

Barbara Hoff

# **Aromaten in Phospholipid- Doppelschichten**

**Molekulardynamische Simulationen und  
experimentelle Validierung**



---

universitätsverlag karlsruhe



Barbara Hoff

## **Aromaten in Phospholipid-Doppelschichten**

Molekulardynamische Simulationen und experimentelle Validierung



# Aromaten in Phospholipid- Doppelschichten

Molekulardynamische Simulationen und experimentelle  
Validierung

von  
Barbara Hoff



---

universitätsverlag karlsruhe

Dissertation, Universität Karlsruhe (TH)  
Fakultät für Chemieingenieurwesen und Verfahrenstechnik, 2005

## **Impressum**

Universitätsverlag Karlsruhe  
c/o Universitätsbibliothek  
Straße am Forum 2  
D-76131 Karlsruhe  
www.uvka.de



Dieses Werk ist unter folgender Creative Commons-Lizenz  
lizenziert: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/de/>

Universitätsverlag Karlsruhe 2006  
Print on Demand

ISBN 3-86644-004-9



# **Aromaten in Phospholipid-Doppelschichten**

## **Molekulardynamische Simulationen und experimentelle Validierung**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines  
**Doktors der Ingenieurwissenschaften (Dr.-Ing.)**

von der Fakultät für Chemieingenieurwesen und Verfahrenstechnik  
der Universität Fridericiana zu Karlsruhe (TH)

genehmigte Version der

**Dissertation**

von

**Dipl.-Ing. Barbara Hoff**

aus Erlenbach am Main

Tag des Kolloquiums: 07. April 2005

Referent: Prof. Dr.-Ing. Clemens Posten

Korreferent: Prof. Dr. Dirk Peter Tieleman

## **Vorwort**

Die vorliegende Arbeit entstand in den Jahren 2000-2005 während meiner Zeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Mechanische Verfahrenstechnik und Mechanik, Bereich Bioverfahrenstechnik der Universität Karlsruhe. Diese Arbeit wurde überwiegend durch das DFG Graduiertenkolleg 366 „Grenzflächenphänomene in aquatischen Systemen und wässrigen Phasen“ finanziert.

Ich danke Herrn Prof. Dr.-Ing. Clemens Posten für das Vertrauen, das er in mich gesetzt hat, die vielen Freiheiten, die er mir bei der Realisierung dieser Arbeit gelassen hat, dass er stets offen war für meine Ideen und mich bei ihrer Umsetzung immer unterstützt hat.

Einen ganz besonderen Dank möchte ich Herrn Prof. Dr. Peter Tieleman aussprechen. Seine stete Hilfsbereitschaft, die vielen Tipps und Diskussionsanregungen haben diese Arbeit in der vorliegenden Form erst möglich gemacht. Der Aufenthalt in Calgary hat mir gezeigt, was mit Molekulardynamischen Simulationen möglich ist und mich bestärkt meine Arbeit in diese Richtung fortzusetzen. Auch danke ich ihm für die Übernahme des Koreferats.

Frau Prof. Dr. Anne Ulrich, Dr. Erik Strandberg und Dr. Ulrich Dürr möchte ich für die Durchführung und Auswertung der NMR-Versuche danken. Die zahlreichen Gespräche mit ihnen waren eine wertvolle Hilfe.

Ich danke meinen Kolleginnen und Kollegen in der Arbeitsgruppe für die schöne Zeit, die Gespräche und den vielen Spaß, den wir zusammen hatten.

Meinen Eltern danke ich, dass sie meine Entscheidungen stets akzeptiert und mich immer unterstützt haben.

Ich danke Dir, Detlev, für die rückhaltlose Unterstützung, insbesondere während der Doppelbelastung mit Schwangerschaft und Zusammenschreiben in der letzten Phase der Doktorarbeit. Das ich Dich kenngelernt habe, war das schönste an dieser Arbeit.



---

# Inhaltsverzeichnis

---

<b>Kapitel 1: Einleitung und Zielsetzung.....</b>	<b>1</b>
<b>Kapitel 2: Die Phospholipid-Membran.....</b>	<b>5</b>
2.1 Amphiphile Lipide.....	5
2.2 Phospholipid-Doppelschichten.....	6
2.3 Das Vier-Phasen Modell.....	7
2.4 Die Zellmembran.....	8
2.5 Andere räumliche Anordnungen.....	8
2.6 Verwendete Lipid-Doppelschichten.....	9
<b>Kapitel 3: Aromatische Stoffe.....</b>	<b>11</b>
3.1 Aromatizität.....	11
3.2 Verwendete aromatische Stoffe und biologische Relevanz.....	12
3.2.1 Polyzyklische Aromatische Kohlenwasserstoffe – Pyren.....	12
3.2.2 3,5-Bis-Trifluoromethyl-Benzoesäure (TFB) und seine konjugierte Base TFB <sup>-</sup> .....	13
3.2.3 Benzol.....	14
<b>Kapitel 4: Molecular Modelling.....</b>	<b>17</b>
4.1 Methoden zur Simulation von Molekülen.....	17
4.2 Molekulardynamische (MD) Simulationen.....	18
4.3 Kraftfelder.....	19
4.3.1 Gebundene Wechselwirkungen.....	20
4.3.2 Nichtgebundene Wechselwirkungen.....	22
4.3.3 Parametrisierung.....	23
4.4 Periodische Randbedingungen.....	23
4.5 Betrachtung weitreichender Wechselwirkungen.....	24
4.5.1 Cut-Off-Methoden.....	24
4.5.2 Ewald-Summen.....	25
4.6 Integrations-Algorithmen.....	27
4.6.1 Verlet-Algorithmus.....	28
4.6.2 Leap-Frog-Algorithmus.....	29

4.7 Druck- und Temperaturkontrolle.....	29
4.8 Energieminimierung.....	31
4.9 „Constraints“ – Restriktion der Molekülbewegung.....	32
4.10 Rechner und Software.....	34
4.10.1 Verwendete Rechner.....	34
4.10.2 Software.....	34
4.10.3 Kraftfeld-Dateien der Aromaten.....	34
4.10.4 Auswertung.....	35
4.10.4.1 Positionen.....	35
4.10.4.2 Aufenthalt.....	35
4.10.4.3 Orientierung.....	35
4.10.4.4 Kettenordnungsparameter $S_{CD}$ .....	36
4.10.4.5 Platzbedarf der Lipide.....	36
4.10.4.6 Umbrella Sampling.....	37
4.11 Simulationen mit Lipid-Membranen – Stand der Technik.....	37
<b>Kapitel 5: Kernresonanzspektroskopie (NMR).....</b>	<b>41</b>
5.1 Grundlagen.....	41
5.2 Bauweisen von NMR-Spektrometern.....	44
5.3 Anregung und Relaxation.....	44
5.4 NMR-Spektren.....	45
5.5 Festkörper-NMR.....	46
5.6 Deuteronen( $^2\text{H}$ )-NMR-Spektroskopie.....	47
5.7 Theorie zur Auswertung der $^2\text{H}$ -Spektren.....	49
5.8 Spektren von Lipid-Doppelschichten.....	50
<b>Kapitel 6: POPC.....</b>	<b>51</b>
6.1 Einleitung.....	51
6.2 Material und Methoden.....	51
6.3 Ergebnisse.....	54
6.4 Diskussion.....	56
<b>Kapitel 7: Pyren.....</b>	<b>59</b>
7.1 Einleitung.....	59
7.2 Material und Methoden.....	59
7.2.1 Simulationen.....	59

7.2.2 $^2\text{H}$ - und $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektroskopie.....	61
7.3 Ergebnisse.....	62
7.3.1 Bewegung und Verteilung.....	62
7.3.2 Freie Enthalpie $\Delta G$ .....	64
7.3.3 Orientierung der Pyren-Moleküle.....	66
7.3.4 Der Einfluss von Pyren auf die Membran – Kettenordnungsparameter $S_{\text{CD}}$ .....	71
7.4 Diskussion.....	73
7.5 Zusammenfassung.....	79
<b>Kapitel 8: TFB und TFB<math>^-</math>.....</b>	<b>81</b>
8.1 Einleitung.....	81
8.2 Durchgeführte Simulationen.....	82
8.3 Ergebnisse.....	83
8.3.1 Bewegung und Verteilung von TFB und TFB $^-$ .....	83
8.3.2 Die freie Enthalpie $G$ .....	86
8.3.3 Orientierung.....	87
8.3.4 Einfluss auf die Kettenordnung $S_{\text{CD}}$ .....	89
8.4 Diskussion.....	90
8.5 Zusammenfassung.....	95
<b>Kapitel 9: Benzol.....</b>	<b>97</b>
9.1 Einleitung.....	97
9.2 Durchgeführte Simulationen.....	97
9.3 Ergebnisse.....	98
9.3.1 Platzbedarf der Lipide, Bewegung und Verteilung.....	98
9.3.2 Die freie Enthalpie $G$ .....	101
9.3.3 Orientierung.....	102
9.4 Diskussion.....	103
9.5 Zusammenfassung.....	106
<b>Kapitel 10: Zusammenfassung.....</b>	<b>107</b>
<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>111</b>
<b>Anhang.....</b>	<b>A1</b>
<b>Formelverzeichnis und Abkürzungen.....</b>	<b>A22</b>



# Kapitel 1

---

## Einleitung und Zielsetzung

---

Phospholipid-Membranen stellen für die Bioverfahrenstechnik bzw. generell für die Lebenswissenschaften ein sehr interessantes Stoffsystem dar, da sie sich in vielen Bereichen nutzen lassen. Sie dienen nicht nur dazu, Zellmembranen auf einfachste Weise zu simulieren und so Informationen über die Funktionsweise von Zellmembranen und deren Wechselwirkung mit anderen Stoffen zu erhalten (Lasic, 1992). Sie können darüber hinaus in Form von Liposomen und unterstützten Flüssig-Membranen zur Aufarbeitung von Stoffen eingesetzt werden, hier kommt vor allem der großen spezifischen Oberfläche eine wesentliche Bedeutung zu (Pickering 1997, Powers, 1989). Durch Oberflächenmodifikation an den Liposomen können sehr selektive Trennungen erreicht werden. Stand der Technik ist bereits, Liposomen als Wirkstoffträger in Pharma- und Kosmetikprodukten zu verwenden. Dabei wird vor allem die ähnliche Struktur von Liposomen und Zellmembranen genutzt, so dass die Carrier-Vesikel leichter durch die Haut in den Körper gelangen bzw. modifizierte Liposomen nicht so schnell von der körpereigenen Immunabwehr erkannt und zerstört werden (Chrai, 2002; Müller, 1995). Ein neueres Einsatzgebiet ist die Verwendung von Liposomen zur Herstellung von functional food (Arnaud, 1998).

Aufgrund der großen Vielfalt an Lipiden gibt es viele einfache Möglichkeiten der Stabilisierung und gezielten Beeinflussung der Vesikel-Eigenschaften, so dass sich diese in einem weiten Temperatur- und pH-Bereich meist hochselektiv einsetzen lassen.

Ein Begriff, der im Zusammenhang mit Lipid-Membranen immer wieder gebraucht wird, ist der der „hydrophoben Wechselwirkung“, welcher das Verhalten zweier hydrophober Stoffe zueinander umschreibt. Der größte Teil der Lipid-Membran besteht aus hydrophoben Acylketten, welche ein für hydrophile Stoffe fast undurchlässiges Membran-Kompartiment bilden. Lediglich der äußere Bereich der Membran, der mit der wässrigen Umgebung in Kontakt steht, nämlich die Kopfgruppen und die Glyceringruppen, enthalten hydrophile Gruppen. Das Verhalten zwischen (hydrophoben) Stoffen aus der Umgebung und der Phospholipid-Membran wird also meist durch hydrophobe Wechselwirkungen bestimmt.

Viele Komponenten der Zellmembran, wie Cholesterole und Carotinoide sind selbst hydrophobe Stoffe, die durch ihre Anwesenheit die Eigenschaften von Membranen beeinflussen und verändern (McMullen, 1996; Subczynski, 1992). Im Bereich der Medizin spielen hydrophobe Wechselwirkungen z. B. bei der Diffusion von Anästhetika und anderer Pharmazeutika in die Zellmembran eine entscheidende Rolle (Engelke, 1997). In der Umwelt

wird dieser Effekt zum Abbau oder zur Immobilisierung von hydrophoben Schadstoffen an (Mikro)Organismen genutzt (Hagenmaier, 1986). Der gleiche Effekt kann auch beim Einsatz von Lipid-Membranen zur Aufarbeitung biotechnologisch gewonnenerer Produkte genutzt werden.

Hydrophobe Wechselwirkungen sind jedoch kein eindeutig definierter physikalischer Mechanismus, sondern fassen eine Vielzahl von Mechanismen und Wechselwirkungen zusammen (Dill, 1990). Warum und wie sich ein Stoff an oder in einer Membran anlagert, wird von vielen Faktoren beeinflusst. Die konstante Antriebskraft hinter diesen Prozessen ist die, dass das entstandene System energetisch gesehen günstiger ist, als das, das vorher bestand. Die Transportprozesse, die dabei stattfinden, können nicht, wie in Bulk-Phasen üblich, durch Kontinuumsmodelle erklärt werden. In Membranen wirken sich die Veränderungen auf mikroskopischer Ebene, hervorgerufen durch die in der Membran diffundierenden Stoffe, auf makroskopische Größen aus. Diese Zusammenhänge sind sehr komplex und können meist nicht durch mechanistische Gleichungen beschrieben werden.

Eine experimentelle Beobachtung dieser Vorgänge gestaltet sich immer noch sehr schwierig und ist meist mit großen technischen Aufwand verbunden. Die flüssigkristalline Struktur von Phospholipid-Membranen erschwert diese Untersuchungen noch zusätzlich. Gängige Techniken sind NMR-Techniken. Mit ihnen lassen sich jedoch nur Gleichgewichtszustände analysieren. Um dynamische Prozesse zu beschreiben, können Fluoreszenztechniken (Martins, 2001) oder kalorimetrische Untersuchungen (Blume 1991) eingesetzt werden. Insbesondere kalorimetrische Untersuchungen bieten die Möglichkeit, auch thermodynamische Größen zu bestimmen. Sie sind jedoch meist sehr störanfällig und die Ergebnisse sind stark von den Versuchsbedingungen abhängig.

Es ist also sehr schwierig, thermodynamische Größen, insbesondere von molekular strukturierten Stoffen, durch Experimente zu ermitteln. Eine mögliche Alternative zu Experimenten sind Simulationen. Molekulardynamische (MD) Simulationen bieten die Möglichkeit, Vorgänge im Nanosekundenbereich oder Abläufe auf molekularer Ebene auf sehr anschauliche Weise darzustellen. So lassen sich zum Beispiel komplizierte Transportprozesse, wie sie in Zellmembranen auftreten, analysieren. Gleichzeitig sind Molekulardynamische Simulationen ein Werkzeug, um solche mikroskopischen Veränderungen sichtbar und gleichzeitig makroskopische Größen berechenbar zu machen. Mit Hilfe modifizierter MD-Simulationen lassen sich auch Stoffdaten, z.B. freie Enthalpien und Verteilungskoeffizienten berechnen.

Mit steigender Prozessorleistung und Simulationsprogrammen, die auf Parallelrechnern betrieben werden können, ist der Einsatz von Molekulardynamischen Simulationen in vielen

Bereichen der Wissenschaft möglich geworden. Es können sehr komplexe Systeme mit vertretbarem Zeitaufwand simuliert werden. Die Größe der simulierten Systeme liegt mittlerweile bei mehreren zehntausend Atomen, die simulierte Zeitspanne beträgt mehrere hundert Nansosekunden. Damit sind auch Prozesse, die langsamer ablaufen, als beispielsweise die Diffusion von Stoffen, zugänglich.

Kombiniert man die Simulationen mit experimentellen Methoden, vor allem mit Festkörper-NMR in orientierten Lipid-Doppelschichten, kann eine umfassende Untersuchung der Vorgänge an Phospholipid-Membranen durchgeführt werden. Gleichzeitig kann im Vergleich mit den experimentellen Ergebnissen die Aussagekraft von MD-Simulationen beurteilt werden.

Ziel der Arbeit ist es, Vorgänge bei der Adsorption von gelösten Stoffen an hochstrukturierten Phospholipid-Membranen besser zu verstehen. Es wurden aromatische Stoffe als gelöste Stoffe ausgewählt, da diese in vielen Bereichen der Biologie, Pharmazie, Umweltwissenschaften und der Verfahrenstechnik eine bedeutende Rolle spielen. Phospholipid-Membranen sind der Grundbaustein jeder Zellmembran und gewinnen aufgrund ihrer hochselektiven und leicht modifizierbaren Eigenschaften auch in technischen Anwendungen immer mehr an Bedeutung.

Die Untersuchungen sollen vor allem mittels Molekulardynamischer Simulationen durchgeführt werden. Diese Art von Simulationen, welche vor allem in der Biophysik und Biochemie mittlerweile Standard sind, werden bisher in der (Bio-)Verfahrenstechnik sehr selten eingesetzt. Sie bieten jedoch ein großes Potential, komplizierte Transportprozesse und Rückkopplungen anschaulich darzustellen und detailliert zu analysieren. Durch spezielle Simulationstechniken sind auch thermodynamische Größen zugänglich, die experimentell nur sehr schwer oder gar nicht bestimmbar sind, in der Verfahrenstechnik aber wichtig zur Charakterisierung vieler Prozesse sind. Durch Abgleich mit experimentell ermittelten Daten sollen die simulierten Ergebnisse verifiziert und beurteilt werden. Weiterhin muss geprüft werden, ob ein Einsatz Molekulardynamischer Simulationen in der (Bio-)Verfahrenstechnik sinnvoll ist.

Um die Stoffklasse der Aromaten ausreichend zu repräsentieren, wurden drei verschiedene Aromaten ausgewählt, die sich in Größe, Hydrophobizität und Ladung unterscheiden. Neben dem einfachsten Aromat, dem Benzol, kam ein polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoff, Pyren, bestehend aus vier Benzolringen zum Einsatz, der größere Aromaten repräsentiert. Zusätzlich wurde ein gängiges Zwischenprodukt zur Synthese von Pharmazeutika ausgesucht, die 3,5-(Bis-) Trifluoromethyl-Benzoesäure (TFB). Dies ist ein Aromat, der aufgrund der Carboxyl-Gruppe auch hydrophile Eigenschaften besitzt.

Untersucht wurde die Adsorption dieser drei Stoffe an eine Modell-Phospholipid-Membran, deren Verhalten in der Membran und die Auswirkungen auf die Membraneigenschaften. Dafür wurden unrestrictierten MD-Simulationen durchgeführt, mit welchen die dynamischen Vorgänge untersucht wurden und restrictierten MD-Simulationen, sogenannte Umbrella Sampling Simulation, die zur Berechnung von freien Enthalpieprofilen eingesetzt wurden. Ergänzt wurden die Simulationen durch Festkörper-NMR an orientierten Phospholipid-Doppelschichten, wobei stets darauf geachtet wurde, dass experimentelle und simulierte Rahmenbedingungen möglichst identisch waren.

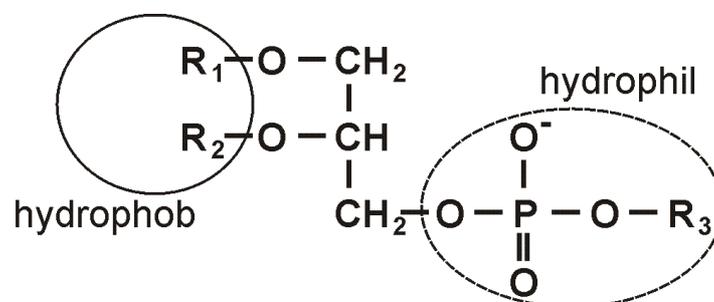
## Kapitel 2

### Die Phospholipid-Membran

Phospholipid-Membranen sind das Grundgerüst jeder Zellmembran. Künstlich hergestellte Phospholipid-Membranen eignen sich daher sehr gut als Modellsystem um Vorgänge an und in Zellmembranen zu untersuchen. Neben dem typischen Aufbau von Zellmembranen und anderen räumlichen Anordnungen von Phospholipid-Doppelschichten wird in diesem Kapitel zunächst auf den chemischen Aufbau der Phospholipid-Grundbausteine eingegangen, da diese im wesentlichen die physikalischen Eigenschaften der Membran prägen. Des weiteren werden die verschiedenen Phasenzustände der Phospholipid-Membran und ihre Wechselwirkung mit der Umgebung beschrieben sowie der innere Aufbau der Membran, das sogenannte „Vier-Phasen-Modell“ dargestellt, anhand dessen die Ergebnisse später diskutiert werden.

#### 2.1 Amphiphile Lipide

Eine Lipid-Membranen ist aus amphiphiles Lipiden aufgebaut. Amphiphile Lipide sind Fette, bei denen das Glycerin-Grundgerüst mit einer hydrophilen Kopfgruppe und einer oder zwei hydrophoben Acylketten verestert ist. Die in der Natur am häufigsten vorkommenden amphiphilen Lipide sind die Glycerophospholipide oder einfach Phospholipide mit zwei Acylketten (Bild 2.1).



**Bild 2.1:** Strukturformel eines Phospholipids; die Reste R<sub>1</sub> und R<sub>2</sub> sind Acylketten, die den hydrophoben Teil der Membran bilden, der Rest R<sub>3</sub> bezeichnet die Art der Phosphogruppe, welcher den hydrophilen Teil darstellt

Die hydrophile Kopfgruppe kann neutral, ein- und mehrfach geladen oder zwitterionisch sein, wobei in der Natur nur geladene oder zwitterionische Kopfgruppen vorkommen. Beispiele für Phosphogruppen, die sich nur im Rest R<sub>3</sub> unterscheiden, sind in Tabelle 2.1 zusammengestellt. Der Rest R<sub>3</sub> ist auch verantwortlich für die unterschiedlichen Größen der Kopfgruppen.

Die Zusammensetzung der hydrophoben Acylketten R<sub>1</sub> und R<sub>2</sub> kann homogen oder heterogen sein und prinzipiell alle in der Natur vorkommenden gesättigten und ungesättigten Fette umfassen. Meist variieren die Kettenlängen jedoch von 10 bis 24 Kohlenstoffatomen (Anhang A1). Die ersten beiden Buchstaben in der Abkürzung von Phospholipiden bezeichnen immer die Art der Acylkette, die letzten beiden die der Kopfgruppe. Beispiele für Phospholipide sind

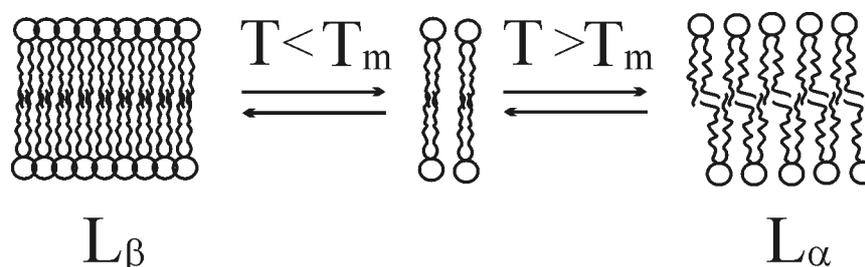
Dimyristoyl-Phosphatidylcholin (DMPC) oder Palmitoyl-Oleoyl-Phosphatidylcholin (POPC) (Lasic, 1993).

**Tabelle 2.1:** Beschreibung der Phosphogruppen mit Namen, Abkürzung, Rest  $R_3$  und Ladung

Name	Abkürzung	Rest $R_3$	Ladung
Phosphatidylcholin	PC	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	zwitterionisch
Phosphatidyletholamin	PE	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$	zwitterionisch
Phosphatidylserin	PS	$-\text{CH}_2\text{CHNH}_3^+\text{COO}^-$	negativ
Phosphatidylglycerol	PG	$-\text{CH}_2\text{CHOHCH}_2\text{OH}$	negativ
Phosphatidylinositol	PI	$-\text{HC}_6\text{H}_5(\text{OH})_5$	negativ

## 2.2 Phospholipid-Doppelschichten

Amphiphile Lipide haben einer sehr geringe Wasserlöslichkeit, die kritische Micellenkonzentration (CMC) liegt zwischen  $10^{-8}$  und  $10^{-12}\text{M}$ . In wässriger Umgebung bilden Phospholipide spontan Doppelschichten aus, wobei die hydrophoben Acylketten zueinander zeigen und die hydrophilen Kopfgruppen zur wässrigen Phase ausgerichtet sind. Die physikalischen Eigenschaften solcher Doppelschichten hängen hauptsächlich von der Lipid-Zusammensetzung und dem umgebenden Medium (pH, Ionenstärke) ab. Eine typische Größe ist die Phasenübergangstemperatur  $T_m$ . Unterhalb dieser Temperatur befinden sich die Ketten in einem hochgeordneten Zustand, der sogenannten Gel-Phase  $L_\beta$ . Die Packungsdichte der Lipide ist hoch, die Membran und ihre Acylketten sind wenig beweglich („fluid“). Oberhalb der Phasenübergangstemperatur liegt der flüssigkristalline oder fluide Zustand  $L_\alpha$  vor. Die Acylketten sind in größerer Unordnung und wesentlich beweglicher als im Gelzustand (Bild 2.2). (Lasic, 1993).

