrova, S., R. N. Frese, C. A. Siebert, J. D. Olsen, K. O. van der Werf, R. van Grondelle, R. A. Niederman, P. A. Bullough, C. Otto, and C. N. Hunter. 2004. The Native Architecture of a Photosynthetic Membrane. *Nature* 430:1058-1062.
74. Fotiadis, D., P. Qian, A. Philippsen, P. A. Bullough, A. Engel, and C. N. Hunter. 2004. Structural Analysis of the Reaction Center Light-Harvesting Complex I Photosynthetic Core Complex of *Rhodospirillum rubrum* Using Atomic Force Microscopy. *J. Biol. Chem.* 279:2063-2068.
75. Scheuring, S., J. Busselez, and D. Levy. 2005. Structure of the Dimeric PufX-Containing Core Complex of *Rhodobacter blasticus* by in Situ Atomic Force Microscopy. *J. Biol. Chem.* 280:1426-1431.

76. Scheuring, S., J. N. Sturgis, V. Prima, A. Bernadac, D. Levy, and J. L. Rigaud. 2004. Watching the Photosynthetic Apparatus in Native Membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:11293-11297.
77. van Grondelle, R., and V. Novoderezhkin. 2001. Dynamics of Excitation Energy Transfer in the LH1 and LH2 Light-Harvesting Complexes of Photosynthetic Bacteria. *Biochemistry* 40:15057-15068.
78. Gerken, U., F. Jelezko, B. Götze, M. Branschadel, C. Tietz, R. Ghosh, and J. Wrachtrup. 2003. Membrane Environment Reduces the Accessible Conformational Space Available to an Integral Membrane Protein. *J. Phys. Chem. B* 107:338-343.
79. Gerken, U., D. Lupo, C. Tietz, J. Wrachtrup, and R. Ghosh. 2003. Circular Symmetry of the Light-Harvesting 1 Complex from *Rhodospirillum rubrum* is not Perturbed by Interaction with the Reaction Center. *Biochemistry* 42:10354-10360.
80. van Oijen, A. M., M. Ketelaars, J. Kohler, T. J. Aartsma, and J. Schmidt. 1999. Unraveling the Electronic Structure of Individual Photosynthetic Pigment-Protein Complexes. *Science* 285:400-402.
81. Wang, Z. Y., K. Gokan, M. Kobayashi, and T. Nozawa. 2005. Solution Structures of the Core Light-Harvesting Alpha and Beta Polypeptides from *Rhodospirillum rubrum*: Implications for the Pigment-Protein and Protein-Protein Interactions. *J. Mol. Biol.* 347:465-477.
82. Jamieson, S. J., P. Y. Wang, P. Qian, J. Y. Kirkland, M. J. Conroy, C. N. Hunter, and P. A. Bullough. 2002. Projection Structure of the Photosynthetic Reaction Centre-Antenna Complex of *Rhodospirillum rubrum* at 8.5 Angstrom Resolution. *EMBO J.* 21:3927-3935.
83. Jungas, C., J. L. Ranck, J. L. Rigaud, P. Joliot, and A. Vermeglio. 1999. Supramolecular Organization of the Photosynthetic Apparatus of *Rhodobacter sphaeroides*. *EMBO J.* 18:534-542.
84. Karrasch, S., P. A. Bullough, and R. Ghosh. 1995. The 8.5-Angstrom Projection Map of the Light-Harvesting Complex-I from *Rhodospirillum rubrum* Reveals a Ring Composed of 16 Subunits. *EMBO J.* 14:631-638.
85. Walz, T., and R. Ghosh. 1997. Two-Dimensional Crystallization of the Light-Harvesting I Reaction Centre Photounit from *Rhodospirillum rubrum*. *J. Mol. Biol.* 265:107-111.
86. Stahlberg, H., J. Dubochet, H. Vogel, and R. Ghosh. 1998. The Reaction Centre of the Photounit of *Rhodospirillum rubrum* is Anchored to the Light-Harvesting Complex with Four-Fold Rotational Disorder. *Photosynth. Res.* 55:363-368.
87. Di Bernardo, S., R. Fato, R. Casadio, P. Fariselli, and G. Lenaz. 1998. A High Diffusion Coefficient for Coenzyme Q(10) might be Related to a Folded Structure. *FEBS Lett.* 426:77-80.
88. Metz, G., K. P. Howard, W. B. S. Vanliemt, J. H. Prestegard, J. Lugtenburg, and S. O. Smith. 1995. NMR-Studies of Ubiquinone Location in Oriented Model Membranes - Evidence for a Single Motionally-Averaged Population. *J. Am. Chem. Soc.* 117:564-565.
89. Marchal, D., W. Boireau, J. M. Laval, J. Moiroux, and C. Bourdillon. 1998. Electrochemical Measurement of Lateral Diffusion Coefficients of Ubiquinones and Plastoquinones of Various Isoprenoid Chain Lengths Incorporated in Model Bilayers. *Biophys. J.* 74:1937-1948.
90. Comayras, R., C. Jungas, and J. Lavergne. 2005. Functional Consequences of the Organization of the Photosynthetic Apparatus in *Rhodobacter sphaeroides* - I: A Study of PufX(-) Membranes. *J. Biol. Chem.* 280:11214-11223.
91. Hu, X., and K. Schulten. 1998. Model for the Light-Harvesting Complex I (B875) of *Rhodobacter sphaeroides*. *Biophys. J.* 75:683-694.
92. Reithmeier, R. A. F. 1995. Characterization and Modeling of Membrane-Proteins Using Sequence-Analysis. *Curr. Opin. Struc. Biol.* 5:491-500.
93. Autenrieth, F., E. Tajkhorshid, J. Baudry, and Z. Luthey-Schulten. 2004. Classical Force Field Parameters for the Heme Prosthetic Group of Cytochrome c. *J. Comput. Chem.* 25:1613-1622.