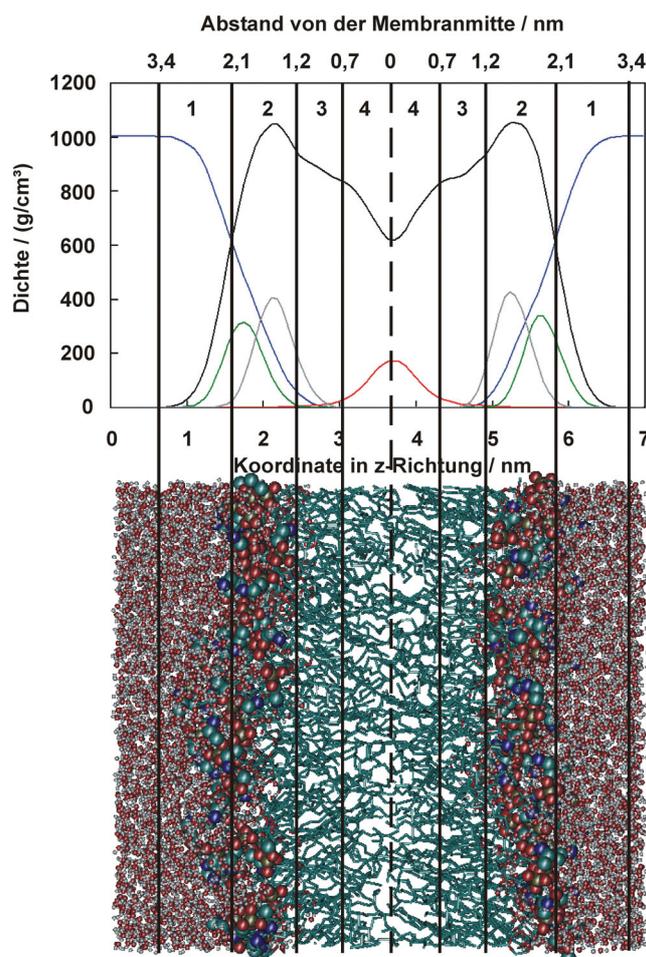


**Bild 2.2:** Phasenzustände von Lipid-Doppelschichten, bei Temperaturen  $T < T_m$  rechts die hochgeordnete  $L_\beta$ -Gelphase, links, oberhalb der Phasenübergangstemperatur  $T_m$ , die flüssig-kristalline  $L_\alpha$ -Phase (nach Lasic, 1993)

Die Phasenübergangstemperatur  $T_m$  ist abhängig von der Kettenlänge (sie steigt mit bei gesättigten Acylketten mit der Kettenlänge), von der Kettensättigung (sie fällt mit Zunahme der ungesättigten C=C-Bindungen) und vom Hydratisierungsgrad (sie fällt mit abnehmender Hydratisierung).

## 2.3 Das Vier-Phasen Modell

Lipid-Membranen zeigen also sowohl Merkmale von Feststoffen als auch von Flüssigkeiten, was eine Charakterisierung des Systems erschwert. Erst in den letzten Jahren wurde mit Hilfe moderner Messmethoden und Simulationen die komplexe Struktur, die eine solche Doppelschicht mit ihren hydrophilen und hydrophoben Bereichen darstellt, besser verständlich. Die Doppelschicht in Wechselwirkung mit ihrer Umgebung lässt sich in vier Regionen unterteilen (Marrink, 1994). Die äußerste Schicht besteht aus „disturbed water“ (Bild 2.3). Es ist die Region, wo das Wasser in Wechselwirkung mit den Kopfgruppen tritt und damit die Eigenschaften der „bulk“-Wasserphase verliert. Die Wassermoleküle neigen in dieser Schicht zum Beispiel weniger zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen. Die zweite Schicht ist die Übergangsregion Wasser – Kopfgruppen – Glyceringruppen, in der die Konzentration an Wassermolekülen auf nahezu Null absinkt. In dieser Region sind vielfältige hydrophile und hydrophobe Wechselwirkungen denkbar, es herrscht die höchste Dichte und die geringste Beweglichkeit. Die dritte Schicht wird „Soft-Polymer“-Region genannt, da ihre Eigenschaften mit dem eines elastischen Polymers vergleichbar sind. Die Kettenordnung ist



noch relativ hoch und das freie Volumen gering. Diese Region endet und geht in die vierte Schicht über, wenn die Kettenordnung der Acylketten dem von flüssigem Dekan ähnlich ist. Dies ist die hydrophobste Schicht der Membran, wo die Dichte am geringsten und das freie Volumen am größten ist.

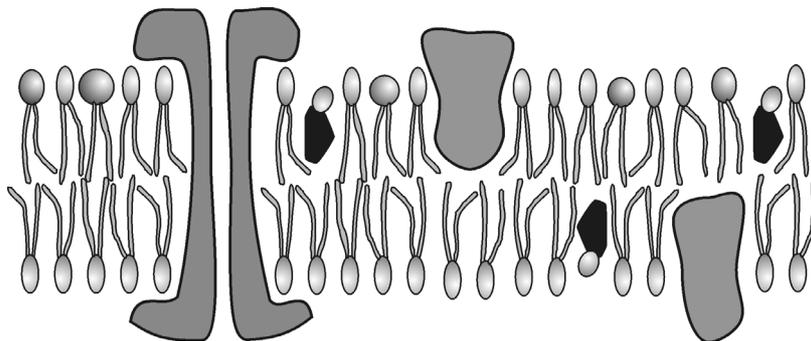
**Bild 2.3:** Die vier Phasen einer Phospholipid - Doppelschicht nach (Marrink, 1994). (1) „disturbed water“ (2) Übergangsregion (3) Soft-Polymer-Region (4) ungeordnete Membranmitte. Oben ist die Verteilung der Dichte ( $\text{g}/\text{cm}^3$ ) von Wasser (blau), der Phospholipide (schwarz), der Phosphogruppen (grün), der Glyceringruppen (grau) der endständigen C-Atome (rot) über den Abstand zur Membranmitte aufgetragen. Unten ist ein Querschnitt durch eine Doppelschicht gezeigt, die kleinen rot-weißen Punkte stellen die Wassermoleküle dar, die großen Kugeln die Atome der Phospho-Gruppe und die türkisfarbenen Ketten die Acylketten

### 2.4 Die Zellmembran

Die Zellmembran grenzt das Zellinnere (Cytoplasma) von seiner Umgebung ab. Das Grundgerüst aller Zellmembranen ist eine Phospholipid-Doppelschicht. Daher werden künstlich hergestellte Doppelschichten gerne als Modellsystem zur Untersuchung von Membranvorgängen verwendet. Die Lipidzusammensetzung der Zellmembran ist dabei je nach Organismus oder Zellfunktion verschieden.

Über die Zellmembran wird der Stoffaustausch von Gasen und Metaboliten mit der Umgebung geregelt. Gase, kleine hydrophobe Stoffe, aber auch kleine amphiphile Stoffe, wie Ethanol können die hydrophobe Doppelschicht durch passive Diffusion durchqueren. Bei größeren hydrophilen oder geladenen Stoffen verhindert die hydrophobe Schicht jedoch eine unkontrollierte Diffusion. Der Transport dieser Stoffe wird über funktionale Makromoleküle, wie Proteine, die z.B. Transportkanäle bilden, geregelt.

Die Zellmembran enthält außerdem noch weitere Bestandteile wie Cholesterin, welche Einfluss auf die Fluidität der Membran haben, oder Zuckerketten, welche die Erkennung der Zellen untereinander regeln können (Bild 2.4) (Madigan, 2000).

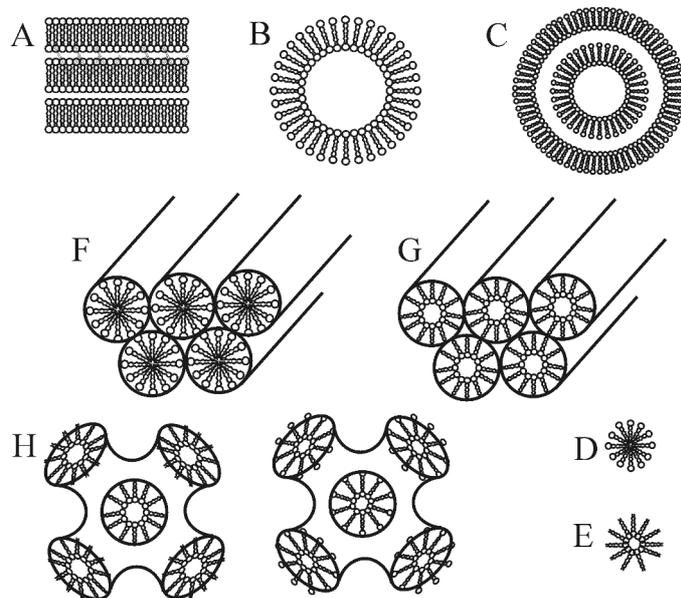


**Bild 2.4:** Schematische Abbildung einer Zellmembran mit den funktionalen Makromolekülen, wie Membranproteinen (grau) und Cholesterin (schwarz)

### 2.5 Andere räumliche Anordnungen

Je nach Lipid, Lipid-Konzentration, Hydratisierungsgrad oder Herstellungsart findet man unterschiedliche räumliche Anordnungen von Phospholipiden in Wasser. Die häufigsten Arten sind in Bild 2.5 dargestellt. In der lamellaren Phase (Doppelschichten) können sich orientierte Doppelschichten (A) unilamellare (B) oder multilamellare Liposomen ausbilden (C). Liposomen sind kugelförmige Gebilde mit einem Wasserkern im Inneren. Liposomen können einen Durchmesser von ca. 20 nm bis zu wenigen  $\mu\text{m}$  haben. Die Lipide können sich zu kugelförmigen Micellen mit den Kopfgruppen nach außen (D) oder zu inversen Micellen mit den Ketten nach außen zusammenlagern (E). Bilden sich stabförmige Micellen, spricht man von einer hexagonalen Phase. Zeigen die hydrophoben Ketten nach innen, ist es die Hexagonalphase  $H_I$  (F), hat man inverse Micellen, liegt die Hexagonalphase  $H_{II}$  (G) vor. Des

weitem können sowohl lamellare Doppelschichten als auch Micellen kubische Phasen Q (H) ausprägen (Lasic, 1993, Ulrich, 2002).



**Bild 2.5:** räumlich Anordnung von amphiphilen Lipiden (nach Lasic, 1993); A: orientierte Doppelschicht; B: unilamellares Liposom; C: multilamellares Liposom; D: Micelle; E: inverse Micelle; F: Hexagonalphase  $H_I$ ; G: Hexagonalphase  $H_{II}$ ; H: Kubische Phasen Q

## 2.6 Verwendete Lipid-Doppelschichten

In den Simulationen wurden zwei verschiedene Modellmembranen eingesetzt.

Zum einen wurde eine Dimyristoyl - Phosphatidylcholin (DMPC)-Doppelschicht (WEB1, 2005) verwendet. Diese besteht aus 128 DMPC-Molekülen, die Wasserphase umfasst 3655 Single Point Charge (SPC) Wassermoleküle (Berendsen, 1981). Der Platzbedarf der Kopfgruppen ist  $0,596 \text{ nm}^2$ . Die Größe der Box ist  $6,1760 \times 6,1760 \times 6,6608 \text{ nm}$ .

Zum anderen wurde mit einer Palmitoyl-Oleoyl-Phosphatidylcholin (POPC)-Doppelschicht gearbeitet, die mit 4480 SPC-Wassermolekülen hydratisiert ist (WEB2, 2005). Der Platzbedarf der Kopfgruppen zu Beginn ist hier  $0,655 \text{ nm}^2$ . Die simulierte Zelle hat die Abmessungen  $6,3671 \times 6,5854 \times 7,1610 \text{ nm}$ .

In den praktischen Versuchen wurden mit lamellaren, orientierten POPC-Doppelschichten gearbeitet.



## Kapitel 3

---

### Aromatische Stoffe

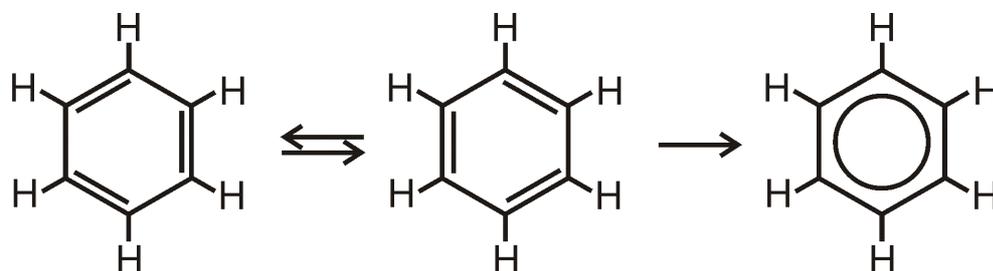
---

In diesem Kapitel wird zunächst geklärt, woher der Begriff „Aromat“ stammt und welche Problematik mit der Zuordnung von aromatischen Stoffen einhergeht. Anschließend werden die in dieser Arbeit verwendeten Aromaten vorgestellt. Es wird auf die Auswahlkriterien, ihre biologische Relevanz und ihre Stoffeigenschaften eingegangen.

#### 3.1 Aromatizität

Der Begriff der Aromatizität wird mit vielen unterschiedlichen Definitionen belegt. Ursprünglich wurde der Begriff für aromatisch riechende Verbindungen, wie Toluol, Benzaldehyd oder Vanillin benutzt. Später stellte sich heraus, dass all diese Verbindungen als Grundgerüst ein oder mehrere Benzolringe besitzen. Benzol wird daher als Prototyp einer aromatischen Verbindung angesehen.

Kekulé (Kekulé, 1866) schlug als erster eine Ringstruktur mit alternierenden Einfach- und Doppelbindungen für Benzol vor, wodurch sich zwei unterschiedliche mesomere Formen ergeben (Bild 3.1).



**Bild 3.1:** Unterschiedliche Strukturformeln von Benzol zur Darstellung des delokalisierten  $\pi$ -Elektronensystems

Eine weit verbreitete Regel zur Erkennung von Aromaten ist die sogenannte Hückel-Regel (Hückel, 1931). Diese besagt, dass ein planares Ringsystem aus  $\pi$ -Elektronen, bestehend aus  $n$  Ringgliedern, dann aromatisch bzw. das  $\pi$ -Elektronensystem delokalisiert ist, wenn es  $4n+2$   $\pi$ -Elektronen besitzt. Diese Regel lässt sich auf fast alle Benzol-Derivate anwenden, versagt jedoch schon bei Aromaten, bestehend aus mehreren Benzolringen, wie Pyren, mit 8 (delokalisierten)  $\pi$ -Elektronen.

Kriterien, Aromatizität zu charakterisieren, sind heute unter anderem (Neuss, 2002):

- Geometrie: Es kommt zu einem Bindungslängen-Ausgleich bzw. alle Bindungslängen des Rings sind gleich lang (v.a. bei Aromaten mit Benzolringen).

- **Reaktivität:** Reaktion bei Aromaten verlaufen meist langsamer als bei der entsprechenden gesättigten Verbindung, außerdem durchlaufen sie typische Reaktionsmechanismen, z.B. Substitutionen.
- **Energetische Stabilität:** Aromaten sind im Vergleich zu ihren gesättigten bzw. nichtaromatischen Äquivalenten stabiler, dies lässt sich über Resonanzenergien quantifizieren.
- **Magnetische Eigenschaften:** Beim Anlegen eines äußeren Magnetfeldes wird ein diamagnetischer Ringstrom induziert.

### **3.2 Verwendete aromatische Stoffe und biologische Relevanz**

#### **3.2.1 Polyzyklische Aromatische Kohlenwasserstoffe – Pyren**

Die erste untersuchte Stoffklasse sind polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK). Als Modellsubstanz wurde Pyren gewählt. Mit Pyren in Lipid-Doppelschichten wurden am Institut für MVM bereits praktische Versuche und auch Simulationen durchgeführt (Herrenbauer, 2002).

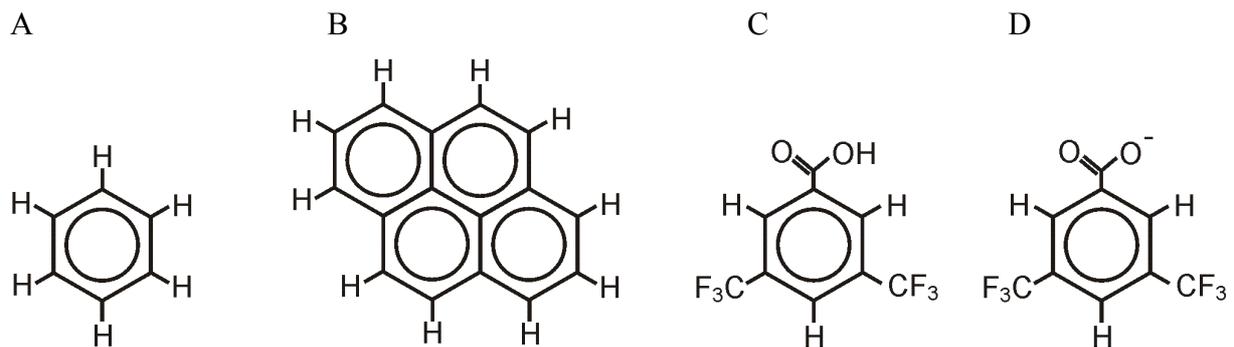
PAK sind Umweltschadstoffe, bestehend aus zwei oder mehreren Benzolringen, die bei der unvollständigen Verbrennung organischen Materials entstehen. Sie werden vom IARC als gesundheitsschädlich mit teilweise giftigen, karzinogenen und mutagenen Eigenschaften eingestuft (IARC, 1983). PAK in der Umwelt stammen vor allem aus anthropogenen Quellen, wie Zigarettenrauch oder Automobilabgasen, industrielle Quellen, z.B. aus der Asphaltproduktion oder aus Heizkraftwerken, in geringem Umfang auch aus nicht-anthropogenen Quellen, wie Waldbränden (Zander, 1995, Neff, 1979). In der Atmosphäre sind sie überwiegend an Staubpartikel gebunden. Sie werden über den Niederschlag aus der Atmosphäre gewaschen und gelangen so auf Pflanzen, Böden und in Oberflächengewässer. Aufgrund ihres stark hydrophoben Charakters adsorbieren sie vorzugsweise an hydrophobes organisches Material, wie Bodenpartikeln oder Organismen.

Es existieren eine Reihe von Studien, die sich mit der Verteilung von PAK in der Umwelt beschäftigen. Pathirana et al. untersuchten die Verteilung von PAK entlang australischer Strassen. Sie fanden vor allem Phenantren und Pyren in den Lipid- bzw. den organischen Fraktionen des Bodens und des abgestorbenen Pflanzenabfalls, wobei die Konzentration exponentiell mit dem Abstand zur Strasse abnahm (Pathirana, 1994). LaRocca et al. leiteten eine ähnliche Korrelationen bei Untersuchungen von marinen Sedimenten an verschiedenen Stellen um Venedig her. Je höher der Anteil der Lipidfraktion in den Sedimenten war, desto höher war auch der PAK-Gehalt in den Sedimenten (LaRocca 1996).

Ein Problem beim biologischen Abbau von PAK ist die generell niedrige Bioverfügbarkeit. Im Boden adsorbieren PAK so schnell an Bodenpartikeln, so dass sie entweder für einen

mikrobiellen Abbau nicht mehr zur Verfügung stehen oder die weitere Biodegradation durch die Geschwindigkeit des Massentransfers und nicht durch die Aktivität der Mikroorganismen bestimmt wird (Zhang, 1998). Ein ähnliches Problem tritt bei der Abwasserreinigung auf. In Kläranlagen werden PAK von gut adaptierten Schlämmen zwar bis zu 100% abgebaut, es entstehen dabei allerdings viele Dead-End-Metabolite, die ein hohes mutagenes Potential bergen (Weigert, 1995). Nicht abgebaute PAK und ihre Dead-End-Metaboliten finden sich fast ausschließlich in der Biomasse wieder (Cuno, 1995, Petrusek, 1983). Findet kein weiterer (biologischer oder chemischer) Abbau statt, akkumulieren die in den hydrophoben Kompartimenten der Organismen, zum Beispiel innerhalb der Zellmembranen.

Pyren ist ein polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoff, der aus vier kondensierten Benzolringen besteht (Bild 3.2B). Pyren ist ein planares Molekül, alle Winkel im Molekül betragen etwa  $120^\circ$ . Es ist bei Raumtemperatur fest, besitzt eine sehr geringe Wasserlöslichkeit (Tabelle 3.1) und ist giftig. Pyren selbst ist nicht krebserregend, es können beim Abbau jedoch genotoxische Stoffe, wie Pyren-1,6-Dion entstehen. Wichtige Stoffdaten sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst.



**Bild 3.2:** Strukturformeln der verwendeten Aromaten; A: Benzol, B: Pyren, C: 3,5-Bis-Trifluoromethyl-Benzoessäure (TFB), D: 3,5-Bis-Trifluoromethyl-Benzoessäure, deprotoniert (TFB<sup>-</sup>)

### 3.2.2 3,5-Bis-Trifluoromethyl-Benzoessäure (TFB) und seine konjugierte Base TFB<sup>-</sup>

3,5-Bis-Trifluoromethyl-Benzoessäure (TFB) ist eine Benzoessäure, die an den Positionen drei und fünf mit Trifluoromethylgruppen substituiert ist (Bild 3.1D).

Im Gegensatz zu den strikt hydrophoben PAK und dem Benzol besitzt TFB eine hydrophile COOH-Gruppe, ist diese deprotoniert, trägt das Molekül eine negative Ladung. Die Trifluoromethylgruppen bilden eine sterische Komponente, so dass TFB kein planares Molekül ist. Dies führt zu einem unterschiedlichen Verhalten, sowohl in der wässrigen Phase, als auch in der Membran.

Aufgrund seines niedrigen  $pK_S$ -Werts von  $pK_S = 3,38$  (Adams, 1992) liegt TFB im Wasser in dissoziierter Form als TFB<sup>-</sup> vor. In hydrophoben Phasen wird TFB als protonierte Säure

vorliegen, im Bereich der Kopfgruppen kann es zu Protonierungs- und Deprotonierungsvorgängen kommen.

Über TFB findet sich nur sehr wenig in der Literatur. Es wird hauptsächlich als pharmazeutisches Zwischenprodukt zur Synthese von Pharmazeutika benötigt. Im wissenschaftlichen Bereich findet es in der Bodengeologie als Tracersubstanz Verwendung (Adams, 1992.)

Ähnliche Stoffe wie verschiedene Mono-Trifluoromethyl-Benzoesäuren sind Abbauprodukte von Insektiziden, wie Hydramethylnon, ein Ameisenvernichtungsmittel (Bacey, 2000) oder Wirkstoffen, wie dem Fenfluramine (Bruce, 1968), welcher in Diätpillen eingesetzt wurde, jedoch wegen schwerer Nebenwirkungen wieder vom Markt genommen werden musste.

Mit diesem Molekül wurden im Institut für organische Chemie der Universität Karlsruhe NMR-Untersuchungen in orientierten DMPC-Doppelschichten durchgeführt (Dürr, 2004). So standen NMR-Daten zur Verfügung, mit denen die Simulationen verglichen werden konnten. Umgekehrt dienten die simulierten Daten als Hilfe bei der Interpretation der NMR-Daten.

### 3.2.3 Benzol

Ein weiteres Einsatzgebiet dieses Moleküls ist  $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektroskopie, wo es als Modellsubstanz für 6-spin-Systeme dient (WEB3, 2005).  $^{19}\text{F}$  liefert stärkere Signale im NMR als die herkömmlich eingesetzten Kerne  $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  und  $^{15}\text{N}$ . Ist man in der Lage aus  $^{19}\text{F}$ -Spektren Richtungs- und Strukturinformationen zu extrahieren, kann  $^{19}\text{F}$  als Marker bspw. in Membranproteinen eingesetzt werden (Grage, 1999).

Benzol stellt den einfachsten aromatischen Kohlenwasserstoff mit einem aromatischen Sechsringsystem dar (Bild 3.1A). Es ist ein planares, vollkommen symmetrisches Molekül, in dem alle Winkel  $120^\circ$  haben. Aufgrund seines niedrigen Dampfdrucks ist es bei Raumtemperatur flüssig. Die wichtigsten Stoffdaten sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

Es ist, wie Pyren und Fluoren, ein ubiquitärer Schadstoff, der vom IARC als ein humangenotoxisches Karzinogen der Klasse 1 eingestuft wurde (IARC, 1987).

Da Benzol leicht flüchtig ist, finden sich in der Natur nur sehr geringe Konzentrationen, die Belastung in geschlossenen Räumen ist dagegen nicht unerheblich. Dort trägt vor allem Zigarettenrauch zu einer Akkumulation in der Atemluft bei, der Rauch einer Zigarette enthält etwa  $10\mu\text{g}$  Benzol. In der Natur ist die Hauptemissionsquelle (ca. 90%) der individuelle Straßenverkehr (EKL, 2003). Benzol ist Bestandteil von Treibstoffen, es finden sich daher oft besonders hohe Konzentrationen in der Nähe von Tankstellen und in Tiefgaragen.

Benzol ist Ausgangsstoff für eine Vielzahl chemischer Produkte, wie Kunststoffe, Pflanzenschutzmittel, Harze, Farbstoffe oder Waschmittel (Cheremisinoff, 1979). In

Westeuropa wurden 1999 wurden knapp sieben Millionen Tonnen Benzol produziert (Raichle, 2001).

Benzol wird vorwiegend durch Inhalation in den Organismus aufgenommen, etwa 50% des eingeatmeten Benzols verbleiben dort. Aufgrund seiner geringen Wasserlöslichkeit wird es im Fett- und Nervengewebe eingelagert. Es diffundiert sehr leicht in und durch Zellwände und Zellmembranen.

Neben akuter Toxizität bei Konzentrationen größer 20000 ppm ist Benzol vor allem bei dauerhafter Exposition gesundheitsgefährdend. Benzol ist blutschädigend, da es alle blutbildenden Vorgänge eingreift. Ein Zusammenhang zwischen einer dauerhaften Exposition und einem erhöhtem Leukämierisiko wurde in diversen Studien nachgewiesen (Kouros, 1990).

In der Literatur sind bereits ein Reihe MD-Simulationen mit Benzol in Lipid-Doppelschichten beschrieben (Bassolino-Klimas, 1993, 1995, Bemporad, 2003).

**Tabelle 3.1:** ausgewählte Stoffdaten der verwendeten Aromaten

Aromat	Summenformel Molmasse / (g/mol)	Löslichkeit in Wasser ( bei der Temperatur / °C)	logK <sub>OW</sub>	Siede- / Schmelz- punkt / °C	Dichte / (g/cm <sup>3</sup> )	Giftklasse
Pyren <sup>a</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub> / 202,26	0,135 mg/L (25°C)	5,32 <sup>b</sup>	Smp 148-150	1,21	3
TFB <sup>c</sup>	C <sub>9</sub> H <sub>4</sub> F <sub>6</sub> O <sub>2</sub> / 258,11	k. a.	k. a.	Smp 142-143	k. a.	k. a.
TFB <sup>c</sup>	C <sub>9</sub> H <sub>3</sub> F <sub>6</sub> O <sub>2</sub> / 257,09	k. a.	k. a.	Smp 142-143	k. a.	k. a.
Benzol <sup>c</sup>	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> / 78,11	0,82 g/L (20°C)	2,14	Sdp 80,1	0,879	1*

\* krebserregend, a) Daten aus Sicherheitsdatenblatt VWR, b) Daten aus Sims, 1983 c) Daten aus Sicherheitsdatenblatt MSDS, c) Daten aus Cheremisinoff, 1979



## Kapitel 4

---

### Molecular Modelling

---

Molecular Modelling ist ein Oberbegriff für die verschiedenen Arten, Atome und Moleküle am Computer zu simulieren oder zu visualisieren\*. Ansätze zur Modellierung von Atomen sind so zahlreich wie die damit verbundenen Fragestellungen. Zunächst sollen die gängigsten Methoden, welche sich mit der Geometrie von Molekülen, deren Bewegung und deren Reaktionen beschäftigen, vorgestellt werden. Anschließend wird auf die Grundlagen molekulardynamischer Simulationen eingegangen. Die in dieser Arbeit verwendete Hardware und MD-Software Gromacs und die dort implementierten Auswerteprogramme werden vorgestellt und abschließend ein Überblick zum Stand der Technik zur Simulation von Lipid-Membranen gegeben.

#### 4.1 Methoden zur Simulation von Molekülen

##### *Klassische Mechanik*

Ansätze der klassischen Mechanik simulieren die Bewegung von Atomen durch das Lösen der Newtonschen Bewegungsgleichung. Diese Simulationen sind deterministischer Natur. Ausgehend von einer Ausgangssituation kann jeder Zustand in der Zukunft vorhergesagt werden. Durch die Zeitkomponente ist der Ansatz aus der klassischen Mechanik eine mögliche Methode Nicht-Gleichgewichtszustände und dynamische Prozesse zu simulieren. In der Literatur wird diese Art der Simulation als Moleküldynamik (Molecular Dynamics) oder Molekulardynamische (MD) Simulation bezeichnet. Aus der Molekülbewegung lassen sich zeitgemittelte Größen (z. B. Diffusionskoeffizienten) ableiten. Grundlagen sind im Kapitel 4.2 beschrieben.

##### *Statistik*

Simulationen, die auf statistischen Methoden beruhen, werden meist unter dem Begriff Monte Carlo (MC) Simulation zusammengefasst. Monte Carlo Simulationen werden nicht nur auf dem Gebiet des Molecular Modelling verwendet, sondern in allen Bereichen, in denen Statistik eine Rolle spielt. MC-Simulationen sind im Gegensatz zu MD-Simulationen keine zeitabhängigen Simulationen. Ein Zustand bei MC-Simulationen hängt immer nur von dem unmittelbar vorausgegangen Zustand ab. Es werden mittels Zufallsmethoden immer neue

---

\* Die Quellen von Kapitel 4 sind, soweit nicht explizit angegeben, die Lehrbücher von Kunz (1997), Leach (1996), Schlick (2002), Griebel (2004) und das Softwarehandbuch von Gromacs, Version 3.2 (van der Spoel, 2004).

Konfigurationen erzeugt (z. B. die Koordinaten eines Atoms im Molekül oder die Koordinaten eines Moleküls in einem Molekülensemble verändert), nach bestimmten Kriterien bewertet und entweder akzeptiert oder verworfen.

Es existieren Kombination von MC- und MD-Methoden, bei denen je nach Aufgabe erst die eine, dann die andere Methode angewandt wird.

### *Quantenmechanik*

Grundlage quantenmechanischer Simulationen ist die zeitunabhängige Schrödinger Gleichung. Diese beschreibt die Bewegung von Protonen und Elektronen und ermöglicht, die potentielle Energie eines Systems zu berechnen. Da zum Lösen der Gleichung keine experimentellen Daten vorhanden sein müssen, ist dies die beste Methode, Moleküle zu berechnen. Eine exakte analytische Lösung der Gleichung ist jedoch nur für sehr kleine Moleküle, z. B.  $H_2$  möglich. Für größere Moleküle oder Vielteilchensysteme müssen Näherungen angenommen werden, die wiederum die Genauigkeit beeinträchtigen.

Eine Näherung ist unter anderem die Born-Oppenheimer Näherung, welche die Bewegung der Elektronen von der Bewegungen der Protonen trennt. Eine mögliche Simulationstechnik ist die ab initio-Methode, bei der die Molekülorbitale durch Linearkombination von Atomorbitalen angenähert wird. Bei der semiempirische Methode werden experimentelle Daten oder auch Daten, welche aus ab-initio-Methoden gewonnen wurden, genutzt.

Mittels quantenmechanischer Methoden können Energien (Bindungsenthalpien, Reaktionen), Dipolmomente, angeregte Zustände, Geometrien oder ganze Spektren (IR-, NMR-, Raman-Spektren) berechnet werden. Die berechneten Größen können zum Beispiel zur Parametrisierung von Kraftfeldern für MD-Simulationen genutzt werden.

Quantenmechanische Simulationsmethoden sind sehr rechenzeitaufwendig, weshalb sie für komplexe Systeme kaum eingesetzt werden. Wie auch bei MC-Simulationen bietet die Kombination Quantenmechanischer Simulationen mit Molekulardynamischen Simulationen eine Möglichkeit, die Vorteile beider Simulationsarten zu nutzen.

## **4.2 Molekulardynamische (MD) Simulationen**

Molekulardynamische (MD) Simulationen eignen sich zur Berechnung der Bewegung von Atomen und Molekülen in Wechselwirkung miteinander. Dabei wird die Molekülmechanik zugrunde gelegt, d. h. die Moleküle werden mit Hilfe von Feder-Masse Modellen beschrieben. Die Massen repräsentieren die Atomkerne, die Federn die kovalenten Atombindungen. Dabei muss man die Born-Oppenheimer Näherung voraussetzen, nach der sich die Elektronen, welche wesentlich leichter sind als der Kern, unabhängig von diesem bewegen. So können sie den Bewegungen des Kerns schnell genug folgen, der Kern befindet also immer in einem gemittelten Feld von Elektronen. Im Folgenden soll nur noch von

Atomen bzw. Atomkoordinaten die Rede sein, obwohl de facto die Kerne bzw. Kernkoordinaten gemeint sind.

Mit MD-Simulation lassen sich große Systeme, bestehend aus mehr als 10000 Atomen, gut simulieren. Angeregte Zustände oder Reaktionen (Bindungsbruch oder -bildung) können hingegen nicht simuliert werden.

In einem solchen Vielteilchensystem wird das Gesamt-Potentials  $V$  der Atome durch ein empirisches Kraftfeld approximiert, welches von den Atomkoordinaten  $\mathbf{r}$  abhängt. Die Energiebeiträge zu einem Kraftfeld werden im folgenden Kapitel erklärt.

Die Kraft  $\mathbf{F}_i^*$ , die auf ein Atom  $i$  in einem System mit  $N$  Atomen wirkt, ist nach Newton

$$\mathbf{F}(\mathbf{r}_1, \dots, \mathbf{r}_N) = -\frac{\partial V}{\partial \mathbf{r}_i} = m_i \frac{\partial^2 \mathbf{r}_i}{\partial t^2} \quad (4.1)$$

wobei  $\mathbf{r}_i$  die Position des Atoms  $i$ ,  $m_i$  die Masse des Atoms  $i$  und  $N$  die Anzahl der Atome ist.

Die Bewegung der Atome in Wechselwirkung miteinander lässt sich durch Integration der Newtonschen Bewegungsgleichung lösen. Das Ergebnis sind die Bahnkurven (Trajektorien) der Atome, das heißt deren Geschwindigkeiten und Position über die Zeit. Numerische Integrations-Algorithmen sind in Kapitel 4.6 beschrieben.

### 4.3 Kraftfelder

Inzwischen gibt es eine ganze Reihe unterschiedlicher Kraftfelder, die jeweils den Bedürfnissen der Benutzer angepasst sind. Bekannt sind vor allem das MM2/3/4-Kraftfeld von Allinger (Allinger, 1989, Allinger, 1996), welches oft zur Simulation kleiner organischer Moleküle eingesetzt wird. AMBER, entwickelt von Peter Kollmann (Cornell, 1995), ist zur Simulation von Nukleinsäuren gut geeignet.

Zur Simulation von Proteinen werden oft CHARMM (Brooks, 1983, MacKerell, 1998) oder GROMOS (Berendsen, 1984) verwendet. Letzteres ist die Basis für das Kraftfeld GROMACS (Hermans, 1995, Lindahl, 2001), welches in dieser Arbeit verwendet wurde. GROMACS wird häufig zur Simulation von Lipid-Systemen, wie Lipid-Membranen oder Micellen benutzt.

Ein Kraftfeld besteht zum einem aus den Potentialenergiefunktionen  $V$ , welche das Potential der Moleküle in Abhängigkeit ihrer Position beschreibt, und zum anderen aus den Parametern, welche in diese Gleichungen eingesetzt werden.

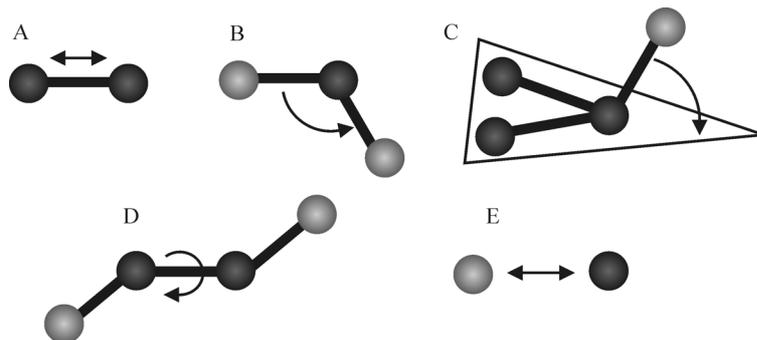
Die Energie eines Vielteilchensystems setzt sich aus der Summe der Energien, die durch gebundene und nichtgebundene Wechselwirkungen hervorgerufen werden, zusammen.

---

\* fettgedruckte Buchstaben bezeichnen immer Vektoren

$$V = \sum V_{\text{geb.WW}} + \sum V_{\text{nichtgeb.WW}} \quad (4.2)$$

Die Energie der gebundenen Wechselwirkungen ändert sich bei der Auslenkung kovalenter Bindungen. Bei den nichtgebundenen Wechselwirkungen werden Potentialänderungen insbesondere durch Abstandsveränderungen von Dipolen, induzierten Dipolen und Ionen hervorgerufen (Bild 4.1). Im Folgenden werden die mathematischen Modelle (Potentialenergiefunktionen) zur Beschreibung dieser Potentialänderungen erklärt.



**Bild 4.1:** Verschiedene gebundene und nichtgebundene Wechselwirkungen; A: Bindungslänge; B: Bindungswinkel, C: unechte Torsion; D: echte Torsion; E: elektrostatische Wechselwirkung

### 4.3.1 Gebundene Wechselwirkungen

#### Bindungslängen

Die Bindung zwischen zwei Atomen wird mit einem Federmodell beschrieben. Energieänderungen, die durch die Änderung des Abstands der Atome hervorgerufen werden, lassen sich daher am einfachsten über das Hook'sche Gesetz bzw. einem daraus abgeleiteten harmonischen Potential beschreiben.

$$V_b(r_{ij}) = \frac{1}{2} k_{ij}^b (r_{ij} - b_{ij})^2 \quad (4.3)$$

$k_{ij}^b$  ist die Federkonstante,  $r_{ij}$  der tatsächliche Abstand und  $b_{ij}$  die Referenzbindungslänge zwischen den Atomen  $i$  und  $j$ .

Zur Berechnung kleiner Auslenkungen, wie Vibrationen oder Deformation kleiner  $0,1\text{\AA}$  ist das harmonische Potential sehr gut geeignet. Bei größeren Auslenkungen oder zur genaueren Beschreibung werden oft nicht-harmonische Potentiale, wie das Morse-Potential oder kubische und quartische Potentiale benutzt (Bild 4.2). Diese benötigen jedoch mehr Rechenzeit.

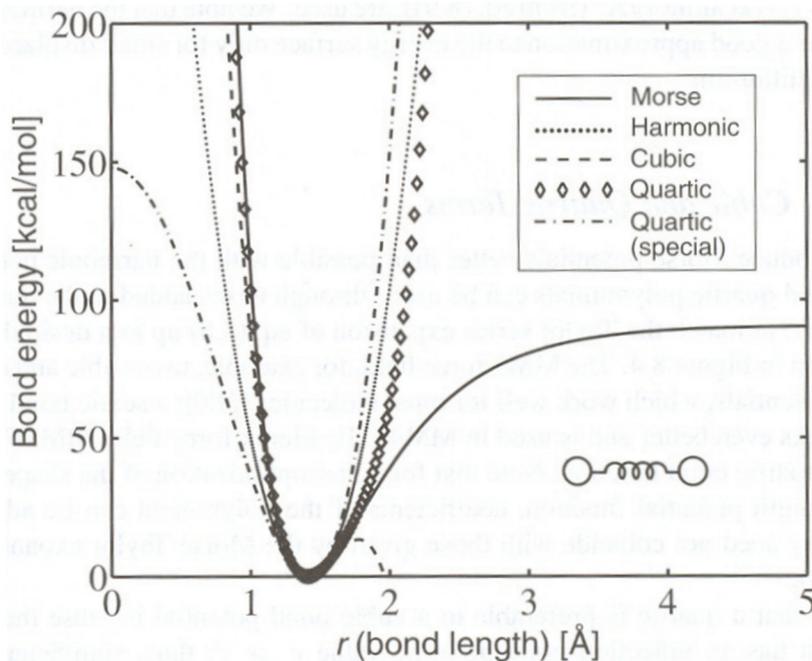
#### Bindungswinkel

Die Potentialänderung bei der Deformation von Bindungswinkeln wird ebenfalls durch ein harmonisches Potential beschrieben.

$$V_a(\theta_{ijk}) = \frac{1}{2} k_{ijk}^0 (\theta_{ijk} - \theta_{ijk}^0)^2 \quad (4.4)$$

$k_{ijk}^0$  ist die Federkonstante,  $\theta_{ijk}$  der tatsächliche Winkel und  $\theta_{ijk}^0$  der Referenzwinkel zwischen den Atomen i, j und k.

Ebenso wie bei den Bindungslängen können auch hier andere Potentialfunktionen genutzt werden, um eine bessere Anpassung zu erzielen.



**Bild 4.2:** Verschiedene Potentialverläufe in Abhängigkeit der Bindungslänge  $r$  zwischen zwei Atomen. Dargestellt ist das Morse-Potential, ein harmonisches und ein kubisches Potential, sowie zwei quartische Potentiale (Schlick, 2002)

## Torsion

### *Echte Torsion (Proper Dihedrals)*

Unter Torsion einer Molekülgruppe versteht man deren Drehung um eine Achse. Bei dieser Rotation ändert sich das Energiepotential des Moleküls in Abhängigkeit des Winkels. Bei Einfachbindungen ist diese Bewegung meist uneingeschränkt möglich, man spricht von echter Torsion.

Die Existenz von Rotationsbarrieren muss bei der Berechnung des Torsionspotentials berücksichtigt werden. Durch die Reihenentwicklung einer Kosinusfunktion können die Maxima und Minima dieser Rotation beschrieben werden.

$$V_{pd}(\phi_{ijk}) = \sum_{n=0}^N C_n \cos(\omega)^n \quad (4.5)$$

$C_n$  ist die Torsionskonstante,  $\omega$  ist der Torsionswinkel,  $n$  die Anzahl der Minima.

### *Unechte Torsion (Improper Dihedrals)*

Bei Mehrfachbindungen oder in aromatischen Systemen tritt diese Bewegung nur eingeschränkt oder gar nicht auf und muss deshalb in den Simulationen unterbunden werden. Man spricht in diesem Fall von unechter Torsion.

Um Torsion z.B. in planaren aromatischen Ringsystemen zu vermeiden, wird ein weiteres harmonisches Potential verwendet.

$$V_{\text{id}}(\xi_{ijkl}) = k_{\xi} (\xi_{ijkl} - \xi_0)^2 \quad (4.6)$$

$k_{\xi}$  ist die Federkonstante,  $\xi_{ijkl}$  ist der Winkel zwischen den Ebenen  $ijk$  und  $jkl$ ,  $\xi_0$  ist der Referenzwinkel.

### Kreuzterme

Bindungslänge und Bindungswinkel stehen fast immer in Beziehung zueinander. Bei kleinen Winkeln wird die Bindungslänge der Atombindungen länger, um Wechselwirkungen zwischen den Atomen zu vermeiden. Dieser Zusammenhang zwischen Länge und Winkel wird mittels spezielle Kreuzterme berücksichtigt.

### **4.3.2 Nichtgebundene Wechselwirkungen**

#### Van der Waals - Wechselwirkungen

Van der Waals Wechselwirkungen fassen die Wechselwirkung zwischen den induzierten Dipolen unpolarer Moleküle zusammen. Die Induktion von Dipolen in den unpolaren Molekülen kann durch Ionen, Dipole oder induzierter Dipole erfolgen. VdW-Wechselwirkungen sind kurzreichende Wechselwirkungen zwischen Atomen und können empirisch durch verschiedene Potential-Modelle beschrieben werden. Gängigste Modelle sind das Lennard-Jones und das Buckingham-Potential. Am häufigsten wird das Lennard-Jones (12-6-) Potential benutzt.

$$V_{\text{LJ}}(r_{ij}) = 4\epsilon \left[ \left( \frac{\sigma}{r_{ij}} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad (4.7)$$

$\epsilon$  und  $\sigma$  sind spezifische Lennard-Jones-Parameter,  $r_{ij}$  ist der Abstand der Atome  $i$  und  $j$ .

#### Elektrostatische Wechselwirkungen

Wechselwirkungen zwischen permanenten Ladungen (Ionen, permanenten Dipolen) werden als elektrostatische Wechselwirkungen bezeichnet. Dies sind weitreichende Wechselwirkungen, die nur sehr langsam, reziprok zum Abstand des Atoms abnehmen. Man beschreibt sie meist mit einem Coulomb-Potential. Die Ladungsverteilung in einem Atom wird dabei durch eine Punktladung  $q$  im Atom(kern) approximiert. Das Coulomb-Potential zwischen zwei Punktladungen ist

$$V_c(r_{ij}) = \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r r_{ij}} \quad (4.8)$$

wobei  $q_i$ ,  $q_j$  die Punktladungen sind,  $\epsilon_0$  die Dielektrizitätskonstante des Vakuums,  $\epsilon_r$  die relative Dielektrizitätskonstante und  $r_{ij}$  der Abstand zwischen den Punktladungen.

### 4.3.3 Parametrisierung

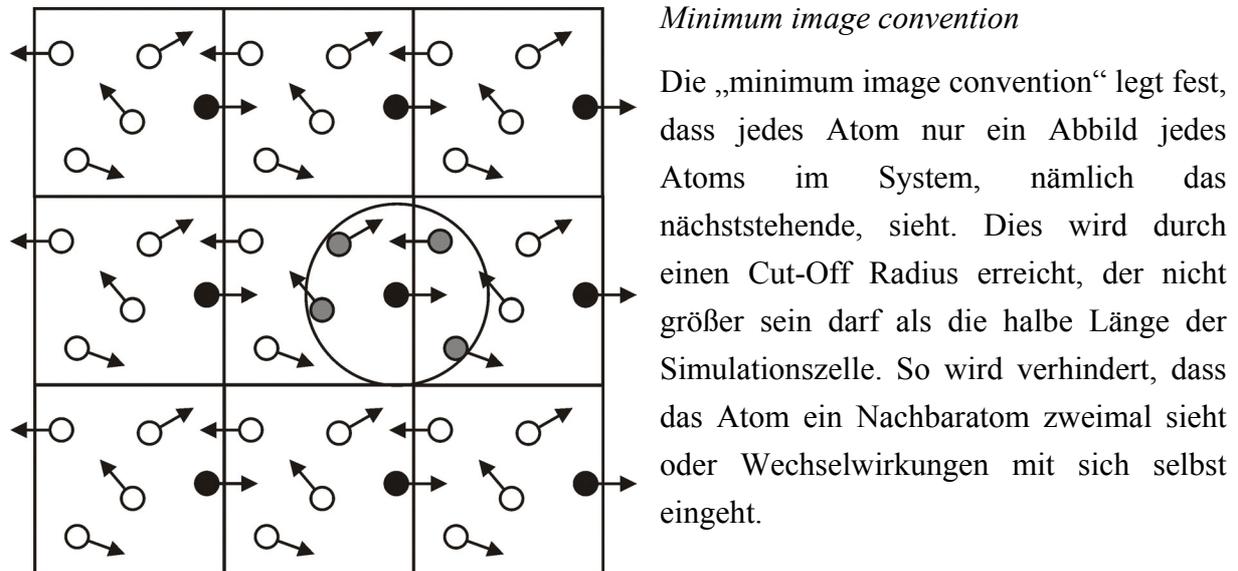
Die den Kraftfeldern zugrunde liegenden Gleichungen sind für fast alle gebräuchlichen Kraftfelder ähnlich. Die großen Unterschiede der einzelnen Kraftfelder liegen in der Parametrisierung der Atomtypen. Es hängt entscheidend von der Parametrisierung ab, für welche Art der Anwendung ein Kraftfeld geeignet ist. Ein Kraftfeld zur Berechnung thermodynamischer Größen hat andere Parameter als ein Kraftfeld, das vor allem zur Geometrieoptimierung eingesetzt wird. Viele Parameter sind aus experimentellen Daten zugänglich, andere müssen geschätzt oder berechnet werden. Wichtig ist dabei, dass das Kraftfeld konsistent ist, das heißt, dass die Atomparameter viele Molekülstrukturen mit ausreichender Genauigkeit beschreiben.

Geometrische Parameter, wie Atombindungslängen oder -winkel werden meist aus experimentellen Daten gewonnen. Bereits hier ergibt sich die Schwierigkeit, dass keine allgemeingültige Bindungslänge zwischen zwei Atomen existiert, da diese von der Messmethode abhängt. Bei Parametern zur Berechnung nichtgebundener Wechselwirkungen oder Torsion gestaltet sich die Parametrisierung ungleich schwieriger, da häufig keine experimentellen Daten zur Verfügung stehen oder die Parameter miteinander verknüpft sind. Rotationsbarrieren z.B. hängen sowohl von der Torsion (Geometrie) als auch von den van der Waals Kräften ab. Hier werden häufig Schätzparameter oder Parameter, die aus Quantenmechanischen Simulationen berechnet wurden, eingesetzt. Erst im Zusammenspiel aller Parameter lässt sich die Qualität eines Kraftfelds im Vergleich mit vorhandenen experimentellen Daten beurteilen.

## 4.4 Periodische Randbedingungen

Aufgrund der Rechenleistung ist es heute möglich, Ausschnitte eines Systems von wenigen Nanometern zu simulieren. Aus einem solch kleinen System ist es nicht möglich, Bulk-Größen abzuleiten, da man überwiegend Randeffekte simuliert. Um dies zu vermeiden, ist es üblich, periodische Randbedingungen (Periodic Boundary Conditions PBC) einzuführen. Die zu simulierende Zelle wird in alle Raumrichtungen von ihrem imaginären Abbild umgeben. Dies setzt sich bis ins Unendliche fort (Bild 4.3). Verlässt ein Atom die Zelle auf der einen Seite, tritt das imaginäre Atom auf der anderen Seite wieder ein, die Zahl der Atome in der Ursprungszelle bleibt konstant. Auf diese Weise werden Fehler, die beim Simulieren gegen Vakuum entstehen, ersetzt durch Artefakte, die von den periodischen Bedingungen herrühren.

Diese fallen jedoch deutlich geringer ins Gewicht, bei der Simulation von Kristallstrukturen sind sie sogar erwünscht.