94. Autenrieth, F., E. Tajkhorshid, K. Schulten, and Z. Luthey-Schulten. 2004. Role of Water in Transient Cytochrome c2 Docking. *J. Phys. Chem. B* 108:20376-20387.
95. Damjanovic, A., I. Kosztin, U. Kleinekathofer, and K. Schulten. 2002. Excitons in a Photosynthetic Light-Harvesting System: A Combined Molecular Dynamics, Quantum Chemistry, and Polaron Model Study. *Phys. Rev. E* 65:031919.
96. Heller, H., M. Schaefer, and K. Schulten. 1993. Molecular-Dynamics Simulation of a Bilayer of 200 Lipids in the Gel and in the Liquid-Crystal Phases. *J Phys Chem-US* 97:8343-8360.
97. Shinoda, W., and S. Okazaki. 1998. A Voronoi Analysis of Lipid Area Fluctuation in a Bilayer. *J. Chem. Phys.* 109:1517-1521.
98. Lantzsch, G., H. Binder, and H. Heerklotz. 1994. Surface Area Per Molecule in Lipid/C12 Membranes as Seen by Fluorescence Resonance Energy Transfer. *Journal of Fluorescence* 4:5.
99. Amaro, R., and Z. Luthey-Schulten. 2004. Molecular Dynamics Simulations of Substrate Channeling through an Alpha-Beta Barrel Protein. *Chem. Phys.* 307:147-155.
100. Jensen, M. O., S. Park, E. Tajkhorshid, and K. Schulten. 2002. Energetics of Glycerol Conduction through Aquaglyceroporin GlpF. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:6731-6736.
101. Kratky, O., and G. Porod. 1949. Röntgenuntersuchung Gelöster Fadenmoleküle. *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas.* 68:18.
102. Bustamante, C., J. F. Marko, E. D. Siggia, and S. Smith. 1994. Entropic Elasticity of Lambda-Phage DNA. *Science* 265:1599-1600.
103. Gerencsér, L., T. Jánosi, G. Laczkó, and P. Maróti. 2000. Kinetic Limitations in Turnover of Photosynthetic Bacterial Reaction Center Protein. *Acta Biol. Szeged.* 44:45-52.
104. Osvath, S., and P. Maroti. 1997. Coupling of Cytochrome and Quinone Turnovers in the Photocycle of Reaction Centers from the Photosynthetic Bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *Biophys. J.* 73:972-982.
105. Szabo, A., K. Schulten, and Z. Schulten. 1980. 1st Passage Time Approach to Diffusion Controlled Reactions. *J. Chem. Phys.* 72:4350-4357.
106. Wraight, C. A. 1979. Role of Quinones in Bacterial Photosynthesis. *Photochemistry and Photobiology* 30:767-776.
107. Paddock, M. L., S. H. Rongey, E. C. Abresch, G. Feher, and M. Y. Okamura. 1988. Reaction Centers from 3 Herbicide-Resistant Mutants of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 - Sequence-Analysis and Preliminary Characterization. *Photosynth. Res.* 17:75-96.
108. Crowley, K. S., G. D. Reinhart, and A. E. Johnson. 1993. The Signal Sequence Moves through a Ribosomal Tunnel into a Noncytoplasmic Aqueous Environment at the ER Membrane early in Translocation. *Cell* 73:1101-1115.
109. Mothes, W., S. Prehn, and T. A. Rapoport. 1994. Systematic Probing of the Environment of a Translocating Secretory Protein During Translocation through the ER Membrane. *EMBO J.* 13:3973-3982.
110. Halic, M., and R. Beckmann. 2005. The Signal Recognition Particle and its Interactions During Protein Targeting. *Curr. Opin. Struc. Biol.* 15:116-125.
111. Luirink, J., and I. Sinning. 2004. SRP-Mediated Protein Targeting: Structure and Function Revisited. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* 1694:17-35.
112. Matlack, K. E. S., B. Misselwitz, K. Plath, and T. A. Rapoport. 1999. BIP acts as a Molecular Ratchet during Posttranslational Transport of Prepro-Alpha Factor across the ER Membrane. *Cell* 97:553-564.
113. Liebermeister, W., T. A. Rapoport, and R. Heinrich. 2001. Ratcheting in Post-Translational Protein Translocation: A Mathematical Model. *J. Mol. Biol.* 305:643-656.
114. Mori, H., and K. Ito. 2001. The Sec Protein-Translocation Pathway. *Trends in Microbiology* 9:494-500.