**Bild 4.3:** zweidimensionale Darstellung der periodischen Randbedingung, des Cut-Off-Radius und der minimum image convention

#### 4.5 Betrachtung weitreichender Wechselwirkungen

Die Anzahl nichtgebundener Wechselwirkungen steigt quadratisch mit der Zahl der simulierten Atome  $N$  an. Molekulardynamische Simulationen umfassen meist mehrere tausend Atome. Daher wurden verschiedene Möglichkeiten eingeführt, die Rechenleistung, die zur Berechnung nichtgebundener Wechselwirkungen vor allem der weitreichenden elektrostatischen Wechselwirkungen benötigt wird, gering zu halten. In dieser Arbeit wurden weitreichende Wechselwirkungen entweder mit einem Twin-Range Cut-Off und nach Particle-Mesh-Ewald berechnet.

##### 4.5.1 Cut-Off-Methoden

Die einfachste Methode ist ein harter „Cut-Off“. Dabei wird um ein Atom eine Kugel mit Radius  $r$  gelegt und nur die Wechselwirkungen mit den Atomen innerhalb dieser Schale berücksichtigt (Bild 4.3). Diese Methode spart sehr viel Rechenzeit und ist für schnell abnehmende Wechselwirkungen, wie den van der Waals Wechselwirkungen durchaus geeignet. Gerade bei den weitreichenderen elektrostatischen Wechselwirkungen führt dies jedoch zu großen Problemen und Ungenauigkeiten in der Simulation. Läuft der Cut-Off z. B. durch eine Molekülbindung, wird diese „gekappt“ und es entstehen virtuellen Ladungen. Um diese negativen Effekte zu vermeiden, gibt es zwei Möglichkeiten. Man kann mit einer „Switch“-Funktion arbeiten. Dabei wird ein zweiter Cut-Off-Radius  $r'$  eingeführt. Wechselwirkungen zwischen Atomen innerhalb des Radius  $r$  werden normal behandelt, zwischen dem ersten Radius  $r$  und zweiten Radius  $r'$  nehmen die Wechselwirkungen stetig ab.

Dies wird als „twin-range cut-off“ bezeichnet. Eine zweite Möglichkeit ist, die Wechselwirkungen über einen gesamten Cut-Off Radius abnehmen zu lassen. Dies wird als „Shift“-Funktion bezeichnet. Aufgrund der periodischen Randbedingungen muss bei der Wahl der Länge des Cut-Offs darauf geachtet werden, dass dieser nicht größer als die halbe Länge der simulierten Zelle ist, da sonst Atome mit sich selbst wechselwirken. Wegen fehlender Rechenleistung wurde diese Art des Cut-Offs zu Beginn von MD-Simulation vor allem bei der Berechnung großer Systeme häufig eingesetzt. Fehler zeigen sich meist in Artefakten, wie Druck- und Temperaturschwankungen oder einer künstlich erhöhten Ordnung der Moleküle, vor allem dann, wenn viele polare Gruppen vorhanden sind (Wasser, Phospho-Gruppen).

#### 4.5.2 Ewald-Summen

Eine anderer Ansatz, weitreichende Wechselwirkungen in vertretbarer Rechenzeit zu simulieren, bieten die Ewald-Summen.

Zur Berechnung der Ewald-Summe wird angenommen, dass die zu simulierende Zelle bis ins unendliche in alle drei Raumrichtung von ihrem imaginäre Abbild umgeben ist (siehe Kapitel 4.4). Alle elektrostatischen Wechselwirkungen lassen sich ausdrücken als

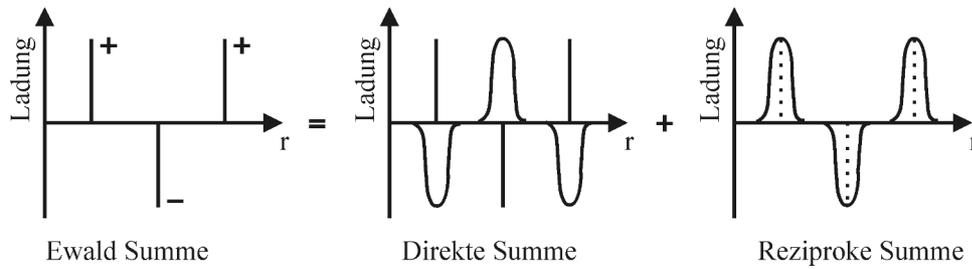
$$V_E = \frac{1}{2} \sum_{\mathbf{n}=0}^{\infty} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon \mathbf{r}_{ij,\mathbf{n}}} \quad (4.9)$$

wobei  $\mathbf{n} = (n_x, n_y, n_z)$  und  $\mathbf{r}_{ij,\mathbf{n}}$  der Abstand zwischen den Ladungen  $i$  und  $j$  ist. Der Strich ' symbolisiert, dass die Wechselwirkungen  $i=j$  in der ursprünglichen Zelle nicht berücksichtigt werden.

Auf diese Weise erhält man die gesamte Energie der Wechselwirkungen in der Ursprungszelle sowie der Wechselwirkungen mit allen imaginären Zellen. Diese Summe konvergiert sehr langsam. Um eine schnelle Konvergenz zu erreichen, greift man zu einer geschickten Umformulierung der Summe und spaltet diese in zwei schnell konvergierende Summen und einen konstanten Term.

$$V_{E(\mathbf{r})} = V_{\text{dir}}(\mathbf{r}) + V_{\text{rec}}(\mathbf{r}) + V_0 \quad (4.10)$$

$V_{\text{dir}}$  ist die direkte Summe oder Realteil,  $V_{\text{rec}}$  die reziproke Summe oder Fourierteil und  $V_0$  ist eine konstante Summe (Bild 4.4).



**Bild 4.4:** Zerlegung der Ewald Summe in eine direkte Summe, eine reziproke Summe und eine konstante Summe, die Striche symbolisieren die Punktladungen, die Kurven stellen Gauß-Ladungsverteilungen dar (nach Toukmaji, 1996)

Anschaulich betrachtet bedeutet die direkte Summe, dass jede Punktladung von einer kontinuierlichen (Gauß-) verteilten Ladung gleicher Stärke, jedoch mit entgegengesetztem Vorzeichen umgeben ist und somit abgeschirmt wird. Es werden also kurzreichende Wechselwirkungen berechnet.

$$V_{\text{dir}} = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \sum_{n=0}^{\infty} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon} \frac{\text{erfc}(\beta r_{ij,n})}{r_{ij,n}} \quad (4.11)$$

wobei  $\text{erfc}(x)$  die komplementäre Gauß'sche Fehlerfunktion ist

$$\text{erfc}(x) = 1 - \text{erf}(x) = 1 - \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^x \exp(-t^2) dt = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_x^{\infty} \exp(-t^2) dt \quad (4.12)$$

und  $\beta$  der Parameter, der die Gewichtung zwischen Real- und Reziprokteil angibt.

Dadurch werden die weitreichenden Wechselwirkungen zwischen benachbarten Punktladungen abgeschirmt und zu kurzreichenden Wechselwirkungen reduziert, die Summe über alle Ladungen konvergiert schnell.

Die Reziproke Summe dient dazu, der oben eingeführten Ladung entgegenzuwirken. Sie besitzt die gleiche Größe und das gleiche Vorzeichen, wie die ursprüngliche Ladung.

$$V_{\text{rec}} = \frac{1}{2V} \sum_{i,j} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon} \sum_{\mathbf{m} \neq 0} \frac{\exp(-\pi^2 \mathbf{m}^2 / \beta^2)}{\mathbf{m}^2} \exp(2\pi i \mathbf{m} \cdot (\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j)) \quad (4.13)$$

mit  $V$  = Volumen der Zelle und  $\mathbf{m}$  ( $m_x, m_y, m_z$ ) = Vektor im reziproken Raum. Die reziproke Summe wird mittel Fourier-Transformation berechnet.

Da die direkte Summe alle Wechselwirkungen der eingeführten Gegenladungen mit sich selbst berücksichtigt, müssen diese durch einen Korrekturterm  $V_0$  beseitigt werden.

$$V_0 = -\frac{\beta}{\sqrt{\pi}} \sum_i \left( \frac{q_i}{4\pi\epsilon} \right)^2 \quad (4.14)$$

Es müssen normalerweise drei Parameter optimiert werden, damit man in einem vernünftigen Zeitrahmen mit Ewald-Summen rechnen kann. Da man nicht unendlich viele Zellen in Betracht ziehen kann, sind dies zum einen die Cut-Off-Radien der direkten und der reziproken Summe, welche angeben, wie viele Zellen in die Berechnung eingehen. Zum anderen ist es der Parameter  $\beta$ , der die Gewichtung zwischen direkter und reziproker Summe bestimmt. Je größer  $\beta$ , desto schneller konvergiert der Realteil bzw. desto langsamer konvergiert der Reziprokteil und umgekehrt.

Mit dieser Methode gelingt es sehr gut, die weitreichenden Wechselwirkungen zu beschreiben. Bei dieser Vorgehensweise ist die Anzahl der Wechselwirkungen jedoch ebenfalls proportional zu  $N^2$ . Es gibt daher weitere Umformungen der Ewald-Summe, um die Rechenzeit zu minimieren.

#### *Particle Mesh Ewald (PME)*

Um die benötigte Rechenleistung gering zu halten, gibt es verschiedene Implementierungen von Ewald Summen. Einen Überblick bietet der Artikel von Toukmaji (Toukmaji, 1996). Einen guten Kompromiss zwischen Simulationsgenauigkeit und benötigter Rechenleistung zeigt vor allem die Particle-Mesh-Ewald-Methode (PME) (Darden, 1993). Die Zahl der Wechselwirkungen steigt hierbei nur noch mit  $N \cdot \log(N)$ .

Für den Realteil wird ein Cut-Off Radius eingeführt. Da im Realteil faktisch nur noch kurzreichende Wechselwirkungen betrachtet werden, kann dieser sehr klein ausfallen. Typisch sind Werte um 1 nm. Der Parameter  $\beta$  wird so gewählt, dass der Realteil nur noch proportional  $N$  ist, das heißt, dass Wechselwirkungen, die außerhalb des Cut-Offs liegen, vernachlässigt werden können.

Anstatt die reziproke Summe über alle reziproken Vektoren zu berechnen, wird der Reziprokteil der Ewald-Summe gegittert und die Ladungen in der Gitterzelle auf einen Gitterpunkt interpoliert. Zur Interpolation kann z.B. eine Lagrange- oder B-Spline-Interpolation angewendet werden. Das Gitter wird mittels eines 3D-Fast-Fourier-Algorithmusses (3D-FFT) Fourier transformiert und die reziproke Energie berechnet. Die potentielle Energie in den Gitterpunkten wird anschließend mit einer inversen Fourier Transformation bestimmt, die daraus resultierenden Kräfte erhält man aus der Ableitung der Energien.

## **4.6 Integrations-Algorithmen**

Position und Geschwindigkeit der Teilchen werden durch Integration der Newtonschen Bewegungsgleichung berechnet. Dazu existieren verschiedene Integrationsalgorithmen. Einer der einfachsten und stabilsten Algorithmen zur Diskretisierung und Integration der Newtonschen Bewegungsgleichung ist der Verlet-Algorithmus (Verlet, 1967). Des weiteren

wird der daraus abgeleitete und in dieser Arbeit verwendete Leap-Frog-Algorithmus (Hockney, 1970) vorgestellt.

Die Kraft  $F$ , die ein beschleunigtes Partikel der Masse  $m$  erfährt, ist nach Newton.

$$\mathbf{F} = m * \mathbf{a} \quad (4.15)$$

Die Beschleunigung  $a$  lässt sich dabei ausdrücken als erste Ableitung der Geschwindigkeit  $v$  des Partikels nach der Zeit oder als zweite Ableitung der Position des Partikels nach der Zeit.

$$\frac{\mathbf{F}(t)}{m} = \frac{\partial \mathbf{v}}{\partial t} = \frac{\partial^2 \mathbf{r}}{\partial t^2} \quad (4.16)$$

Diskretisiert man die Zeitachse und führt den Zeitschritt  $\Delta t$  ein, kann man unter der Voraussetzung, dass die Energie des Systems konstant bleibt, die Position des Partikels zu jeden späteren Zeitpunkt  $t_{n+1} = t_n + \Delta t$  berechnen. Diese wird dann zum Ausgangspunkt des neuen Integrationsschritts. Dazu benutzt man eine Taylorreihenentwicklung.

$$\mathbf{r}(t + \Delta t) = \mathbf{r}(t) + (\Delta t) \frac{\partial \mathbf{r}}{\partial t} + \frac{(\Delta t)^2}{2!} \frac{\partial^2 \mathbf{r}}{\partial t^2} + \frac{(\Delta t)^3}{3!} \frac{\partial^3 \mathbf{r}}{\partial t^3} + \dots \quad (4.17)$$

#### 4.6.1 Verlet-Algorithmus

Der Verlet-Algorithmus benutzt die Positionen des vorangegangenen Zeitschritts  $t - \Delta t$  und die momentanen Positionen zur Berechnung der Positionen zum Zeitpunkt  $t + \Delta t$ .

Bricht man die Taylorreihe nach dem vierten Glied ab und kombiniert Gleichung 4.16 und Gleichung 4.17, erhält man

$$\mathbf{r}(t + \Delta t) = \mathbf{r}(t) + \mathbf{v}(t)\Delta t + \frac{\mathbf{F}(t)}{m} \Delta t^2 + \frac{(\Delta t)^3}{3!} \frac{\partial^3 \mathbf{r}}{\partial t^3} + O(\Delta t^4) \quad (4.18)$$

Die Position des vorangegangenen Zeitschritts ist nach einer rückwärtigen Taylorreihe

$$\mathbf{r}(t - \Delta t) = \mathbf{r}(t) - \mathbf{v}(t)\Delta t + \frac{\mathbf{F}(t)}{m} \Delta t^2 - \frac{(\Delta t)^3}{3!} \frac{\partial^3 \mathbf{r}}{\partial t^3} + O(\Delta t^4) \quad (4.19)$$

Addiert man Gleichung 4.18 und 4.19, erhält man für die Position  $\mathbf{r}$  zum Zeitpunkt  $t + \Delta t$

$$\mathbf{r}(t + \Delta t) = 2\mathbf{r}(t) - \mathbf{r}(t - \Delta t) + \frac{\mathbf{F}(t)}{m} \Delta t^2 + O(\Delta t^4) \quad (4.20)$$

Die Geschwindigkeit taucht im Verlet-Algorithmus nicht auf, kann aber nachträglich berechnet werden als

$$\mathbf{v}(t) = \frac{\mathbf{r}(t + \Delta t) - \mathbf{r}(t - \Delta t)}{2\Delta t} + O(\Delta t^2) \quad (4.21)$$

Der Verlet-Algorithmus ist sehr genau bei der Bestimmung der Ortvariablen, hat jedoch den Nachteil, dass die Geschwindigkeiten erst nachträglich und mit deutlich größerer Ungenauigkeit bestimmt werden können. Des Weiteren ergibt sich ein Anfangswert-Problem, da zum Berechnen des ersten Zeitschritts die Position zum Zeitpunkt  $t = t_0$  und zum Zeitpunkt  $t = t_0 - \Delta t$  bekannt sein müssen. Letztere sind meist nicht bekannt und müssen berechnet werden.

#### 4.6.2 Leap-Frog-Algorithmus

Der Leap-Frog-Algorithmus bietet gegenüber dem Verlet-Algorithmus den Vorteil, dass er die Geschwindigkeiten explizit berechnet. Dabei werden zuerst die Geschwindigkeiten zum Zeitpunkt  $(t + \frac{1}{2} \Delta t)$  ausgehend von den Geschwindigkeiten zum Zeitpunkt  $(t - \frac{1}{2} \Delta t)$  berechnet.

$$\mathbf{v}(t + \frac{\Delta t}{2}) = \mathbf{v}(t - \frac{\Delta t}{2}) + \frac{\mathbf{F}(t)}{m} \Delta t \quad (4.22)$$

Anschließend werden die Positionen  $\mathbf{r}(t + \Delta t)$  aus Geschwindigkeit  $\mathbf{v}(t + \frac{1}{2} \Delta t)$  abgeleitet und zur momentanen Position  $\mathbf{r}(t)$  addiert.

$$\mathbf{r}(t + \Delta t) = \mathbf{r}(t) + \mathbf{v}(t + \frac{\Delta t}{2}) \Delta t \quad (4.23)$$

Der Nachteil des Leap-Frog-Algorithmus ist, dass Position und Geschwindigkeit nie gleichzeitig bekannt sind.

Die Kraft  $\mathbf{F}$  zum Zeitpunkt  $t = t_0$  wird aus der Potentialenergiefunktion  $V$  in Abhängigkeit der Anfangspositionen abgeleitet. Sind die Anfangsgeschwindigkeiten zum Zeitpunkt  $t = t_0 - \Delta t/2$  nicht bekannt, so werden diese mit einer Maxwell-Boltzmann-Verteilung  $f(v_i)$  bei gegebener Temperatur  $T$  berechnet.

$$f(v_i) = \sqrt{\frac{m_i}{2\pi kT}} \exp\left(-\frac{m_i v_i^2}{2kT}\right) \quad (4.24)$$

mit der Masse  $m_i$  des Atoms  $i$ , der absoluten Temperatur  $T$  und der Boltzmann-Konstante  $k$ .

#### 4.7 Druck- und Temperaturkontrolle

Der Zustand eines Systems (Ensembles) lässt sich mit Hilfe seiner Energie  $E$ , der Temperatur  $T$ , des Drucks  $p$  und der Anzahl der Teilchen  $N$  in diesem Ensemble beschreiben. Bei der Simulation eines solchen Ensembles hat man mehrere Möglichkeiten, den thermodynamischen Zustand des Systems zu definieren.

- Mikrokanonisches (NVE) Ensemble: In einem mikrokanonischen Ensemble sind die Anzahl der Teilchen, das Volumen und die Energie konstant. Man spricht von einem adiabaten System.

- Kanonisches (NVT) Ensemble: Ein kanonisches Ensemble stellt ein geschlossenes isothermes System dar. Die Anzahl der Teilchen, das Volumen und die Temperatur werden konstant gehalten.
- Isotherm - Isobares (NpT) Ensemble: In einem Isotherm - Isobaren Ensemble werden Teilchenzahl, Temperatur und Druck konstant gehalten.

In Simulationen ist wichtig, Möglichkeiten der Druck- und Temperaturkontrolle einzuführen. Die Temperatur muss zum Beispiel variiert werden, um Phasenübergänge zu simulieren oder um energiearme Konformationen von Molekülen (simulated annealing) zu erreichen. Oft haben die Atome des Systems zu Beginn einer Simulation nicht die gewünschte Temperatur, so dass es erst einiger Simulationsschritte bedarf, um die Moleküle auf die angegebene „Solltemperatur“ zu bringen. Manchmal können auch Ungenauigkeiten in der Integration, z.B. zu große Integrationsschritte, Rundungsfehler oder Cut-Off Artefakte dazu führen, dass sich die Gesamtenergie eines Systems verändert, so dass diese korrigiert werden muss.

Es gibt verschiedene Ansätze, Temperatur und Druck in MD-Simulationen zu kontrollieren. In dieser Arbeit wurde mit einer schwachen Kopplung nach Berendsen (Berendsen, 1984) gearbeitet.

#### *Berendsen-Thermostat*

Das Berendsen-Thermostat entspricht einer schwachen Kopplung des Systems an ein externes (virtuelles) Wärmebad. Abweichungen von der Solltemperatur  $T_0$  werden langsam nach folgendem Zusammenhang korrigiert.

$$\frac{dT}{dt} = \frac{T_0 - T}{\tau} \quad (4.25)$$

mit der Solltemperatur  $T_0$ , der momentanen Temperatur  $T$  und der Kopplungskonstante  $\tau$ .

Dabei wird Temperaturkontrolle über eine **Skalierung der Geschwindigkeit** der Teilchen erreicht. Die Korrektur erfolgt für jeden Integrationsschritt mittels eines Faktors  $\lambda$ .

$$\lambda = \sqrt{1 + \frac{\Delta t}{\tau_T} \left( \frac{T_0}{T(t)} - 1 \right)} \quad (4.26)$$

mit der Solltemperatur  $T_0$ , der Temperatur  $T(t)$  zum Zeitpunkt  $t$  und der Relaxationszeit  $\tau_T$  ( $\tau_T \neq \tau$ ).

Die Geschwindigkeitsberechnung mit dem Leap-Frog-Algorithmus (Gleichung 4.22) sieht also folgendermaßen aus.

$$\mathbf{v}\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right) = \left[ \mathbf{v}\left(t - \frac{\Delta t}{2}\right) + \frac{\mathbf{F}(t)}{m} \Delta t \right] \lambda \quad (4.27)$$

*Druckkontrolle nach Berendsen*

Ähnlich der Temperaturkontrolle wird auch bei der Druckkontrolle nach Berendsen das System an ein „Druckbad“ gekoppelt und so in Richtung des Solldrucks gezwungen.

$$\frac{dP}{dt} = \frac{P_0 - P}{\tau_p} \quad (4.28)$$

mit dem Solldruck  $P_0$ , dem momentanen Druck  $P$  und der Druck-Kopplungskonstante  $\tau_p$ .

Dabei ist es der Zelle erlaubt, ihr Volumen zu ändern (unter Erhaltung der geometrischen Form der Zelle) um ihren internen Druck anzupassen. Dies erfolgt bei jedem Integrationsschritt über eine **Korrektur der Koordinaten und des Zellvolumens** mittel einer Skaliermatrix  $\mu$ .

$$\mu = 1 - \frac{\beta \Delta t}{3\tau_p} \{P_0 - P(t)\} \quad (4.29)$$

mit der isothermen Kompressibilität  $\beta$ , dem gewünschten externen Druck  $P_0$  und dem momentanen internen Druck  $P$ .

Der Ansatz nach Berendsen ist nicht geeignet, um mikrokanonische oder kanonische Ensembles zu simulieren, da das Volumen nicht konstant bleibt. Andere Ansätze zur Temperaturkontrolle stammen von Andersen (Andersen, 1980), bei der die Geschwindigkeiten zu zufälligen Zeitpunkten mit Hilfe der Maxwell-Boltzmann-Verteilung neu bestimmt werden und von Nosé und Hoover (Hoover, 1985). Der Nosé-Hoover-Thermostat erweitert die Bewegungsgleichung um einen Reibungsterm. Eine weitere Art der Druckkontrolle bieten Parrinello und Rahman (Parrinello, 1981).

#### 4.8 Energieminimierung

Die potentielle Energie eines System ist von den Atomkoordinaten des Systems abhängig. Verändert ein Atom seine Position, z.B. durch Rotation um eine Bindung, dann verändert sich auch die Gesamtenergie des Systems. Die Abhängigkeit der potentiellen Energie von den Atomkoordinaten kann man als Bewegung auf einem Oberflächenprofil darstellen. Diese Oberflächen werden Potentialenergieflächen oder Energiehyperflächen genannt. Das System wird immer einem (lokalen) Minimum auf dieser Oberfläche zustreben. Erstellt man das zu simulierende System, kann es vorkommen, dass sich unerwünschte Atom-Atom Kontakte ergeben oder dass ein Molekül noch keine energiearme Konformation erreicht hat. Daher wird vor Beginn der eigentlichen Simulation meist eine Energieminimierung durchgeführt, die einen möglichst effizient von der Ausgangsposition zum nächsten lokalen Minimum führt. Zwei gängige Verfahren sind die Methode des steilsten Abstiegs („steepest descent“) und das Verfahren der konjugierten Gradienten („conjugated gradients“), die beide die erste Ableitung

der Funktion, welche die Hyperfläche beschreibt nutzen. Mit diesen Methoden ist es möglich, ein **lokales Minimum** auf der Energiehyperfläche zu finden. Dies entspricht jedoch nicht dem **globalen Minimum**, sprich der energieärmsten Konfiguration des Systems, das sich finden lässt. Eine systematische Suche nach dem globalen Minimum ist bisher nicht möglich.

#### *Methode des steilsten Abstiegs*

Bei dieser Methode wird die Richtung entlang der Energiehyperfläche dadurch vorgegeben, dass man sich immer „abwärts“ entlang des größten Gradienten bewegen muss. Die erste Ableitung der Funktion muss also negativ sein. Die Suchrichtung der aufeinanderfolgenden Schritte stehen dabei senkrecht zueinander. Man gelangt so mit wenigen Schritten in Richtung eines Minimums, je näher man diesem Minimum kommt, desto kleiner werden allerdings die Schritte, bis zur Konvergenz kann es daher sehr lange dauern.

#### *Methode der konjugierenden Gradienten*

Bei dieser Methode wird ebenfalls entlang eines negativen Gradienten gesucht, im Gegensatz zur Methode des steilsten Abstiegs stehen die Suchschritte jedoch nicht senkrecht aufeinander, sondern sind abhängig von einer quadratischen Approximation, deren Parameter sich aus dem vorigen Schritt ergeben. Der Rechenaufwand dieser Methode ist jedoch um ein einiges höher, als beim steepest descent, das Minimum wird jedoch meist schneller gefunden.

### **4.9 „Constraints“ – Restriktion der Molekülbewegung**

Bei der „klassischen“ Art von molekulardynamische Simulationen wirken auf die Moleküle keinerlei zusätzlich von außen aufgebrachte Kräfte. Alle Moleküle können sich gemäß ihrer Wechselwirkungen mit den anderen Molekülen frei bewegen bis es zu einem Gleichgewichtszustand kommt. Es gibt jedoch Fragestellungen, bei denen Gleichgewichts-Simulationen keine Antwort geben. Können sich die Moleküle frei bewegen werden sie energetisch ungünstige Molekülkonfiguration (z. B. ein hydrophober Stoff in einer hydrophilen Phase) vermeiden. Bei der Frage nach Permeationsbarrieren oder bevorzugten Aufenthaltsorten von gelösten Stoffen genügt es daher nicht, die Häufigkeitsverteilung aus Gleichgewichts-Simulationen zu betrachten. Die ungünstigen Positionen sind statistisch unterrepräsentiert, so dass keine ausreichende Stichprobenmenge (sampling) vorhanden ist. Spezielle Simulationstechniken, wie „umbrella sampling“ oder „pulling“ können hier weiterhelfen. Bei diesen Simulationen lässt man auf das Molekül zusätzliche Kräfte wirken.

#### *Umbrella Sampling*

Umbrella Sampling Simulationen (Torrie, 1974) bestehen immer aus einer Serie unabhängiger Simulationen, in der die Position eines bestimmten Moleküls entlang einer Achse, (z. B. der z-Achse) oder dessen interne Koordinaten (z.B. Winkel) variiert wird. Man spricht dabei von Simulationsfenstern. Mit Hilfe eines „Störpotentials“ wird das Molekül

dabei in die gewünscht Position oder Konformation gezwungen. Auf diese Weise kann man auch „unvorteilhafte“ Konfigurationen simulieren, die sonst selten vorkommen würden.

Im ersten Fall wird der Molekülschwerpunkt des betrachteten Moleküls mit Hilfe eines zusätzlich wirkenden harmonischen Störpotentials z.B. entlang der z-Achse fixiert.

$$V_s(z) = \frac{1}{2}K_s(z - z_0)^2 \quad (4.30)$$

$K_s$  ist die Federkonstante des harmonischen Potentials,  $z$  die momentane Position des Molekülschwerpunkt und  $z_0$  die gewünschte Position des Molekülschwerpunkts bzw. des Störpotentials. Je größer  $K_s$  gewählt wird, desto enger ist der Bewegungsbereich des Moleküls und desto enger ist das Energieprofil des Umbrella Potentials. Da das Störpotential nur auf den Molekülschwerpunkt in z-Richtung wirkt, kann das Molekül frei rotieren und auch frei in der x-y-Ebene diffundieren. Wichtig ist auch, dass  $K_s$  und die Schrittweite  $\Delta z$  so aufeinander abgestimmt sind, dass sich die Umbrella Potentiale überlappen, um die Integrationskonstante  $C$  bestimmen zu können.

Um aus den einzelnen Simulation ein Profil der freien Enthalpie  $G(z)$  zu erhalten, führt man eine gewichteten Verteilungs-Analyse, („weighted histograma analysis method“ – WHAM, Kumar, 1992) durch. Die freie Enthalpie aus einem Simulationsfenster erhält man aus der Wahrscheinlichkeitsverteilung  $\rho_U(z)$ , welche aus der unrestrikierten Wahrscheinlichkeitsverteilung  $\rho(z)$  besteht, die mit dem Störpotential  $V_s(z)$  gewichtet wurde.

$$\rho_u(z) = (\text{const})\rho(z) * \exp\left\{-\frac{V_s(z)}{kT}\right\} \quad (4.31a)$$

mit der Boltzmannkonstante  $k$  und der Temperatur  $T$ . Daraus lässt sich auf die unrestrikierte Wahrscheinlichkeitsverteilung  $\rho(z)$  schließen.

$$\rho(z) = (\text{const})\rho_U(z) * \exp\left\{\frac{V_s(z)}{kT}\right\} \quad (4.31b)$$

Aus der statistischen Thermodynamik gilt folgender Zusammenhang  $G = -kT \cdot \ln \rho$ , mit dem man die freie Enthalpie  $G(z)$  erhält

$$G(z) = -kT * \ln \rho_U(z) - V_s(z) + C \quad (4.32)$$

Durch Kombination aller Simulationsfenster kann die Konstante  $C$  für jedes Simulationsfenster iterativ bestimmt werden.

Daraus lässt sich unter anderen der Verteilungskoeffizient  $K$  zwischen den Reaktionskoordinaten  $z$  und  $z'$  berechnen.

$$K(z, z') = \exp\left(\frac{-\Delta G(z, z')}{RT}\right) \quad (4.33)$$

mit der Gaskonstante R und der absoluten Temperatur T (Marrink, 1994)

### *Pulling*

Pulling Simulationen entsprechen molekularen Zugversuchen. Ein Atom wird mittels einer virtuellen Feder (Federkonstante  $K_s$ ) mit einer konstanten Geschwindigkeit durch die umgebenden Moleküle gezogen. Die dabei wirkende Kraft wird aus der Dehnung der Feder berechnet. Auf diese Art kann eine relative Energie berechnet werden, die beim Transport über Phasengrenzen oder zum Verlassen von Molekülverbänden nötig ist (Marrink, 1998).

## **4.10 Rechner und Software**

### **4.10.1 Verwendete Rechner**

Zur Durchführung der Simulation wurden vier Athlon AMD-Dual Prozessor-Rechner, von denen zwei jeweils zwei 1,8GHz und zwei jeweils zwei 2,3GHz-Prozessoren haben, genutzt. Diese liefen unter dem Betriebssystem Linux. Die verwendeten Rechner waren netzwerkfähig und auch für parallelen Simulationsmodus geeignet. Für die zahlreichen umbrella sampling Simulationen stand außerdem Rechenzeit auf dem Cluster Elk der Arbeitsgruppe Biocomputing von Prof. Dr. P. Tieleman, University of Calgary, Kanada zur Verfügung. Die Auswertung der Bahnkurven mittels in Gromacs implementierter Programme wurde auf zwei AMD Dualprozessor Rechner mit je 500MHz durchgeführt.

### **4.10.2 Software**

Die eingesetzte MD-Simulationssoftware war GROMACS, im Laufe der Arbeit wurden die Versionen 3.0.5 und 3.1.4 verwendet. Simulation mit GROMACS können im Einfach-Prozessor oder Mehrfach-Prozessor Modus durchgeführt werden.

### **4.10.3 Kraftfeld-Dateien der Aromaten**

Die Kraftfeldparameter der Aromaten wurden aus dem Gromacs-Kraftfeld übernommen (ffgmxbon/ffgmxbon). Die kompletten Kraftfeld-Dateien für die verwendeten Aromaten Benzol-BEN, Pyren-PYR, TFB\_h und TFB\_m finden sich in Anhang A2.1-4.

Für TFB mussten zusätzliche Annahmen getroffen werden. Die partiellen Ladungen für die Fluor-Atome in TFB wurden von De Loof et al. mit  $-0,25$  übernommen (De Loof, 1992). Das C-Atom der COOH-Gruppe wurde mit dem Gromacs-Atomtyp ,C' beschrieben. Waren Kraftfeldparameter für gebundene oder nichtgebundene Wechselwirkungen nicht vorhanden, wurden die entsprechenden Parameter von Atomtyp ,CB' genommen. Für die C-Atome der Trifluormethyl-Gruppe wurde der Atomtyp ,CB' eingesetzt. Hier wurden fehlende Parameter entsprechend mit denen von ,C' ersetzt. Der Referenzwinkel zwischen dem aromatischen C-

Atom, dem C-Atom der Trifluormethylgruppe und dem Fluoratom (siehe Anhang A2.3 und A2.4) wurde aus der Geometrie zu  $126,6^\circ$  berechnet. Um die COOH-Gruppe in der planaren Ringebene zu halten, wurde eine Konstante von  $334,6\text{kJ/mol/rad}^2$  angesetzt. Die COO-Gruppe selbst wurde mit einer Konstanten von  $167,36\text{kJ/mol/rad}^2$  (Gromacs-Kraftfeldparameter für CB-OA) in die Planarität gezwungen.

Da TFB einen pKs-Wert von 3,38 besitzt (Adams, 1992), liegt dieses in Wasser wahrscheinlich deprotoniert vor. Daher wurde eine zweite Kraftfeld-Datei TFB\_m erstellt, in der die Säuregruppe als  $\text{COO}^-$  vorlag.

#### 4.10.4 Auswertung

Als Ergebnis der Simulationen erhält verschiedene Ausgabe-Files, welche aufgrund der Datenmenge nicht im ASCII-Code zugänglich sind. Diese werden mit im Software-Paket GROMACS implementierten Programmen ausgewertet. Die Ausgabe-Dateien dieser Programme sind im ASCII-Format und können mit anderen Tabellenkalkulationsprogrammen weiter ausgewertet werden. Eingesetzte Tabellenkalkulationsprogramme waren Excel2000 und Origin5.0. Die eingesetzten Gromacs-Auswerteprogramme sind im Folgenden aufgeführt.

##### 4.10.4.1 Positionen

Um die xyz-Koordinaten der Atome über die simulierte Zeit zu erhalten, wurde das Programm **g\_traj** benutzt. Mit diesem Programm besteht die Möglichkeit, entweder die Koordinaten einzelner Atome zu berechnen oder sich die Koordinaten von Molekülschwerpunkten bzw. den Schwerpunkten von zuvor definierten Atomgruppen ausgeben zu lassen. Aus den Koordinatendateien lassen sich zahlreiche weitere Größen, wie Winkel zwischen Bindungen oder Abstände zwischen Atomen berechnen. Mit dem gleichen Programm können auch Geschwindigkeiten und Kräfte über die Zeit ausgegeben werden.

##### 4.10.4.2 Aufenthalt

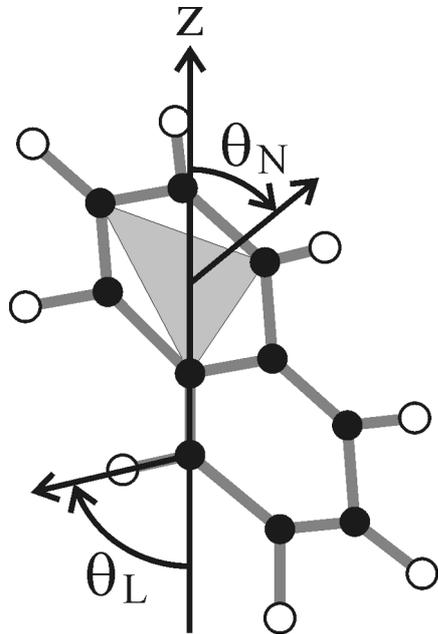
Die Häufigkeitsverteilung der Moleküle über eine Box-Achse kann mit **g\_density** berechnet werden. **g\_density** berechnet die Molekülmasse einer definierten Gruppe von Atomen oder Molekülen in einem bestimmten Volumenabschnitt der simulierten Box über eine bestimmte Zeit. Dies entspricht einer Dichteverteilung der Molekülschwerpunkte oder Atome über die x- y- oder z-Koordinate mit der Einheit  $\text{kg/m}^3$ .

##### 4.10.4.3 Orientierung

Die Orientierung von Bindungen oder Ebenen zueinander oder zu einer Achse kann mittels Vektorgeometrie direkt aus den Koordinaten berechnet werden. Es existiert auch ein Programm **p\_arma** (Tieleman, 1998), mit dem es möglich ist, sich direkt Orientierungsparameter  $S_L$  und  $S_N$  ausgeben zu lassen (Bild 4.5).

$S_L$  ist definiert als

$$S_L = \frac{1}{2}(3 \cos^2 \theta_L - 1) \quad (4.34)$$



wobei der Winkel  $\theta_L$  der Winkel zwischen der molekularen Achse der Bindung und der z-Achse ist.  $S_N$  ist der Normalen-Orientierungsparameter, der den Winkel  $\theta_N$  zwischen der Normalen zu einer aus drei Atomen aufgespannten Ebene und der z-Achse beschreibt.

$$S_N = \frac{1}{2}(3 \cos^2 \theta_N - 1) \quad (4.35)$$

**Bild 4.5:** Veranschaulichung der Winkel  $\theta_N$  zwischen der Normalen einer von drei Atomen aufgespannten Ebene und der z-Achse und dem Winkel  $\theta_L$  zwischen einer Atombindung und der z-Achse

#### 4.10.4.4 Kettenordnungsparameter $S_{CD}$

Der zeitlich gemittelte Kettenordnungsparameter  $S_{CD}$  (zur Theorie siehe Kap. 5.5) lässt sich berechnen als (Tieleman, 1996)

$$-S_{CD} = \frac{2}{3}S_{xx} + \frac{1}{3}S_{yy} \quad (4.36)$$

wobei  $S_{xx}$  und  $S_{yy}$  die zeitlich gemittelten Ordnungsparameter eines Acylkettensegments  $C_{n-1}$ ,  $C_n$ ,  $C_{n+1}$  in x, bzw. y-Richtung sind. Sie sind definiert als

$$S_{ii} = \frac{3}{2} \langle \cos^2 \theta_{ii} \rangle - \frac{1}{2} \quad (4.37)$$

mit  $i = x, y, z$  und dem Winkel  $\theta_{ii}$ , der sich zwischen der molekularen Achse des Kettensegments und der i-Achse ausbildet.

Die Berechnung dieser Größen erfolgte mit dem Programm **g\_order**, welches sowohl  $S_{ii}$ , als auch  $S_{CD}$  berechnet.

#### 4.10.4.5 Platzbedarf der Lipide

Der Platzbedarf der Lipide (Area per Lipid), oder genauer gesagt der Kopfgruppen der Lipide ist wie die Kettenordnung eine experimentell zugängliche Größe. Daher wird sie gerne

eingesetzt, um die Qualität der Simulation zu bewerten. Der Platzbedarf sollte sich über die Simulationsdauer möglichst konstant bleiben. Verändert er sich, deutet dies auf Fehler in der Simulation hin. Berechnet wird der als Länge der simulierten Zelle in x-Richtung multipliziert mit der Länge in y-Richtung und geteilt durch die Anzahl der Lipid in der xy-Ebene. Die Boxlängen können mit `g_energy` berechnet werden.

#### 4.10.4.6 Umbrella Sampling

Die freie Enthalpie  $\Delta G(z)$  entlang der z-Achse lässt sich aus Umbrella Sampling Simulationen berechnen. Bei diesen Simulationen wird der Molekülschwerpunkt an einer Stelle der z-Achse mittels eines zusätzlich wirkenden harmonischen Potentials fixiert. Die Federkonstante dieses Potentials wurde mit  $K_S=3600\text{kJ/mol/nm}^2$  angesetzt. Die Schrittweite, mit der das Molekül entlang der z-Achse festgehalten wurde, war 0,125nm. Um den Verlauf der freien Enthalpie  $\Delta G(z)$  einer halbe Zelle (3,5nm) zu simulieren, waren also 29 unabhängige Simulationen nötig. Die simulierte Zeit je Position betrug 2ns.

Zur mathematischen Auswertung der Simulationen nach WHAM wurden zwei Perl-Skripte eingesetzt, welche im Anhang A3 aufgelistet sind (MacCallum, 2004). „make\_histo“ erstellt die Häufigkeitsverteilung, mittels „wham“ erhält man die freie Enthalpie  $G(z)$ , als Funktion der z-Koordinate mittels Iteration. Es wurden jeweils 10000 Iterationsschritte durchgeführt.

### 4.11 Simulationen mit Lipid-Membranen – Stand der Technik

Wie bereits in Kapitel 2.1 beschrieben, stellt eine Lipid-Membran ein sehr vielschichtiges System dar. Simulationen müssen dem Anspruch genügen, diese Komplexität in ausreichender Genauigkeit widerzuspiegeln. MD-Simulationen eignen sich sehr gut, um einen Einblick in das dynamischen Verhalten einer Membran zu erlangen, Interaktionen auf atomarer Ebene aufzuklären und Rückschlüsse auf makroskopische Größen zu ziehen. Die atomaren Details, die MD-Simulationen enthüllen, können mit keiner Messtechnik erreicht werden. Es waren daher gerade MD-Simulationen, die ihrerseits zu einem besseren Verständnis zum Aufbau und den vielfältigen Wechselwirkungen in einer Lipid-Membran beitrugen (Marrink, 1994, Tieleman, 1997, Saiz, 2001).

Die frühesten Simulation von Lipid-Mono- und Doppelschichten wurde 1980 durchgeführt (Kox, 1980, van der Ploeg, 1982). Als Lipide wurden stark vereinfachte Modelle benutzt, bei denen ganze Gruppen (Kopfgruppen, Methyl-Gruppen) in Form sogenannter „united atoms“, also vereinter Atomgruppen dargestellt wurden. Die Anzahl der Lipide war sehr gering und Wasser als umgebendes Lösungsmittel wurde vollständig ignoriert. Mit steigender Computerleistung ging man zu „all-atom Modellen“ über, eine Doppelschicht bestand aus einer größeren Anzahl von Lipiden und die Grenzschicht Membran-Wasser wurde berücksichtigt.

Die erste hydratisierte Doppelschicht wurde 1988 von Egberts (Egberts, 1994) simuliert. Es handelte sich um eine DPPC-Doppelschicht, bestehend aus 64 Lipid-Molekülen und 736 Wasser-Molekülen, die Methylgruppen der Lipide wurden allerdings noch als united atoms behandelt. Parallel zur Entwicklung zuverlässiger und konsistenter Kraftfelder nahmen Mitte der 1990er auch die Simulationen der verschiedensten Lipid-Doppelschichten zu. Heute stehen neben DMPC- und DPPC andere Phospholipid-Doppelschichten zu Verfügung, welche die Bandbreite sowohl der verschiedenen gesättigten und ungesättigten Acylketten abdecken, als auch der unterschiedlichen geladenen und ungeladenen Kopfgruppen.

In den letzten Jahren wurden Anstrengungen unternommen, die Membranmodelle zu verfeinern, um so bessere Anpassung der virtuellen Membranen an die experimentellen Daten zu erzielen. Insbesondere zur Behandlung von Randbedingungen wurden verschiedene Untersuchungen durchgeführt. So führt das Abschneiden weitreichender elektrostatischer Wechselwirkungen unter Umständen zu unerwünschten Artefakten, wie einem schrumpfenden Platzbedarf der Lipide und einer erhöhten Kettenordnung im Verlauf der Simulation (Anézo, 2003a, Patra, 2003). Rechenzeitraufenwendigere Berechnungen, wie PME (vgl. Kap. 4.5.2) bieten heute, dank gesteigerter Rechnerleistung, eine weniger fehlerbehaftete Behandlung der elektrostatischen Wechselwirkungen.

Ziel einer Membransimulation ist meist die (vereinfachte) Darstellung von Vorgängen, die sich an und in Zellmembranen abspielen. Daher war es ein logischer Schritt, Zellmembrankomponenten, wie Cholesterin oder membrangebundene Proteine in Lipid-Doppelschichten zu simulieren. Der Einfluss von Cholesterin auf die Membraneigenschaften wurden von mehreren Gruppen mit unterschiedlichen Techniken und Kraftfeldern simuliert. Smondyrev et al. analysierten zum Beispiel den Einfluss unterschiedlicher Cholesterinkonzentrationen auf DPPC-Membranen. Kraftfeldparameter wurden aus dem united atom AMBER Kraftfeld übernommen, die Simulationsdauer war 2ns (Smondyrev, 1999). Eine ähnliche Fragestellung wurde von Chiu mit Hilfe kombinierter Monte Carlo- und MD-Simulationen untersucht. Eine DPPC- und eine POPC-Membran wurde bei niedriger Cholesterinkonzentration simuliert. In diesem Fall wurde das GROMOS96 Kraftfeld verwendet. Die simulierten Ergebnisse wurden mit experimentellen Daten verglichen und zeigten eine gute Übereinstimmung (Chiu, 2001).

Jedlovsky et al. veröffentlichten 2003 eine Reihe von Arbeiten, die sich mit den Auswirkungen von Cholesterin auf die lokale Struktur der Lipid-Moleküle und den daraus resultierenden Veränderung der Eigenschaften von DMPC-Membranen beschäftigen. Dazu wurden Monte Carlo Simulationen in Verbindung mit dem CHARMM22 Kraftfeld verwendet (Jedlovsky, 2003a, 2003b, 2004). Die Änderung von Membraneigenschaften von DPPC-Membranen bei verschiedenen Cholesterin-Konzentrationen bis 40% wurden von Hofstätter et al. untersucht. Dazu wurden MD-Simulationen mit Gromacs durchgeführt, um mittels

Kettenordnung, trans-gauche-Verhalten, Platzbedarf der Lipide und lateraler Diffusion die Membraneigenschaften zu charakterisieren (Hofsäß, 2003).

Proteinen und Peptide standen schon immer im Mittelpunkt molekulardynamischer Simulationen (Karplus, 2002). In Kombination mit Membransimulationen ergeben sich viele interessante Fragestellungen, dementsprechend groß ist die Menge an Publikationen, die sich zu diesem Thema finden. Untersuchungen gibt zum Beispiel zur Anlagerung von Peptiden an eine Membran (Sheperd, 2003) bis hin zur Simulation ganzer Ionenkanälen. Einen Überblick zur Simulation von Ionenkanälen bietet der Artikel von Beckstein et al. (Beckstein, 2003), Ash et al. geben zur Simulation von Peptiden, kleinen Proteinen und Membranproteinen eine Zusammenfassung (Ash, 2004).

Das Interesse an Simulationen kleiner Stoffe in Membranen war zunächst gering. Vereinzelt wurde die Permeation kleiner hydrophobe und hydrophiler Stoffe in Membranen untersucht. Verglichen jedoch mit der Fülle der Literatur, die über Simulation von Membran-Protein-Wechselwirkungen existieren, machen diese jedoch nur einen Bruchteil aus. Frühe Simulation zu diesem Thema wurden zum Beispiel von Bassolino-Klimas et al. mit Benzol in einer DMPC-Membran durchgeführt. Den Diffusionsmechanismus beschrieben sie mit einem „hopping“-Modell, wonach von Benzol, ähnlich Gasen in Polymeren, von Lücke zu Lücke in der Membran springt und daher schneller durch eine Membran diffundiert als durch Bulk-Phasen (Bassolino-Klimas, 1993). Bei verschiedenen Temperaturen bevorzugten die Benzolmoleküle unterschiedliche Aufenthaltsbereiche in der Membran (Bassolino-Klimas, 1995). Marrink et al. simulierten die Diffusion von Wasser (Marrink, 1994), Sauerstoff und Ammoniak (Marrink, 1996) durch eine DPPC-Membran. Eine Abhandlung und Diskussion älterer Literatur zur Diffusion kleiner Moleküle in Lipid-Membranen findet sich bei Tieleman (Tieleman, 1997).

Erst in den letzten Jahren fanden vor allem kleine hydrophobe Stoffe mehr Beachtung. Es wurden Simulation von organischen Schadstoffen, wie Pyren (Herrenbauer, 2002) oder Pentachlorphenol (PCP) (Mukhopadhyay, 2004) durchgeführt und deren Auswirkung auf Lipid-Membranen wurden genauer erforscht. PCP, Methylindol, das beim Abbau der essentiellen Aminosäure Tryptophan entsteht, sowie das Anästhetikum Halothan in verschiedenen Membranen wurden von McCallum et al. (McCallum, 2003) und Koubi et al. (Koubi, 2000) simuliert.

Bemporad und Essex (Bemporad, 2004) haben eine ganze Reihe kleiner Moleküle (Acetamid, Benzol, Essigsäure, Ethan, Methanol, Methylacetat, Methylamin und Wasser) im Hinblick auf ihre Permeabilität durch eine DPPC-Membran untersucht. Jedlovsky (Jedlovsky, 2003) analysierte den Einfluss verschiedener Cholesterin-Konzentrationen in DMPC-Membranen auf die Permeabilität von acht biologisch relevanten Stoffen ( $H_2O$ ,  $O_2$ ,  $CO$ ,  $CO_2$ ,  $NO$ ,  $NH_3$ ,  $CHCl_3$  und Formamid) mittels Monte-Carlo Simulationen.

Insbesondere für Pharmazeutika, die häufig kleine hydrophobe Stoffe sind, bieten MD-Simulation ein großes Potential zum besseren Verständnis. So untersuchte Anézo (Anézo, 2003b) die Permeation kleiner Modellwirkstoffe, wie Methylglucose, Mannitol und Salicylsäure durch Phospholipid-Membranen mittels unrestrictierter und verschiedener restrictierter MD-Simulationen.

## Kapitel 5

---

### Kernresonanzspektroskopie (NMR)

---

#### 5.1 Grundlagen

Die Kernresonanzspektroskopie nutzt die Tatsache aus, dass elektromagnetische Strahlung im Hochfrequenzbereich von Atomkernen, die einem starken Magnetfeld ausgesetzt sind, absorbiert wird. Die Absorption der Strahlung wird dabei von der molekularen Umgebung des Atomkerns beeinflusst und lässt somit Rückschlüsse auf die Molekül-Struktur zu\*.

#### *Quantenmechanik*

Jedes Quantenteilchen besitzt einen Spin, das heißt es rotiert um seine eigene Achse. Da in der Quantenmechanik nur diskrete Werte angenommen werden können, kann auch der Spin nur halb- oder ganzzahlige Werte annehmen. Protonen besitzen immer einen entgegengesetzten Spin wie Neutronen. Befinden sich also gleich viele Protonen wie Neutronen im Atomkern, so ist der resultierenden Drehimpuls  $p = 0$ . Ist dies nicht der Fall, wie bei einem Wasserstoff-Atom, so resultiert ein äußerer Drehimpuls  $p$ , der berechnet werden kann als

$$p = \sqrt{I(I-1)} \cdot \frac{h}{2\pi} \quad (5.1)$$

wobei  $I$  die Kernspinquantenzahl und  $h$  das Plancksche Wirkungsquantum ist.