-
115. Breyton, C., W. Haase, T. A. Rapoport, W. Kuhlbrandt, and I. Collinson. 2002. Three-Dimensional Structure of the Bacterial Protein-Translocation Complex SecYEG. *Nature* 418:662-665.
 116. Beckmann, R., D. Bubeck, R. Grassucci, P. Penczek, A. Verschoor, G. Blobel, and J. Frank. 1997. Alignment of Conduits for the Nascent Polypeptide Chain in the Ribosome-Sec61 Complex. *Science* 278:2123-2126.
 117. Menetret, J. F., A. Neuhof, D. G. Morgan, K. Plath, M. Radermacher, T. A. Rapoport, and C. W. Akey. 2000. The Structure of Ribosome-Channel Complexes Engaged in Protein Translocation. *Molecular Cell* 6:1219-1232.
 118. Beckmann, R., C. M. T. Spahn, N. Eswar, J. Helmers, P. A. Penczek, A. Sali, J. Frank, and G. Blobel. 2001. Architecture of the Protein-Conducting Channel Associated with the Translating 80s Ribosome. *Cell* 107:361-372.
 119. Morgan, D. G., J. F. Menetret, A. Neuhof, T. A. Rapoport, and C. W. Akey. 2002. Structure of the Mammalian Ribosome-Channel Complex at 17 Angstrom Resolution. *J. Mol. Biol.* 324:871-886.
 120. van den Berg, B., W. M. Clemons, I. Collinson, Y. Modis, E. Hartmann, S. C. Harrison, and T. A. Rapoport. 2004. X-Ray Structure of a Protein-Conducting Channel. *Nature* 427:36-44.
 121. Manting, E. H., C. van der Does, H. Remigy, A. Engel, and A. J. M. Driessen. 2000. SecYEG Assembles into a Tetramer to Form the Active Protein Translocation Channel. *EMBO J.* 19:852-861.
 122. Haider, S., B. A. Hall, and M. S. P. Sansom. 2006. Simulations of a Protein Translocation Pore: SecY. *Biochemistry* 45:13018-13024.
 123. Tani, K., H. Tokuda, and S. Mizushima. 1990. Translocation of ProOmpA Possessing an Intramolecular Disulfide Bridge into Membrane-Vesicles of *Escherichia coli* - Effect of Membrane Energization. *J. Biol. Chem.* 265:17341-17347.
 124. de Keyzer, J., C. van der Does, and A. J. M. Driessen. 2002. Kinetic Analysis of the Translocation of Fluorescent Precursor Proteins into *Escherichia coli* Membrane Vesicles. *J. Biol. Chem.* 277:46059-46065.
 125. Tian, P., and I. Andricioaei. 2006. Size, Motion, and Function of the SecY Translocon Revealed by Molecular Dynamics Simulations with Virtual Probes. *Biophys. J.* 90:2718-2730.
 126. Plath, K., W. Mothes, B. M. Wilkinson, C. J. Stirling, and T. A. Rapoport. 1998. Signal Sequence Recognition in Posttranslational Protein Transport across the Yeast ER Membrane. *Cell* 94:795-807.
 127. Simon, S. M., and G. Blobel. 1991. A Protein-Conducting Channel in the Endoplasmic-Reticulum. *Cell* 65:371-380.
 128. Mitra, K., C. Schaffitzel, T. Shaikh, F. Tama, S. Jenni, C. L. Brooks, N. Ban, and J. Frank. 2005. Structure of the *E. coli* Protein-Conducting Channel Bound to a Translating Ribosome. *Nature* 438:318-324.
 129. Menetret, J. F., R. S. Hegde, S. U. Heinrich, P. Chandramouli, S. J. Ludtke, T. A. Rapoport, and C. W. Akey. 2005. Architecture of the Ribosome-Channel Complex Derived from Native Membranes. *J. Mol. Biol.* 348:445-457.
 130. Osborne, A. R., and T. A. Rapoport. 2007. Protein Translocation Is Mediated by Oligomers of the SecY Complex with One SecY Copy Forming the Channel. *Cell* 129:97-110.
 131. Gumbart, J., and K. Schulten. 2006. Molecular Dynamics Studies of the Archaeal Translocon. *Biophys. J.* 90:2356-2367.
 132. Ash, W. L., M. R. Zlomislic, E. O. Oloo, and D. P. Tieleman. 2004. Computer Simulations of Membrane Proteins. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes* 1666:158-189.
 133. Law, R. J., C. Capener, M. Baaden, P. J. Bond, J. Campbell, G. Patargias, Y. Arinaminpathy, and M. S. P. Sansom. 2005. Membrane Protein Structure Quality in Molecular Dynamics Simulation. *Journal of Molecular Graphics & Modelling* 24:157-165.