Da jeder Kern eine Ladung trägt, erzeugt er beim Rotieren ein Magnetfeld. Das dabei bedingte magnetische Dipolmoment  $\mu$  ist proportional zum Drehimpuls  $p$ .

$$\mu = \gamma p \quad (5.2)$$

Die Proportionalitätskonstante  $\gamma$  wird gyromagnetisches Verhältnis genannt. Es ist kernspezifisch und kann in Tabellenwerken nachgeschlagen werden.

Legt man ein äußeres Magnetfeld an, so können sich die magnetischen Dipolmomente eines Kerns unterschiedlich orientieren. Die Anzahl der magnetischen Quantenzustände  $m$  eines Kerns lassen sich ausdrücken als  $m = I, I-1, I-2, \dots -I$ , welche die  $(2I+1)$  möglichen Orientierungen des Kernspins im Magnetfeld beschreiben. Die Energie  $E$  eines Kerns in Abhängigkeit des magnetischen Quantenzustands lässt sich berechnen als

---

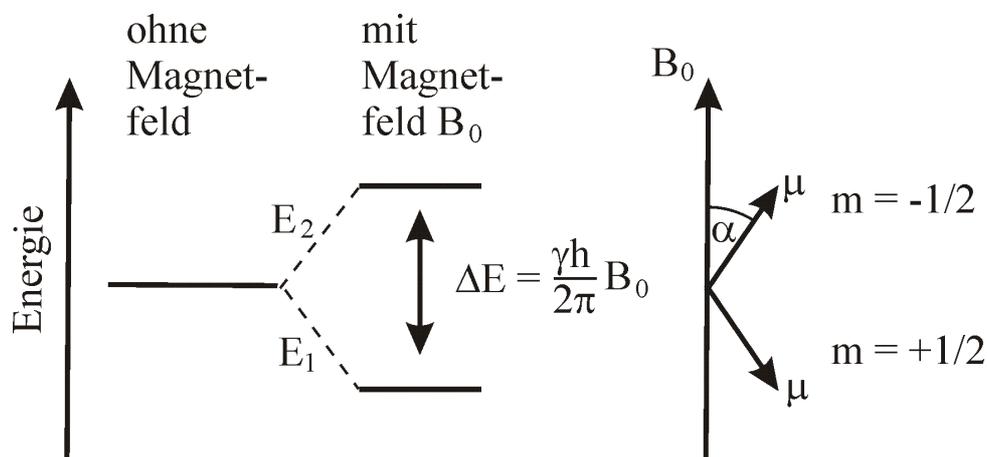
\* Grundlagen dieses Kapitels sind die Lehrbücher von Skoog (Skoog, 1996), Galla (Galla, 1988) und Winter (Winter, 1998).

$$E = -\mu B_0 = -\frac{\gamma \hbar}{2\pi} B_0 \quad (5.3)$$

Die in der NMR-Spektroskopie hauptsächlich genutzten Kerne  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$  und  $^{31}\text{P}$  besitzen eine Spinquantenzahl von  $\frac{1}{2}$  und zwei daraus resultierenden magnetische Quantenzahlen  $m = +\frac{1}{2}$  und  $m = -\frac{1}{2}$ . Die Energiedifferenz zwischen beiden magnetischen Quantenzuständen ist also

$$\Delta E = \frac{\gamma \hbar}{4\pi} B_0 - \left( -\frac{\gamma \hbar}{4\pi} B_0 \right) = \frac{\gamma \hbar}{2\pi} B_0 \quad (5.4)$$

Der Übergang zwischen zwei Quantenzuständen kann nur dann erfolgen, wenn die eingebrachte Energie gleich  $\Delta E$  ist (Bild 5.1).



**Bild 5.1:** Aufspaltung der Energieniveaus in einem statischen Magnetfeld  $B_0$  eines Kerns mit der Spinquantenzahl  $\frac{1}{2}$  (nach Winter 1998)

Bei der NMR-Spektroskopie wird die Energie in Form von elektromagnetischer Strahlung der Frequenz  $\nu_0$  eingebracht. Mit  $\Delta E = h\nu_0$  lässt sich die für den Übergang benötigte Frequenz mit Gleichung ermitteln

$$\nu_0 = \frac{\gamma}{2\pi} B_0 \quad (5.5)$$

Die Frequenz  $\nu_0$  wird Präzessions- oder Lamorfrequenz genannt. Die gleiche Beziehung lässt sich auch aus der klassischen Mechanik herleiten.

#### *Klassische Mechanik*

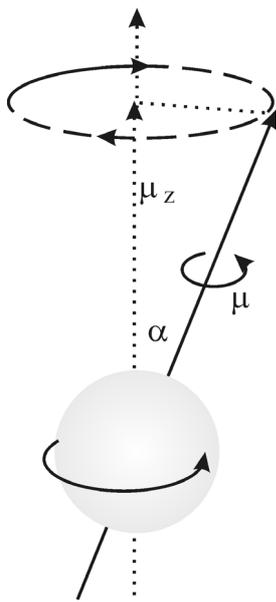
Im Magnetfeld wird auf rotierende geladene Teilchen der Masse  $m$  und der Ladung  $q$  die Lorentzkraft  $F_L$ . Dieser entgegen wirkt die Zentripetalkraft  $F_Z$ . Setzt man diese gleich erhält man

$$qv_0B_0 = \frac{mv_0^2}{r} \quad (5.6)$$

mit  $v_0 = r\omega_0 = r \frac{\nu_0}{2\pi}$  und  $q/m = \gamma$  erhält man wieder die Lamorfrequenz.

$$\nu_0 = \frac{\gamma}{2\pi} B_0 \quad (5.5)$$

im Magnetfeld  $B_0$



Dreht sich das Teilchen nicht nur, sondern präzessiert, d. h. ist die Rotationsachse um einen Winkel  $\alpha$  geneigt (Bild 5.2), gilt für die Energie des Teilchens/Kerns

$$E = -\mu_z B_0 = -\mu B_0 \cos \alpha \quad (5.7)$$

Wird nun Energie vom Kern in Form von elektromagnetischer Strahlung absorbiert, ändert sich der Präzessionswinkel  $\alpha$ . Dabei erfolgt ein Übergang von einem energieärmeren in einen energiereicheren Zustand. Eine Spinumkehr erfolgt dann, wenn die Frequenz der elektromagnetischen Strahlung genau der Lamorfrequenz entspricht, es kommt zur Resonanz.

**Bild 5.2:** Präzession eines rotierenden Teilchens im Magnetfeld  $B_0$ ,  $\mu$  ist der magnetische Dipol,  $\alpha$  der Präzessionswinkel (nach Skoog, 1996)

### Empfindlichkeit

Ohne äußeres Magnetfeld ist die Zahl der magnetischen Quantenzustände identisch, es gibt gleich viele Kerne mit  $m = +\frac{1}{2}$  und  $m = -\frac{1}{2}$ . Im Magnetfeld richten sich die Kerne so aus, dass der niedrigere Energiezustand  $m = +\frac{1}{2}$  überwiegt. Über eine Boltzmann-Gleichung lässt sich der Überschuss an energieärmeren Kernen berechnen.

$$\frac{N_j}{N_0} = e^{\left(\frac{-\Delta E}{kT}\right)} \quad (5.8)$$

wobei  $N_j$  die Zahl der Protonen mit  $m = -\frac{1}{2}$  und  $N_0$  die Zahl der Protonen mit  $m = +\frac{1}{2}$  ist,  $k$  ist die Boltzmann-Konstante,  $T$  die absolute Temperatur.  $\Delta E$  lässt sich nach Gleichung 5.4 berechnen. Der Überschuss der energieärmeren Zustände liegt im ppm Bereich. Mit steigender äußerer Magnetfeldstärke wächst der Überschuss. Heute üblich sind Magnetfeldstärken von 14 Tesla.

## 5.2 Bauweisen von NMR-Spektrometern

Es gibt zwei verschiedene Bauweisen für NMR-Spektrometer. Beim sogenannte CW- (Continuous Wave) Spektrometer wird kontinuierlich ein Magnetfeld  $B_1$  mit einer konstanten Frequenz eingebracht, bei gleichzeitiger Erhöhung der äußeren Magnetfeldstärke  $B_0$ . Stimmt die eingebrachte Frequenz mit der Larmorfrequenz überein, kommt es zur Resonanz, es kann eine Absorption detektiert werden.

Beim FT- (Fourier-Transform) Spektrometer verfährt man umgekehrt. Es wird ein konstantes, sehr starkes äußeres Magnetfeld  $B_0$  angelegt und pulsformig mit einem im  $90^\circ$  Winkel zu  $B_0$  stehenden Magnetfeld  $B_1$  mit der vorher bekannten Larmorfrequenz bestimmte Kerne angeregt. Die Pulsdauer  $\tau$  beträgt wenige  $\mu\text{s}$ , die Dauer zwischen den Pulsen  $T$  einige Sekunden. In dieser Zeit  $T$  kann man das Zeitdomänensignal, den sogenannten freien Induktionsabfall (FID) messen, während die Kerne in den Grundzustand relaxieren. Die FID-Signale der aufeinanderfolgenden Impulse werden addiert, digitalisiert und mittels einer Fouriertransformation in ein Frequenzdomänensignal umgerechnet. Kommerziell erhältliche Spektrometer sind meist FT-Spektrometer.

## 5.3 Anregung und Relaxation

Sind die Kerne einem Magnetfeld  $B_0$  ausgesetzt, absorbieren sie Energie im hochfrequenten Bereich. Nach einer bestimmten Zeit tritt eine Sättigung des Spinsystems der Kerne ein, da diese sich gemäß ihrer Vorzugrichtung im Magnetfeld ausrichten. Als Folge davon nimmt das Absorptionssignal wieder ab.

Nach der Anregung der Protonen im Hochfrequenzfeld kehren diese wieder in ihren Grundzustand zurück. Dabei kann die Energie in drei möglichen Formen abgegeben werden.

- spektroskopische Relaxation: Rückkehr unter Emission von Strahlung. Diese ist im hochfrequenten Bereich vernachlässigbar klein.
- Spin-Gitter-Relaxation (longitudinale Relaxation): strahlungslose Abgabe der Energie an das umgebende Gitter (Lösungsmittelmoleküle) unter leichter Temperaturerhöhung. Der wichtigste Mechanismus der Spin-Gitter-Relaxation ist dabei die Dipol-Dipol-Relaxation. Dieser Vorgang wird mit einer Relaxationszeit  $T_1$  beschrieben. Typische Werte für  $T_1$  liegen im Bereich von  $10^{-2}\text{s}$  bis  $10^4\text{s}$  für Festkörper und  $10^{-2}$  bis  $10^2\text{s}$  für Flüssigkeiten. In Anwesenheit paramagnetischer Ionen kann  $T_1$  auf  $10^{-4}\text{s}$  für Flüssigkeiten verkürzt werden.
- Spin-Spin-Relaxation (transversale Relaxation): Energieabgabe an benachbarte Spins im Grundzustand, wobei die Energie des Gesamtspins unverändert bleibt, die Lebensdauer der angeregten Kerne jedoch stark verkürzt wird. Eine Ursache der transversalen Relaxation liegt in der Anisotropie des Magnetfelds  $B_0$ . Andere Kerne bzw. die Elektronen um die Kerne erzeugen lokale Magnetfelder und führen so zu

einer lokalen Verstärkung oder Abschwächung des äußeren Magnetfelds. Charakterisiert wird die Spin-Spin-Relaxation mit der Relaxationszeit  $T_2$  ( $T_2 < T_1$ ).

## 5.4 NMR-Spektren

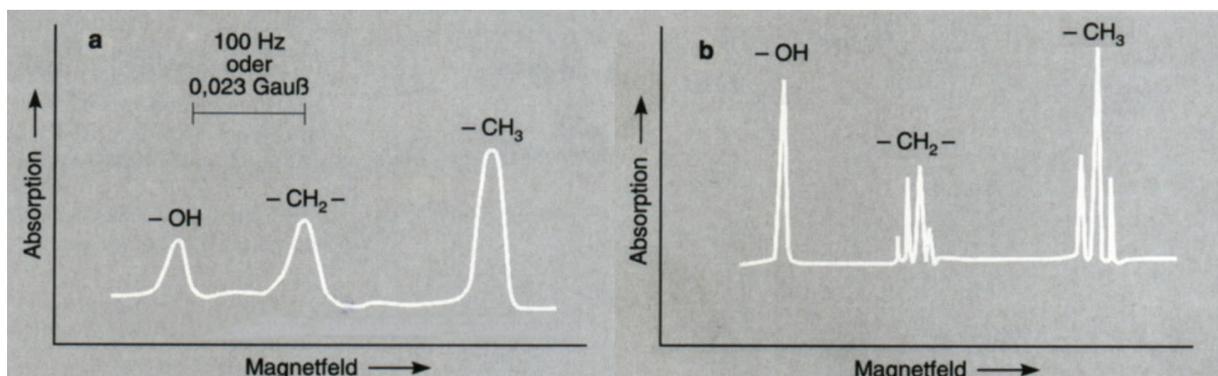
Der Informationsgehalt von NMR-Spektren wird vor allem durch drei Größen beeinflusst, der Relaxationszeit  $T_2$ , der Spin-Spin-Kopplung und der chemischen Verschiebung.

### *Hochaufgelöste und Linienverbreiterte Spektren*

Je nach Stärke des äußeren Magnetfelds und Größe der Relaxationszeiten erhält man nach der Fouriertransformation des FID-Signals unterschiedliche Spektren. Sind die Relaxationszeiten sehr lang, bekommt man hochaufgelöste Spektren mit sehr scharfen Peaks, sind die Relaxationszeiten sehr kurz bzw. wurde ein schwaches Magnetfeld  $B_0$  verwendet, erhält man linienverbreiterte Spektren. Linienverbreiterte Spektren sind häufig das Ergebnis bei Festkörpern oder bei Flüssigkeiten mit paramagnetischen Ionen, da hier die Relaxationszeiten sehr kurz sind. (Bild 5.3a).

### *Spin-Spin-Kopplung*

Bei hochaufgelösten Spektren kann es aufgrund von Spin-Spin-Kopplungen zu einer Feinaufspaltung der Peaks kommen (Bild 5.3b). Für die Feinaufspaltung verantwortlich sind die Nachbarkerne, die über die bindenden Elektronen mit dem Kern wechselwirken. Der Abstand bzw. der Frequenzunterschied zwischen den aufgespalteten Linien wird mit der Kopplungskonstante  $J$  beschrieben.



**Bild 5.3:** (a) Beispiel für ein linienverbreitertes Spektrum von Ethanol und ein hochaufgelöstes Spektrum (b) mit Spin-Spin-Kopplung (aus Skoog, 1996)

### *Chemische Verschiebung*

Wie im vorangegangenen Kapitel gesehen, beeinflusst die chemische Umgebung des Kerns dessen Resonanzfrequenz. Grund für diese Verschiebung sind kleine Magnetfelder, die von Elektronen erzeugt werden, welche sich um die Kerne bewegen. Das äußere Magnetfeld  $B_0$  induziert Kreisströme in der Elektronenwolke um den Kern und die so bewegten Ladungen erzeugen ebenfalls Magnetfelder. Dies führt zu Inhomogenitäten in dem von außen angelegten Magnetfeld  $B_0$ . Das lokale Magnetfeld am Kernort weicht daher geringfügig von  $B_0$  ab, was eine Verschiebung der Larmorfrequenz zur Folge hat. Einflussgrößen auf die

Stärke der Verschiebung können sowohl intermolekularer Art sein, z.B. Substituenten oder diamagnetische Ringströme, erzeugt durch aromatische Verbindungen oder intramolekularer Art, wie Wasserstoff-Brücken oder Lösungsmittelleffekte.

Das effektive Magnetfeld am Kernort  $B_{loc}$  lässt sich berechnen als

$$B_{loc} = B_0 (1 - \sigma) \quad (5.9)$$

mit  $\sigma$  = Abschirmungskonstante und  $B_0$  = angelegtes Magnetfeld.

Die Resonanzfrequenz ist entsprechend

$$\nu_0 = \frac{\gamma}{2\pi} B_0 (1 - \sigma) \quad (5.10)$$

Die Abschirmungskonstante  $\sigma$  wird nicht absolut in Hertz, sondern durch eine dimensionslose Größe  $\delta$  im Bezug auf eine Referenzsubstanz angegeben.

$$\delta = (\sigma_r - \sigma_s) * 10^6 \quad (5.11)$$

Die Indices stehen für s = sample (Probe) und r = reference (Referenz). Bezugssubstanz für  $^1\text{H}$  und  $^{13}\text{C}$  Spektroskopie ist Tetramethylsilan (TMS).  $\delta$  liegt typischerweise im ppm-Bereich. Aufgrund dieser Verschiebung ist es möglich, Aussagen über die chemische Umgebung eines Kern zu treffen um damit Strukturaufklärung für ein Molekül zu betreiben. Die Größe der Verschiebung korreliert meist charakteristisch mit der chemischen Umgebung des Kerns und ist in Tabellenwerken zusammengefasst.

### 5.5 Festkörper-NMR

In isotropen Flüssigkeiten hat man eine schnelle Rotation der Moleküle in alle Raumrichtung. Daher werden alle von der Orientierung in Raumrichtung abhängigen Spins ausgemittelt. Dies gilt jedoch nur für kleine Moleküle in niedrigviskosen Flüssigkeiten. Große Moleküle oder Moleküle in viskosen Flüssigkeiten können sich nur sehr langsam reorientieren, Festkörper sind starr im Raum ausgerichtet. In der Praxis führt dies zu einer linienverbreiterten Spektren, was auf statische Dipol-Dipol-Wechselwirkungen zwischen  $^{13}\text{C}$  und  $^1\text{H}$ -Kernen sowie auf magnetische Anisotropie, hervorgerufen durch die Orientierung der Bindungen im Magnetfeld, zurückzuführen ist. Die Dipol-Dipol-Wechselwirkungen können durch Einbringen von Strahlung in Protonenfrequenzbereich, sogenannter Protonen-Entkopplungs-Pulssequenzen, eliminiert werden.

Der Linienverbreiterung durch die Anisotropie kann mittels magic angle spinning (MAS) entgegengewirkt werden. Dabei wird die (feste) Probe in einem Winkel von  $54,74^\circ$  ( $\sim$ Raumdiagonale eines Würfels) zum angelegten Magnetfeld  $B_0$  ausgerichtet und rotiert bei hohen Frequenzen, was einer mechanischen Ausmittelung der anisotropen Wechselwirkungen gleichkommt. Perfekte isotrope Signale erhält man bei Rotationsfrequenzen, die gleich oder

größer der ohne Rotation gefundenen Linienbreite sind, in der Praxis sind bis zu 35 kHz möglich.

Durch die Rotation geht jedoch die Information über Richtungsabhängigkeiten wieder verloren. Liegen makroskopisch orientierte Proben vor, wie orientierte Lipid-Doppelschichten, lassen sich aus den Spektren räumliche Orientierungen, z.B. von Peptiden in der Membran berechnen.

### 5.6 Deuteronen(<sup>2</sup>H)-NMR-Spektroskopie

Das Deuterium-Atom hat eine Kernspinquantenzahl  $I=1$ , daher besitzt es ein elektrisches Quadrupolmoment, welches von der nicht kugelsymmetrischen Ladungsverteilung im Kern herrührt. Die Quadrupolwechselwirkung ist der dominierende Relaxationsmechanismus, die anderen Relaxationmechanismen, wie dipolare Wechselwirkungen oder Spin-Spin-Kopplung können vernachlässigt werden. Das Spektrum spiegelt also nur den Einfluss der Quadrupolwechselwirkung wider, was eine Auswertung vereinfacht.

Ein Kern mit  $I=1$  kann in einem äußeren Magnetfeld  $B_0$  drei verschiedene Energieniveaus ( $m=0$ ,  $m=-1$ ,  $m=+1$ ) besetzen. Aufgrund der elektrischen Wechselwirkung des Kernquadrupolmoments mit dem umgebenden inhomogenen elektrischen Feld, charakterisiert durch den elektrischen Feldgradienten (EFG) am Kernort, kommt es zu einer Verschiebung dieser eigentlich symmetrischen Aufspaltung (Bild 5.4). Es kann also bei zwei verschiedenen Frequenzen  $\nu_-$  und  $\nu_+$  Übergänge von einem zum anderen Energieniveau stattfinden, was zu zwei Linien im FT-NMR Spektrum führt. Der Frequenzunterschied  $\Delta\nu_Q$  zwischen den Peaks wird als Quadrupolaufspaltung bezeichnet und kann allgemein ausgedrückt werden als

$$\Delta\nu_Q = \nu_+ - \nu_- = \frac{3}{2} \frac{e^2 Q}{h} \left( \frac{3 \cos^2 \theta - 1}{2} \right) \quad (5.12)$$

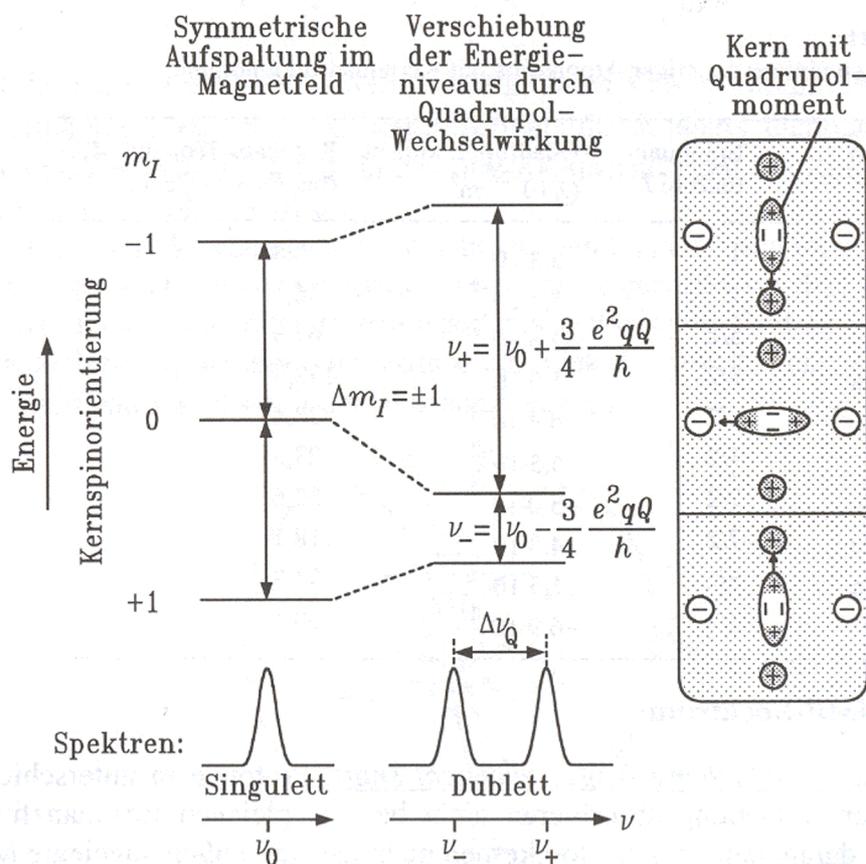
wobei  $\frac{e^2 Q}{h}$  die Quadrupolkopplungskonstante (auch  $Q_{CC}$  genannt) ist. Diese nimmt für Deuterium, welches an ein C-Atom gebunden ist, je nach Art der Bindung (z. B. Einfach-, Doppel- oder aromatische Bindungen) charakteristische Werte an. Der Winkel  $\theta$  beschreibt den Winkel zwischen dem äußeren Magnetfeld  $B_0$  und  $V_{zz}$ .  $V_{zz}$  ist die zweite Ableitung des EFG nach der internen molekularen Achse  $z$

$$V_{zz} = \left( \frac{\partial^2 V}{\partial z^2} \right) = eq \quad (5.13)$$

Die z-Achse verläuft entlang der C-D-Bindung, wobei angenommen wird, dass in dieser Richtung das betragsmäßig größte Element des EFG-Tensors (mit den drei Elementen  $V_{xx}$ ,  $V_{yy}$  und  $V_{zz}$ ) wirkt. Der Asymmetrieparameter  $\eta$  des EFG-Tensors ist definiert als

$$\eta = \frac{V_{xx} - V_{yy}}{V_{zz}} \quad (5.14)$$

Im Falle einer schnellen isotropen Bewegung des deuterierten Moleküls kommt es zu einer Ausmittlung der EFGs, was zu nur einem scharfen Peak führt. Ist die Rotation des Moleküls, z.B. eines deuterierten Phospholipids in einer Membran eingeschränkt, kann man nach Gleichung 5.12 aus der Quadrupolaufspaltung den Winkel, den die C-D Bindung mit dem äußeren Magnetfeld  $B_0$  einget, berechnen (siehe Kapitel 5.7).