134. Tama, F., O. Miyashita, and C. L. Brooks. 2004. NMFF: Flexible High-Resolution Annotation of Low-Resolution Experimental Data from Cryo-EM Maps Using Normal Mode Analysis. *Abstr. Pap. Am. Chem. S.* 227:U1001-U1002.
135. Breuer, H. 1991. *Atlas Zur Chemie*. Deutscher Taschenbuch Verlag GmbH + Co. KG, München.
136. Chilkoti, A., T. Boland, B. D. Ratner, and P. S. Stayton. 1995. The Relationship between Ligand-Binding Thermodynamics and Protein-Ligand Interaction Forces Measured by Atomic Force Microscopy. *Biophys. J.* 69:2125-2130.
137. Economou, A., and W. Wickner. 1994. SecA Promotes Preprotein Translocation by Undergoing ATP-Driven Cycles of Membrane Insertion and Deinsertion. *Cell* 78:835-843.
138. Saparov, S. M., K. Erlandson, K. Cannon, J. Schaletzky, S. Schulman, T. A. Rapoport, and P. Pohl. 2007. Determining the Conductance of the SecY Protein Translocation Channel for Small Molecules. *Molecular Cell* 26:501-509.
139. Harris, C. R., and T. J. Silhavy. 1999. Mapping an Interface of SecY (PrIA) and SecE (PrIG) by Using Synthetic Phenotypes and in Vivo Cross-Linking. *Journal of Bacteriology* 181:3438-3444.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit in irgendeiner Form beigetragen haben.