**Bild 5.4:** Aufspaltung der Energieniveaus für einen  $I=1$  Kern oben) und die dazugehörigen Spektren (unten). Links ist die Wechselwirkung der unsymmetrisch verteilten Kernladungen mit dem inhomogenen elektrischen Feld veranschaulicht. Gezeigt ist der Fall, dass die Quadrupolaufspaltung, welche abhängig ist von der Orientierung von  $V_{zz}$  zu  $B_0$ , maximal ist (aus Winter, 1998)

## 5.7 Theorie zur Auswertung der $^2\text{H}$ -Spektren

Deuterium ist ein Kern mit einer Kernspinnquantenzahl  $I=1$ . Daher besitzt er ein elektrisches Kernquadrupolmoment, was in Wechselwirkung mit dem elektrischen Feldgradienten zu einer charakteristischen Aufspaltung der  $^2\text{H}$ -NMR-Spektren führt (vgl. Kap. 5.6). Ist das deuterierte Molekül makroskopisch orientiert, so kann aus der Quadrupolaufspaltung  $\Delta\nu_Q$  die zeitlich gemittelte Orientierung der C-D-Bindung zum äußeren Magnetfeld  $B_0$  berechnet werden nach

$$\Delta\nu_Q = \frac{3}{2} Q_{CC} \left\langle \frac{1}{2} (3 \cos^2 \theta - 1) \right\rangle \quad (5.12)$$

mit der Quadrupol-Kopplungskonstante  $Q_{CC}$  und dem Winkel  $\theta$  zwischen der C-D-Bindung und der Richtung des äußeren Magnetfelds. Die Klammern  $\langle \rangle$  stehen für eine zeitliche Mittel des Ausdrucks.

Für ein Deuterium, welches an einen aromatischen Ring gebunden ist, beträgt  $Q_{CC} = 193$  kHz (Rowell, 1965), für ein Deuterium gebunden an eine aliphatische C-Gruppe ist  $Q_{CC} = 167$  kHz.

Um die Orientierung einer Bindung bezüglich einer Vorzugsrichtung zu bestimmen, definiert man einem Ordnungsparameter  $S_{ii}$

$$S_{ii} = \frac{1}{2} \langle (3 \cos^2 \theta - 1) \rangle \quad (5.15)$$

mit  $i = x, y, z$ , dem zeitlich gemittelten Winkel  $\theta$  zwischen der Koordinatenachse  $i$  und der Vorzugsrichtung der Molekülbindung. Es können Werte zwischen  $-0,5$  und  $1$  angenommen werden.

Aus dem Vergleich der Gleichungen 5.12 und 5.15 ergibt sich der Zusammenhang

$$\frac{2}{3} \frac{\Delta\nu_Q}{Q_{CC}} = S_{ii} \quad (5.16)$$

Liegt anisotrope Bewegung vor, lässt sich die Quadrupolkopplung der Deuteronen zusätzlich durch einen molekularen Ordnungstensor  $\mathbf{S}$  (Saupe, 1964; 1968; Emsley, 1996) beschreiben. Ein Element dieses Tensors,  $S_{\alpha\beta}$ , ist gegeben durch

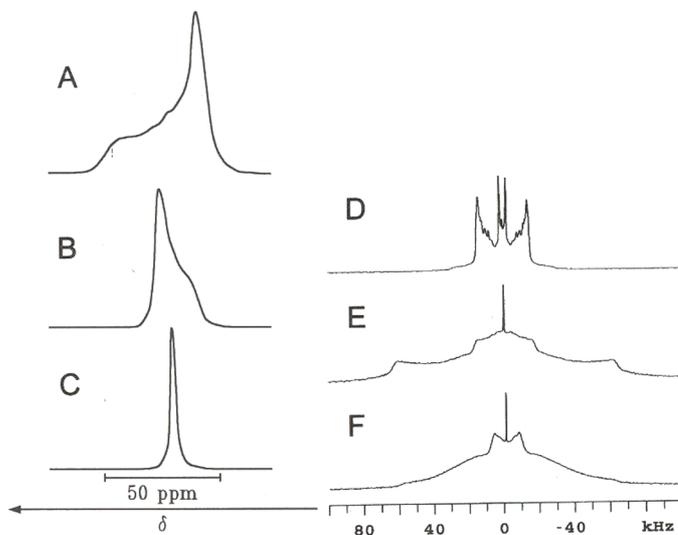
$$S_{\alpha\beta} = \frac{1}{2} (3 \cos \theta_\alpha \cos \theta_\beta - \delta_{\alpha\beta}) \quad (5.17)$$

Mit  $\alpha, \beta = x, y, z$ , eines molekülbezogenen Koordinatensystems und  $\delta_{\alpha\beta}$ , der Kronacker Delta Funktion, welche  $1$  ist, wenn  $\alpha = \beta$  und  $0$  wenn  $\alpha \neq \beta$ . In einer flüssig-kristallinen Phase ist  $\theta_\alpha$  der Winkel zwischen der  $\alpha$ -Achse und der Ausrichtung des Flüssigkristalls, im Fall einer Lipid-Membran ist das die Membran-Normale. Es ist in einem Molekül immer möglich, ein molekulares Koordinatensystem zu finden, in dem der Ordnungstensor aus diagonalen

Elementen  $S_{xx}$ ,  $S_{yy}$  und  $S_{zz}$  besteht, so dass die Summe der Elemente gleich Null ist. In Kapitel 7 ist das für ein Pyren-Molekül in einer POPC-Doppelschicht ausführlich erklärt.

### 5.8 Spektren von Lipid-Doppelschichten

Die unterschiedlichen Morphologien von Lipid-Doppelschichten, die bereits in Kapitel 2.1 beschrieben wurden, liefern unterschiedliche NMR-Spektren. Je nach betrachteten Kern kann man die Morphologie charakterisieren. Bei  $^{31}\text{P}$ -Spektren ist der Grund der unterschiedlichen Spektren in der nicht isotropen Elektronenverteilung um eine  $\text{R}_2\text{PO}_4$ -Gruppe zu finden. Die anisotrope Elektronenverteilung um die Phosphatgruppe kann aufgrund der Anordnung in orientierten Doppelschichten nicht durch schnelle Rotation ausgemittelt werden, die chemische Verschiebung ist also von der räumlichen Ausrichtung der Phosphatgruppe zum äußeren Magnetfeld abhängig und es kommt zu charakteristisch linienverbreiterten Spektren (Bild 5.5A und B). Bei unilamellaren Liposomen dagegen wird die Anisotropie durch die Beweglichkeit der Liposomen selbst ausgemittelt, man erhält ein isotropes Spektrum (5.5C). Bei (teilweise) kettendeuterten Phospholipiden kommt es wegen der in Kapitel 5.6 beschriebenen Quadrupolaufspaltung zu den typischen Doppelpicks. Beispiele für unterschiedliche  $^2\text{H}$ -Spektren bei verschiedenen Phasenzustände sind im Bild 5.5D, E und F gezeigt.



**Bild 5.5:** Links:  $^{31}\text{P}$ -NMR Spektren für verschiedene lamellare Aggregate von Phospholipiden. A: lamellare Doppelschicht, B: hexagonale  $\text{H}_{\text{II}}$ -Phase, C: Phase mit isotroper Bewegung, z.B. kleine unilamellare Liposomen oder kubische Phasen (aus Galla, 1988, vgl. auch mit Bild 2.2 und Bild 2.5). Rechts:  $^2\text{H}$ -NMR Spektren kettendeutierter DMPC- $\text{d}_{27}$ -Doppelschichten. D: flüssig-kristalline  $\text{L}_{\alpha}$ -Struktur bei  $30^\circ\text{C}$ , E: flüssig-geordnete  $\text{l}_0$ -Phase bei  $3^\circ\text{C}$ , entstanden bei einer Hydratation unterhalb von  $T_m$ , F: Gelphase  $\text{L}_{\beta}$  bei  $3^\circ\text{C}$ , entstanden bei einer Hydratation oberhalb von  $T_m$  (aus Ullrich, 2002, vgl. auch mit Bild 2.2 und Bild 2.4)

# Kapitel 6

---

## POPC

---

### 6.1 Einleitung

Um eine Vergleichsbasis sowohl für die simulierten, als auch für die experimentellen Ergebnisse zu haben, wurden jeweils Simulationen und Versuche mit purem POPC durchgeführt. Die Parameter der Simulation entsprachen dabei denen der Simulationen mit Pyren, Benzol, TFB und TFB<sup>-</sup>.

Die experimentellen Daten aus der <sup>2</sup>H-NMR-Spektroskopie dienen als Interpretationsreferenz für die entsprechenden Versuche mit Pyren und als Bewertungsbasis für die Qualität der Simulationen.

In diesem Kapitel sollen anhand der Membrancharakteristika „Platzbedarf der Lipide“ und „Kettenordnungsparameter  $S_{CD}$ “ das Verhalten der Membran bei den Simulationen dargestellt werden. Probleme, die mit der Behandlung der weitreichenden Coulomb-Wechselwirkung entstehen, werden aufgezeigt und diskutiert.

### 6.2 Material und Methoden

#### *Durchgeführte Simulationen und ihre Parameter*

**Tabelle 6.1:** Parameter der Simulationen von POPC-Doppelschichten

Lipid	#Moleküle Lipid/Wasser	Temperatur/K	Druck/bar	Länge/ns	Cut-Off/ PME	Cut-Off- Radius
DMPC	128/3655	343	1	30	cut-off	1,8nm
POPC	128/4480	285	1	10	cut-off	1,8nm
POPC	128/4480	300	1	25	cut-off	1,8nm
POPC	128/4480	300	1	20	PME	1,0nm
POPC	128/4480	315	1	10	cut-off	1,8nm

Bei allen Simulationen wurde ein leap-frog Algorithmus mit einem Integrationszeitschritt von 2fs zur Integration der Bewegungsgleichung verwendet. Jeder 250. Schritt wurde zur Datenauswertung abgespeichert. Die Nachbarschafts-Liste wurde alle 10 Schritte aktualisiert.

Die nichtgebundenen Wechselwirkungen wurden entweder einem Twin-Range Cut-Off unterzogen oder nach der Particle-Mesh-Ewald-Methode berechnet. Die kurzreichenden van der Waals-Wechselwirkungen wurden immer mittels eines Twin-Range Cut-Offs mit einem Radius von 1nm beschnitten. Wurde ein Twin-Range Cut-Off für die Coulomb-Wechselwirkungen eingesetzt, betrug der Cut-Off-Radius 1,8nm. Wurde PME verwendet, so betrug der Cut-Off für den Realteil 1nm, die Gitterweite zur Berechnung der Reziproken Summe war 0,12nm.

Es wurde bei konstanter Temperatur und konstanten anisotropen Druck ( $NpT$ -Ensemble) simuliert. Um die Temperatur und den Druck konstant zu halten, wurde die Methode nach Berendsen mit Temperatur- und Druckkopplung benutzt. Die Temperatur wurde mit einer schwachen Kopplung von  $\tau_T = 0,1\text{ps}$  korrigiert. Der Druck wurde in alle drei Raumrichtungen unabhängig voneinander korrigiert, die Kopplungskonstante zur Druckkontrolle betrug jeweils  $\tau_P = 1\text{ps}$ .

Die POPC-Membran, bestehend aus 128 POPC Molekülen und 4480 SCP-Wasser Molekülen, wurde von Tieleman (WEB1, 2005) übernommen, die Kraftfeld-Parameter stammen von Berger (Berger, 1997). Vor der Simulation wurden alle Ausgangskonfiguration einer Energieminimierung bis zur Konvergenz, mindestens aber von 100 Schritten nach dem Prinzip des steilsten Abstiegs unterworfen.

#### *Chemikalien und Probenvorbereitung*

Die NMR-Versuche wurden freundlicherweise von Frau Prof. Dr. Anne Ulrich und Dr. Erik Strandberg am Institut für Organische Chemie, Universität Karlsruhe durchgeführt und ausgewertet.

Die Kettenordnungsparameter  $S_{CD}$  für die sn-1-Kette von POPC wurden mittels  $^2\text{H}$ -NMR-Spektroskopie bei 285K, 300K und 315K bestimmt.

1-palmitoyl- $d_{31}$ -2-oleoyl-phosphatidylcholine (POPC- $d_{31}$ ) wurde von Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA) bezogen.  $\text{CHCl}_3$  stammt von Merck (Darmstadt, Germany), als Wasser wurde Reinstwasser aus einer Milli-Q Reinstwasseranlage von Millipore (Bedford, MA, USA) verwendet.

Zu Herstellung orientierter Doppelschichten wurden 21,5 mg POPC- $d_{31}$  in 3,6 ml Chloroform gelöst. 20 dünne Glasplättchen mit den Abmessungen 18mm x 7,5mm x 0,08mm (Marienfeld Laboratory Glassware, Lauda-Königshofen) wurden mit der POPC -Lösung benetzt und anschließend eine Stunde bei Luft und 12 Stunden unter Vakuum getrocknet. Um eine Reorientierung der Doppelschichten zu ermöglichen, wurden die getrockneten Glassplättchen 36h in einem Wärmeschrank bei 30°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 98% über gesättigtem  $\text{K}_2\text{SO}_4$  gelagert. Bis zur Messung wurden sie in Parafilm gewickelt um die Hydratation zu gewährleisten.

### *<sup>31</sup>P-NMR Versuche*

Zur Überprüfung, ob orientierte Doppelschichten vorliegen, wurden <sup>31</sup>P-NMR Untersuchungen an einem Bruker Avance 500 MHz NMR Spektrometer (Bruker Biospin, Karlsruhe) bei einer Frequenz von 202,5MHz durchgeführt. Es wurde eine Hahn-Echo-Sequenz mit einem Phasenzyklus von einem 7 $\mu$ s dauernden 90°-Puls, 30 $\mu$ s Echo-Zeit und 2s Relaxationzeit (Rance, 1983) angewendet. Die Spektralweite betrug 100kHz. Es standen 4096 Datenpunkten zur Verfügung, zusätzlich wurde mit eine Protonenentkopplung von tppm20 (Bennett, 1995) durchgeführt. 128 Scans wurden gesammelt und die Spektren mit einer Xwinmr Software von Bruker ausgewertet, wobei vor der Fouriertransformation eine Offset-Korrektur, eine Nulladdition auf 16384 Datenpunkten und eine Multiplikation mit 100Hz durchgeführt wurde.

### *<sup>2</sup>H-NMR Versuche*

<sup>2</sup>H-NMR-Experimente wurden an einem Bruker Avance 600MHz NMR Spektrometer (Bruker Biospin, Karlsruhe) bei 92,1MHz durchgeführt, wobei eine Quadrupol-Echo-Sequenz angewandt wurde (Davis, 1976) mit einem 3,8 $\mu$ s dauernden 90°-Puls, einer Echo-Verzögerung von 30 $\mu$ s und 500ms Relaxationszeit.

Die Spektralweite betrug hier 250kHz. Die Anzahl der Datenpunkt war 4096. 2048 Scans wurden gesammelt. Die Datenerfassung wurde vor dem Echo gestartet und die Werte der Zeitdomäne anschließend so weit nach links verschoben, bis der freie Induktionsabfall beim Echo-Maximum startet. Vor der Fourier Transformation wurde wiederum eine Nulladdition auf 32768 Datenpunkte und eine Multiplikation mit 10Hz durchgeführt. Die verwendete Software war eine Topspin Software von Bruker.

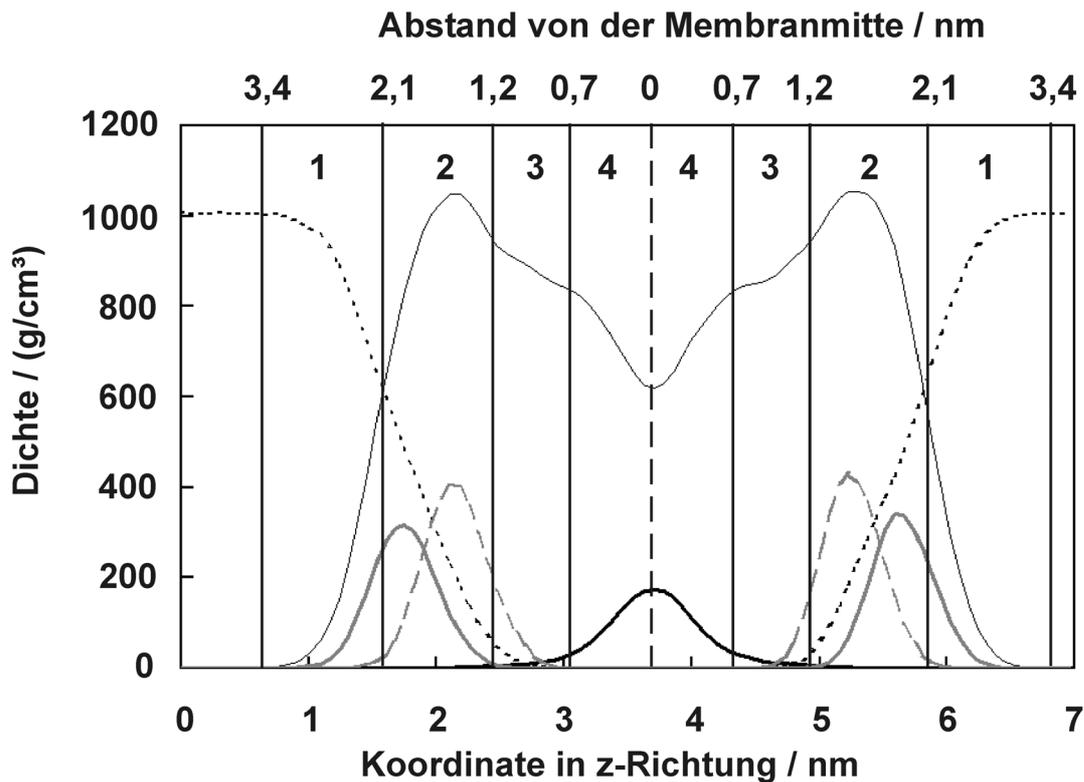
Die Spin-Gitter-Relaxationszeit  $T_1$  wurde mittels einer Quadrupol-Echo Inversion-Recovery-Sequenz (180°- $t_1$ -90°- $\tau$ -90°- $\tau$ ) ermittelt.  $t_1$  wurde in 12 Schritten von 1ms bis 2s variiert. Für jeden  $t_1$ -Wert wurden 64 Scans durchgeführt. Die anderen Parameter wurden bereits im vorigen Abschnitt genannt. Zur Berechnung von  $T_1$  wurde die Fläche unter den Peaks auf einen Ausdruck  $I(t_1)=I_0[1-p \exp(t_1/T_1)]$  gefittet, wobei  $I_0$  die Intensität bei  $t_1=0$  und  $p$  die Inversionseffizient ist; bei einer perfekten Inversion gilt  $p = 2$ .

Die NMR Experimente wurden bei 285K, 300K und 315K durchgeführt, die Temperatur wurde mit einem Bruker VTU auf eine Genauigkeit von 0,1K geregelt.

### 6.3 Ergebnisse

#### *Verteilung der Dichte (Aufenthaltswahrscheinlichkeit)*

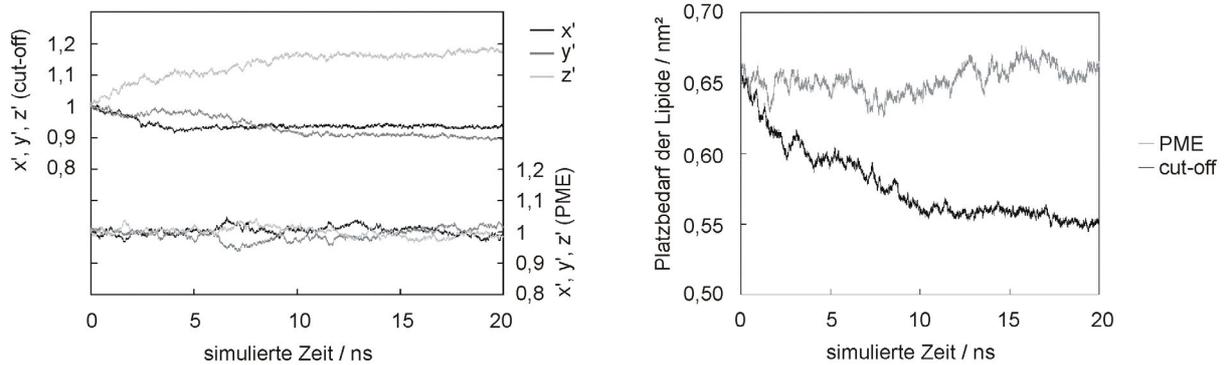
In Bild 6.1 ist die Dichte einzelner Molekülgruppen der Membran über die z-Koordinate bzw. dem Abstand zur Membranmitte dargestellt. Zusätzlich markiert sind die einzelnen Schichten des in Kapitel 2.3 vorgestellten Vier-Phasen-Modells einer Lipid-Membran.



**Bild 6.1:** Verteilung der Dichte in ( $\text{g}/\text{cm}^3$ ) von Wasser (schwarz gepunktet), POPC (schwarz; dünn), der Phosphogruppe (grau, durchgezogen), der Glyceringruppe (grau, gestrichelt) und dem letzten C-Atom der gesättigten und der ungesättigten Acylkette (schwarz, dick) bei 300K, PME und 20ns simulierter Zeit, aufgetragen über den Abstand zur Membranmitte (oben) und über die z-Achse des simulierten Systems (unten). Außerdem markiert sind die vier Phasen des in Kapitel 2 beschriebenen Vier-Phasen-Modells nach Marrink (1994)

#### *Platzbedarf der Lipide*

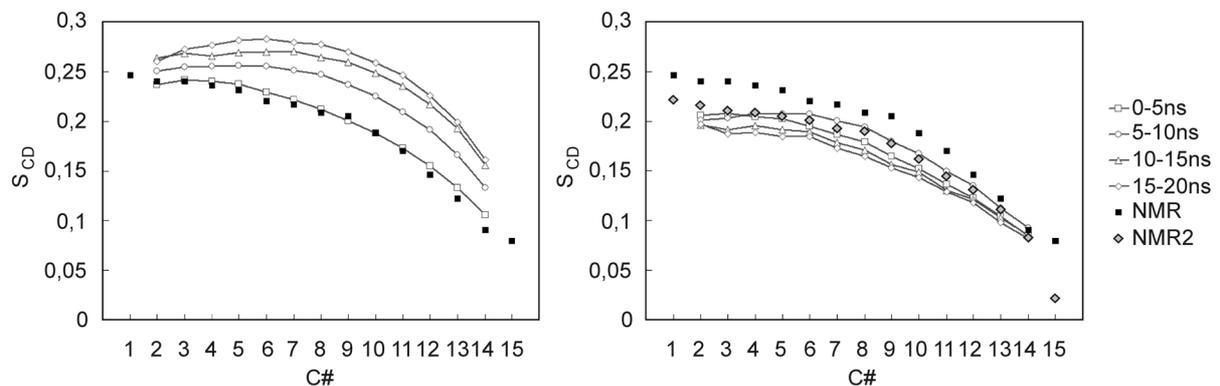
Beim Berechnen der weitreichenden Coulomb-Wechselwirkungen wurde für die meisten Simulationen ein Cut-Off-Radius verwendet (siehe Kapitel 4.5). Der Fehler, der durch den Cut-Off entsteht, akkumuliert sich mit längerer Simulationsdauer und macht sich auf unterschiedliche Weise bemerkbar. Es verschieben sich die Dimensionen der Lipid-Membran, die Membran verkleinert sich in x- und y-Richtung, in z-Richtung wird sie in die Länge gezogen (Bild 6.2 links). Dies hat einen sinkenden Platzbedarf der Lipid-Moleküle zur Folge (Bild 6.2 rechts), während die Dimensionen der Membran und der Platzbedarf beim Einsatz von Ewald-Summen relativ konstant bleiben.



**Bild 6.2:** Simulation von POPC bei 300K. Links: Veränderung der Boxdimensionen in x-, y- und z-Richtung während der Simulation, bezogen auf den Ausgangslängen der Zelle bei Berechnung der Coulomb-Wechselwirkungen mit einem Cut-Off und mit PME. Rechts: Zeitlicher Verlauf des Platzbedarfs der Lipide in  $\text{nm}^2$  bei Cut-Off und PME

### Kettenordnung

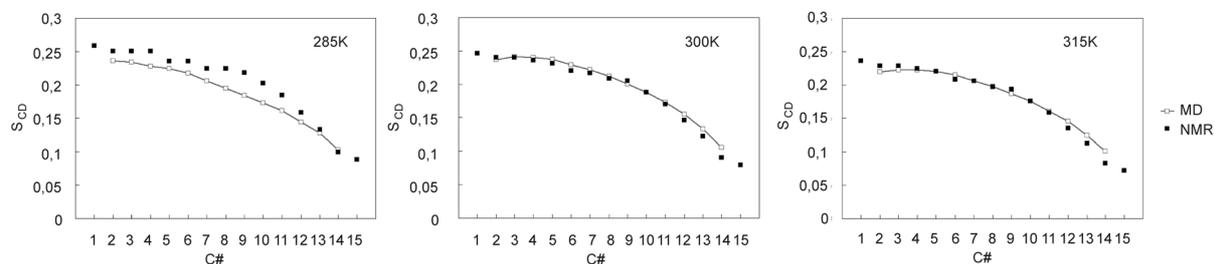
Die aus dem gesunkenen Platzbedarf der Lipide hervorgerufene künstlich höhere Ordnung der Fettsäureketten lässt sich anhand des Kettenordnungsparameters  $S_{CD}$  sehr gut nachvollziehen. Aufgrund der Methode, mit der  $S_{CD}$  aus den Simulationen bestimmt wird (Kapitel 4.10.4.4), kann der Ordnungsparameter nur für die Kohlenstoff-Atome 2 bis 14 bestimmt werden. In Bild 6.3 ist die Veränderung von  $S_{CD}$  in Abhängigkeit der Simulationsdauer bei einer Simulation von reinen POPC bei 300K bei der Berechnung der Coulomb-Wechselwirkungen mit Cut-Off (links) und mit PME (rechts) gegenübergestellt. Man sieht, dass beim Einsatz von Cut-Off die Kettenordnung mit der Zeit zunimmt, während sie bei Ewald-Summen relativ konstant bleibt.