Zu allererst geht mein Dank an Prof. Dr. Jörg Wrachtrup, der mir die Möglichkeit gegeben hat, an seinem Institut zu promovieren.

Für die Übernahme des Mitberichts danke ich Prof. Dr. Hans-Rainer Trebin und für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes Prof. Dr. Peter Michler.

Mein außerordentlicher Dank für die schöne und erfolgreiche Zusammenarbeit gilt Dr. Carsten Tietz, der mir mit zahlreichen Diskussionen und vielen Anregungen zur Seite stand und stets ein guter Betreuer und Kollege war.

Allen Mitgliedern des 3. Physikalischen Instituts, mit denen ich während meiner Promotionszeit zusammengearbeitet habe möchte ich für eine sehr angenehme Arbeitsatmosphäre und die hilfreiche Unterstützung danken. Danke an Steffen und Thomas für die ‚last minute‘ Verbesserungen dieser Arbeit.

Apl. Prof. Dr. Jürgen Pleiss und der gesamten Arbeitsgruppe Bioinformatik des Instituts für technische Biochemie danke ich für regen Informationsaustausch nicht nur auf dem Gebiet der Molekulardynamik-Simulation von Biomolekülen und für Gewährung von Rechenzeit auf dem BioCORTEX Cluster. Besonders hervorheben möchte ich in diesem Zusammenhang die Zusammenarbeit mit Florian Barth, der mir mit einer sehr intensiven, kompetenten und erfolgreichen Unterstützung in allen Computerbelangen und darüber hinaus eine große Hilfe war.

Großer Dank geht auch an Prof. Klaus Schulten, nicht nur für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung im Ubichinon-Projekt, sondern auch für die Möglichkeit zu Beginn meiner Promotionszeit, in einem dreimonatigen Aufenthalt an seinem Institut (Theoretical and Computational Biophysics Group, University of Illinois at Urbana-Champaign) mein Wissen über Molekulardynamik-Simulation zu vertiefen.

Prof. Dr. Peter Scheurich und Dr. Marcus Branschädel danke ich für die gute Zusammenarbeit im TNFR1-Projekt und die zahlreichen interessanten und hilfreichen Diskussionen.

Meinem Bruder, Robert Aird, möchte ich dafür danken, dass er sich stets als überaus kompetente Computer-Hotline zur Verfügung gestellt hat und mir mit Tipps und Tricks und manchmal auch spontaner Rechenzeit das Leben einige Male enorm erleichtert hat.

Für ihre fortwährende Unterstützung und Motivation möchte ich meinen Eltern danken, die an mich geglaubt haben und falls nötig, jederzeit mit einem aufmunternden Zuspruch oder Rat-schlag zur Stelle waren.

Last but certainly not least gilt mein ganz besonderer Dank Alexandra Elli, die sowohl wissenschaftlich meine Lücken in den Bereichen Biologie, Biochemie und Chemie glänzend kompensiert hat, als auch privat mir immer zur Seite stand. Durch diese „doppelte“ Unterstützung hat Sie einen wesentlichen Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.