**Bild 6.3:** Kettenordnungsparameter  $S_{CD}$  der sn-1-Kette bei der Simulation von POPC bei 300K, gemittelt über verschiedene Zeiten der Simulation bei Berechnung der Coulomb-Wechselwirkung mit einem cut-off (links) und mit PME (rechts) sowie die Ergebnisse der  $S_{CD}$ -Parameter aus  $^2\text{H}$ -NMR-Untersuchungen bei 300K (schwarze Vierecke, NMR). Die Spektren und Werte dazu finden sich im Anhang A4.1-3. Die hellgrauen Karopunkte (NMR2) sind  $S_{CD}$ -Parameter aus Yau, 1998

Die schwarzen Punkte repräsentieren die Ergebnisse aus NMR-Untersuchungen. Bei Ewald-Summen mit dem verwendeten Cut-Off von 1 nm für die direkte Summe wird die tatsächliche Kettenordnung leicht unterschätzt, das heißt die Membran ist ungeordneter als im Experiment. Bei Simulationen mit Cut-Off wird die tatsächliche Ordnung mit zunehmender Simulationslänge deutlich überschätzt, bis sie bei etwa 15 ns stagniert. Die Ergebnisse bei

einer Mittelung von  $S_{CD}$  über die ersten 5ns der Simulation zeigen jedoch sehr gute Übereinstimmung zwischen Simulation und Experiment für 300K und 315K (Bild 6.4). Bei 285K ist die Übereinstimmung schlechter, in der MD-Simulation ist die Membran ungeordneter als aus dem NMR-Experiment ersichtlich.



**Bild 6.4:** Kettenordnungsparameter  $S_{CD}$  der sn-1-Kette für POPC bei 285K, 300K und 315K, berechnet aus NMR-Experimenten und MD-Simulation, wobei über die ersten 5ns (0-5ns) der Simulation gemittelt wurde

## 6.4 Diskussion

### *Platzbedarf und Kettenordnung*

Die Eigenschaften von Lipid-Membranen sind stark von ihren äußeren Umgebungsbedingungen, wie der Temperatur (Pabst, 2000), dem Hydratisierungsgrad (Binder, 2003), den anwesenden Ionen (Böckmann, 2003) und der Messmethode abhängig. Ionen spielen in unserem Fall keine Rolle. In den Simulationen kann zudem von einem voll hydratisierten Zustand ausgegangen werden. Das molare Lipid-zu-Wasser-Verhältnis liegt bei 35, im Experiment liegt eine volle Hydratisierung bereits bei einem Verhältnis von 12 vor (Binder, 2003).

In Tabelle 6.2 sind verschiedene experimentell bestimmte Daten für den Platzbedarf von POPC samt der Versuchsbedingungen und der Messmethode zusammengefasst.

**Tabelle 6.2:** Experimentell bestimmter Platzbedarf für POPC-Moleküle in  $\text{nm}^2$ , abhängig von der Temperatur, dem Hydratisierungsgrad und der Messmethode

Area per Lipid / $\text{nm}^2$	0,59 +/- 0,013	0,64 +/- 0,01	0,65 +/- 0,03	0,655 +/- 0,01
Temperatur / K	303	298	298	298
Hydratisierungsgrad / %	100	97	100	100
Messmethode	SAXS	SAXS	FRET	SAXS
Quelle	Pabst, 2000	König, 1997	Lantzsch, 1994	König, 1993

Der ursprüngliche Platzbedarf der Lipide von  $0,655 \text{ nm}^2$  bei 300K und voller Hydratisierung ist in guter Übereinstimmung mit den experimentellen Daten. Bei der Verwendung des Cut-Offs hätte vorher eine bessere Equilibrierung der Membran stattfinden müssen bzw. andere Cut-Off-Parameter überprüft werden sollen. Der Platzbedarf für die Simulation mit PME bleibt über weite Strecken konstant und spiegelt somit die Realität besser wider.

Die Kettenordnung stimmt für die Cut-Off-Simulation bei 300K und 315K während der ersten 5ns sehr gut mit den experimentellen Daten aus den eigenen NMR-Versuchen überein. Hier muss jedoch angemerkt werden, dass in den NMR-Experimenten die Hydratisierung bei 98% lag. Da mit steigender Hydratisierung die Kettenordnung abnimmt, liegen die Werte für 100% RH etwas unter den hier aufgeführten. Danach machen sich die Simulationsartefakte zu stark bemerkbar. Vergleichswerte aus der Literatur zeigen jedoch eine relativ breite Schwankung für einzelne Temperaturbereiche. Die Unterschiede in den experimentellen Daten sind vor allem methoden- und auswertungsabhängig (Tabelle 6.3). Eine weitere Rolle spielt die Herstellung der Proben und der Hydratisierungsgrad. Zieht man in Betracht, dass in unseren Experimenten keine vollständige Hydratisierung (98% RH) vorlag und daher die Ketten etwas geordneter als bei vollständiger Hydratisierung sind, passen diese gut zu den Ergebnissen aus den PME-Simulationen. Die hellgrauen Karopunkte stammen aus einer anderen Quelle (Yau, 1998), sie wurden bei 300K und voller Hydratisierung aufgenommen. Die Übereinstimmung mit den simulierten Daten ist hier sehr gut.

Aus der Literatur (Seeling, 1978, Binder, 2003) und den eigenen experimentellen Ergebnissen ist zu erkennen, dass mit steigender Temperatur die Kettenordnung abnimmt, weswegen die Ergebnisse der Simulation bei 315K offensichtlich aus dem Rahmen fallen. Die Kettenordnung liegt für die ersten fünf Nanosekunden der Simulation etwa im Bereich der Werte von 285K, was wiederum auf die Cut-Off-Artefakte zurückzuführen ist. Der Cut-Off Fehler macht sich bei den verschiedenen Temperaturen unterschiedlich schnell bemerkbar. Ein Vergleich der Ordnungsparameter zwischen verschiedenen Temperaturen bzw. zwischen beladenen und unbeladenen Membranen ist nur möglich, wenn der Platzbedarf der Lipide konvergiert und konstant bleibt. Solange sich diese noch ändert ist kein direkter Vergleich möglich.

**Tabelle 6.3:** Vergleich von experimentell bestimmte Kettenordnungsparameter  $S_{CD}$  für den ähnliche Versuchsbedingungen

T/K	RH/%	$Q_{CC}$	LIT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
300	100	170	<sup>a</sup>	0,20	0,19	0,20	0,21		0,22		0,20	0,18	0,16		0,14		0,10
298	100	167	<sup>b</sup>	0,22	0,22	0,21	0,21	0,21	0,20	0,19	0,19	0,18	0,16	0,15	0,13	0,11	0,08
300	97	168	<sup>c</sup>	0,25	0,24	0,24	0,24	0,23	0,22	0,22	0,21	0,21	0,19	0,17	0,15	0,12	0,09

<sup>a</sup>Seelig, 1978, <sup>b</sup>Yau, 1998, <sup>c</sup>eigene Messung

### *Cut-Off oder Particle-Mesh-Ewald?*

Verschiedene Studien, die sich mit den Artefakten beschäftigen, welche bei der Berechnung der weitreichenden Wechselwirkungen entstehen, kommen zu ähnlichen Ergebnissen wie oben aufgeführt. Patra et al. (Patra, 2003) simulierten 20 ns eine DPPC-Doppelschicht mit verschiedenen Cut-Off-Längen von 1,8, 2,0 und 2,5nm und PME-Parametern. Sie fanden bei

kleineren Cut-Off-Radien eine dichter gepackte Membran, das heißt größere Kettenordnungen und kleinerer Lipid-Platzbedarf. Die Resultate bei der Simulation mit PME hingegen waren konsistent mit experimentellen Befunden. Durch Umschalten von Cut-Off auf PME während einer Simulation konnten sie zeigen, dass für dieses Verhalten fast ausschließlich die Art, wie die weitreichenden Wechselwirkungen berechnet wurden, verantwortlich ist.

Eine ähnliche Studie wurde von Anézo (Anézo, 2003a) durchgeführt. Hier wurden unterschiedliche Arten zur Behandlung weitreichender Wechselwirkungen mit verschiedenen Parametern ebenfalls an einer DPPC-Membran getestet, wobei Simulationszeiten bis zu 150 ns realisiert wurden. Der Parameter, der am empfindlichsten auf die verschiedenen Cut-Off-Methoden reagierte, war der Platzbedarf der Moleküle. Es zeigte sich, dass, solange der Platzbedarf der Lipide im Bereich der experimentellen Daten bleibt, auch andere Lipid-Parameter (Kettenordnung, Volumen pro Lipid oder cis-trans-Wechsel) nahe an den experimentellen Befunden bleiben. Die größten Artefakte riefen auch hier herkömmliche Cut-Off-Methoden hervor, mit größeren Cut-Off-Radien wurden die Ergebnisse deutlich schlechter. Bei der Anwendung anderer Methoden, wie PME, Reaction Field oder Shift-Funktionen müssen die eingesetzten Parameter aufeinander abgestimmt sein, um ein gutes Abbild der Realität zu bieten. Je nach verwendetem Kraftfeld und eingesetzter Membran sollte vorher eine Parameteroptimierung hinsichtlich der Berechnung weitreichender Wechselwirkungen stattfinden.

In unserem Fall ist die bessere Lösung, trotz etwas längerer Rechenzeit, die Verwendung von Ewald-Summen. Sie liefern über die gesamte Simulationsdauer die konsistenteren Werte als bei Simulation mit Cut-Off-Radien. Die hier verwendeten Parameter wurden von Anézo übernommen, da in dieser Publikation die Ergebnisse aus Simulation am besten mit experimentellen Daten für eine DPPC-Membran übereinstimmten. Der obige Vergleich zwischen experimentellen und simulierten Daten zeigt, dass bei Verwendung von PME mit den genannten Parametern die Realität gut widerspiegelt wird.

Bei den Simulation mit Benzol und Pyren in POPC-Membranen wurde ein Cut-Off-Radius von 1,8 nm eingesetzt, bei den Simulationen von TFB und TFB<sup>-</sup> in POPC-Membranen sowie bei allen Umbrella Sampling Simulationen wurde PME mit einem 1 nm – Cut-Off in der direkten Summe und einer Gitterweite von 0,12 ns zur Berechnung des Reziprokteils verwendet. Die Simulationszeit bei Verwendung von PME war im Vergleich mit Cut-Off-Simulationen etwa 1,3 mal so lang.

Die hier diskutierten Folgen, ob bei Verwendung von Cut-Offs oder PME, zeigen sich auch bei allen anderen Simulation. Bei der Interpretation der nachfolgenden Ergebnisse und dem Vergleich mit experimentellen Daten muss daher dieses Verhalten stets berücksichtigt werden.

# Kapitel 7

---

## Pyren

---

### 7.1 Einleitung

Von den untersuchten Systemen wurde das System Pyren in POPC mit Hilfe von Simulationen und Experimenten am umfassendsten charakterisiert. Neben verschiedenen unrestrictierten und restrictierten Simulationen bei den drei Temperaturen 285K, 300K und 315K wurden  $^2\text{H}$ -NMR Untersuchungen zur Orientierung von Pyren in POPC-Doppelschichten und zum Einfluss von Pyren auf die Kettenordnung gemacht.

Pyren in Phospholipid-Doppelschichten und Flüssigkristallen wurde bereits hinsichtlich verschiedener Aspekte experimentell untersucht. Shilstone et al. bestimmten, ähnlich unseren NMR-Versuchen molekulare Ordnungsparameter von Pyren in Flüssigkristallen (Shilstone, 1989). Neben NMR wurden vor allem Fluoreszenztechniken eingesetzt. Herrenbauer ermittelte mit Hilfe von Fluoreszenz-Quenching-Methoden den Aufenthaltsort von Pyren in einer POPC-Membran, sowie den Verteilungskoeffizienten von Pyren zwischen Wasser und einer Soja-PC-Membran (Herrenbauer, 2002). Des Weiteren wurde die Excimer-Lebensdauer und die Diffusionskonstanten von Pyren in DPPC-Liposomen bei verschiedenen Konzentrationen und Temperaturen aus dem Fluoreszenzsignal-Zerfall berechnet (Daems, 1985). Die laterale Diffusion von Pyren in DMPC-Doppelschichten wurde von durch Fluoreszenz-Selbst-Quenching Versuche untersucht (Martins, 2001).

Im Folgenden werden die Bewegung und Verteilung von Pyren in POPC-Membranen anhand der Ergebnisse von MD- und Umbrella Sampling Simulationen diskutiert und mit experimentellen Befunden verglichen. Aus der freien Enthalpie wurde ein Verteilungskoeffizient für Pyren in Wasser/Lipid-Doppelschichten ermittelt und Literaturwerten gegenübergestellt. Die Orientierung und Beweglichkeit von Pyren wird mit Hilfe von Simulationen und  $^2\text{H}$ -NMR untersucht, sowie die Frage geklärt, ob die Anwesenheit von Pyren in POPC-Membranen Auswirkungen auf die Struktur der Membran hat.

### 7.2 Material und Methoden

#### 7.2.1 Simulationen

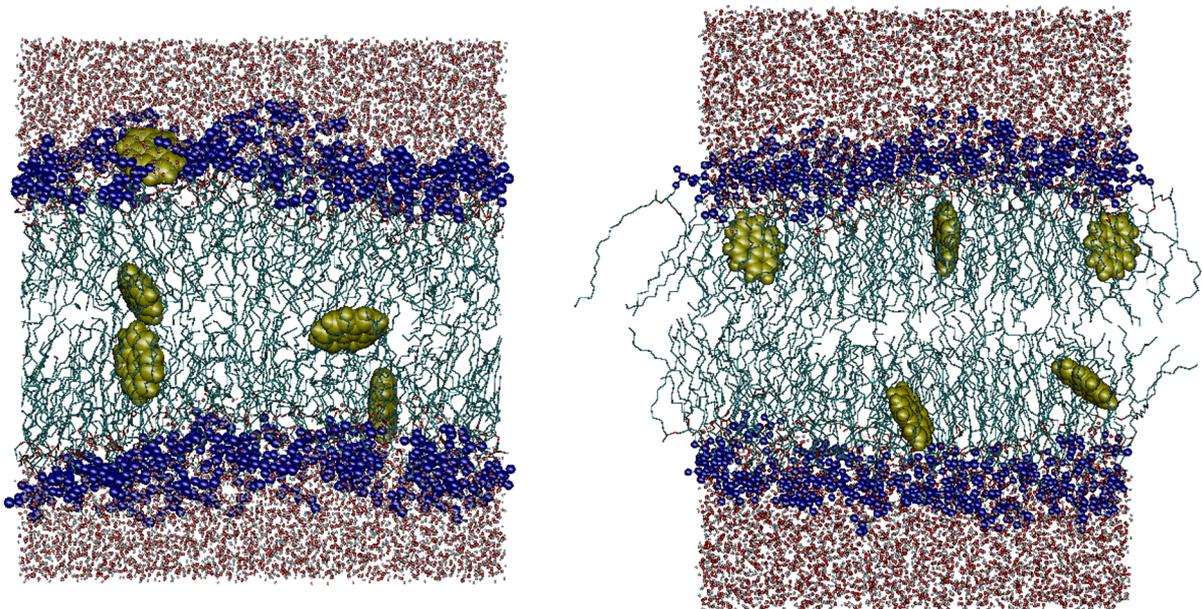
**Tabelle 7.1:** Durchgeführte Simulationen und ihre Parameter

Art	Molekül	Lipid	#Moleküle	Temperatur/K	Druck/bar	Länge/ns	Cut-Off	$R_c$ /nm
MD	Pyren	POPC	5	285	1	10	Cut-Off	1,8
MD	Pyren	POPC	5	300	1	25	Cut-Off	1,8
MD	Pyren	POPC	5	315	1	10	Cut-Off	1,8

Art	Molekül	Lipid	Kraft/ kJ/(mol*nm <sup>2</sup> )	Temperatur/K	Druck/bar	Anzahl/ Länge	Cut-Off	R <sub>c</sub> /nm
US	Pyren	POPC	3600	300	1	29/je 2ns	PME	1,0
US	Pyren	POPC	3600	285	1	29/je 2ns	PME	1,0
US	Pyren	POPC	3600	315	1	29/je 2ns	PME	1,0

Es wurden bei gleicher Ausgangskonfiguration drei unrestringierte MD-Simulationen bei den Temperaturen 285K, 300K und 315K durchgeführt. Die simulierte Zeit bei 285K und 315K war 10ns, die bei 300K 25ns. Ein Schnappschuss der Ausgangskonfiguration aller drei Simulationen und der Endkonfiguration nach 25ns bei 300K ist in Bild 7.1 zu sehen. Alle weiteren Parameter der Simulationen wurden bereits in Kapitel 6.2 beschrieben.

Bei den Umbrella Sampling Simulationen wurde ein Pyren-Molekül mittels eines harmonischen Potentials mit der Federkonstante  $K_s = 3600 \text{ kJ/mol/nm}^2$  in z-Richtung fixiert. Es wurden 29 Simulationen à 2ns durchgeführt, wobei das Molekül von Simulation zu Simulation mit einer Schrittweite von  $\Delta s = 0,125 \text{ nm}$  weitergeschoben wurde. Die Auswertung der Simulation erfolgte mit Perl-Skripten von MacCallum (Anhang A3), die Schrittweite der Histogramme war  $0,01 \text{ nm}$ , es wurden 10000 Iterationsschritte durchgeführt.



**Bild 7.1:** Ausgangskonfiguration der Pyren-Simulationen (links) und Enkonfiguration nach 25 ns bei 300 K (rechts). Die Wassermoleküle sind als weiß-rote Punkte dargestellt, die Atome der Kopfgruppen als blaue Kugeln und die Acylketten als türkisfarbene Ketten. Die Pyren-Moleküle sind mit van-der-Waals-Radien in Gelb zu sehen

## 7.2.2 $^2\text{H}$ - und $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektroskopie

### Probenvorbereitung

*Orientierung von Pyren in POPC:* Zur Herstellung orientierter Doppelschichten wurden 3,4mg Pyren- $d_{10}$  in 4ml Chloroform gelöst. 400 $\mu\text{l}$  dieser Lösung wurden zu 30,6mg POPC gegeben. Daraus ergibt sich eine molare Beladung von 0,04mol/mol. Dies entspricht der molaren Beladung der Doppelschichten in der Simulation. 20 dünne Glasplättchen mit den Abmessungen 18mm x 7,5mm x 0,08mm (Marienfeld Laboratory Glassware, Lauda-Königshofen) wurden mit der POPC/Pyren-Lösung benetzt und anschließend eine Stunde bei Luft und 12 Stunden unter Vakuum getrocknet. Um eine Reorientierung der Doppelschichten zu ermöglichen, wurden die getrockneten Glassplättchen 36h in einem Wärmeschrank bei 30°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 98 % über gesättigtem  $\text{K}_2\text{SO}_4$  gelagert. Bis zur Messung wurden sie in Parafilm gewickelt, um die Hydratisierung zu gewährleisten.

*Kettenordnungsparameter  $S_{CD}$  in Anwesenheit von Pyren:* Die Probenvorbereitung, sowie die Mengenangaben sind die gleichen wie im vorigen Abschnitt. Der Unterschied besteht darin, dass normales Pyren der Firma VWR (Darmstadt) verwendet wurde und teilweise deuteriertes POPC- $d_{10}$  von Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA).

### Versuchsdurchführung

Die NMR Experimente zur Bestimmung der Orientierung wurden in einem Bruker Avance 500 MHz NMR Spektrometer (Bruker Biospin, Karlsruhe) durchgeführt. Zur Überprüfung, ob orientierte Doppelschichten vorliegen, wurden  $^{31}\text{P}$  NMR Untersuchungen durchgeführt. Die Parameter und Auswertungen sind die gleichen, wie in Kapitel 6.2 beschrieben. Die Ergebnisse sind in Anhang A6 zu sehen.

Die  $^2\text{H}$ -NMR Experimente zur Untersuchung der Orientierung von Pyren in POPC wurden bei 76,77 MHz durchgeführt. Es wurde eine Quadrupolar Echo Sequenz nach Davis (Davis, 1976) angewendet, mit einem 4,5 $\mu\text{s}$  dauerenden  $90^\circ$  Puls eine Echo-Verzögerung von 30 $\mu\text{s}$  und einer Relaxationszeit von 200ms. Die Spektralweite betrug 500kHz, die Anzahl der Datenpunkte war 4096. 100000 Scans wurden gesammelt. Die Datenaufnahme wurde vor dem Echo gestartet und die Werte der Zeitdomäne entsprechend so weit nach links verschoben, dass der freie Induktionsabfall FID beim Echomaximum startet. Vor der Fouriertransformation wurde eine Nulladdition auf 16384 Datenpunkte und eine Multiplikation mit 200Hz durchgeführt.

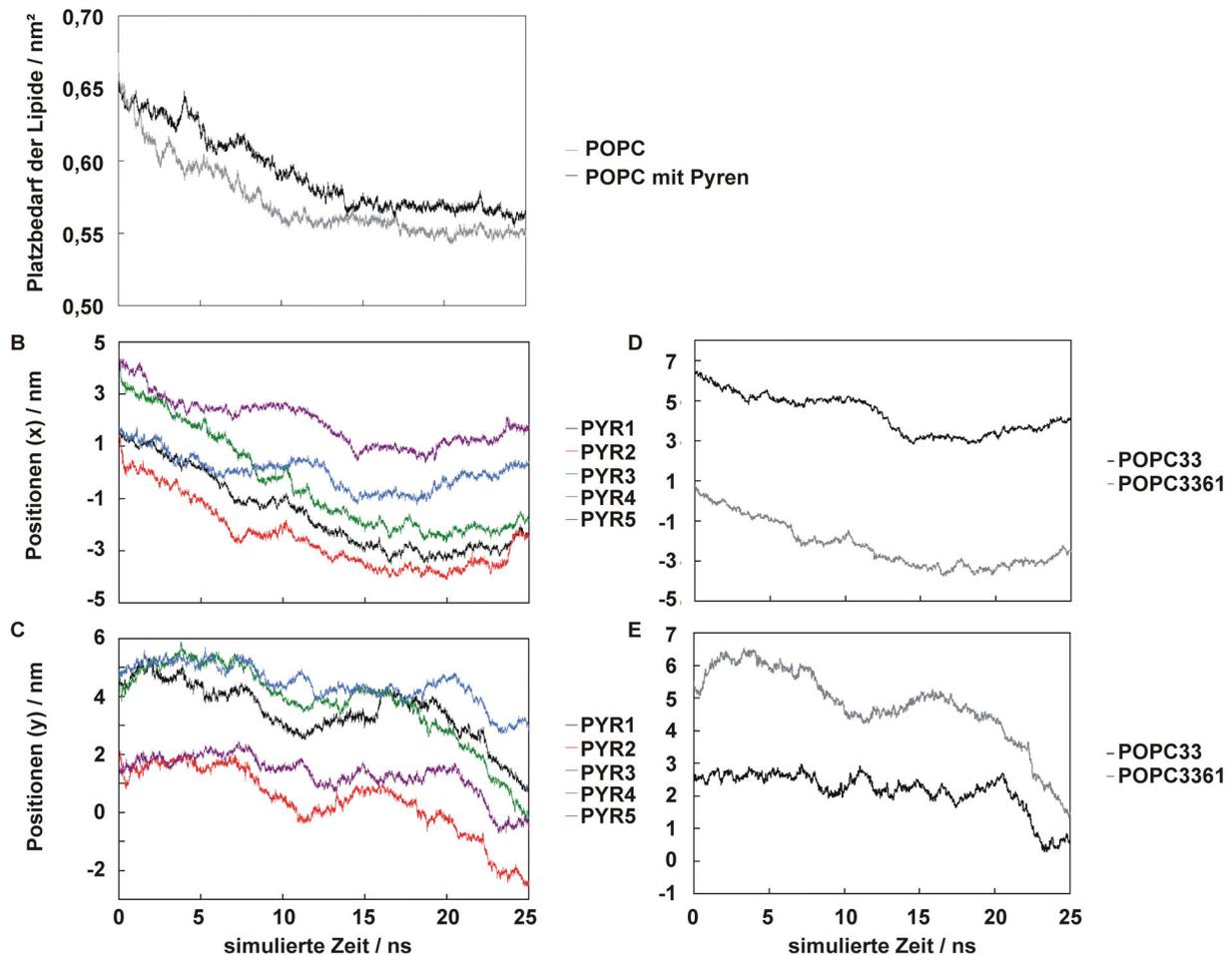
Die  $^2\text{H}$ -NMR Experimente zur Bestimmung des Kettenordnungsparameters  $S_{CD}$  wurden bereits in Kapitel 6.2 erläutert. Die Spektren und Werte sind in Anhang A5.1-3 aufgelistet.

## 7.3 Ergebnisse

### 7.3.1 Bewegung und Verteilung

Anhand der Simulation bei 300K wird die Bewegung der Moleküle in x- und y-Richtung, sowie der Platzbedarf der Kopfgruppen exemplarisch dargestellt (Bild 7.2). Die Verläufe bei 285K und 315K sind ähnlich. Während der Simulation kommt es zu einer Verkleinerung des Platzbedarfs der Lipide (7.2A), die Simulationsbox zieht sich in x- und y- Richtung zusammen und streckt sich in z-Richtung. Eine Konvergenz ist erst nach 15 ns zu erkennen.

A

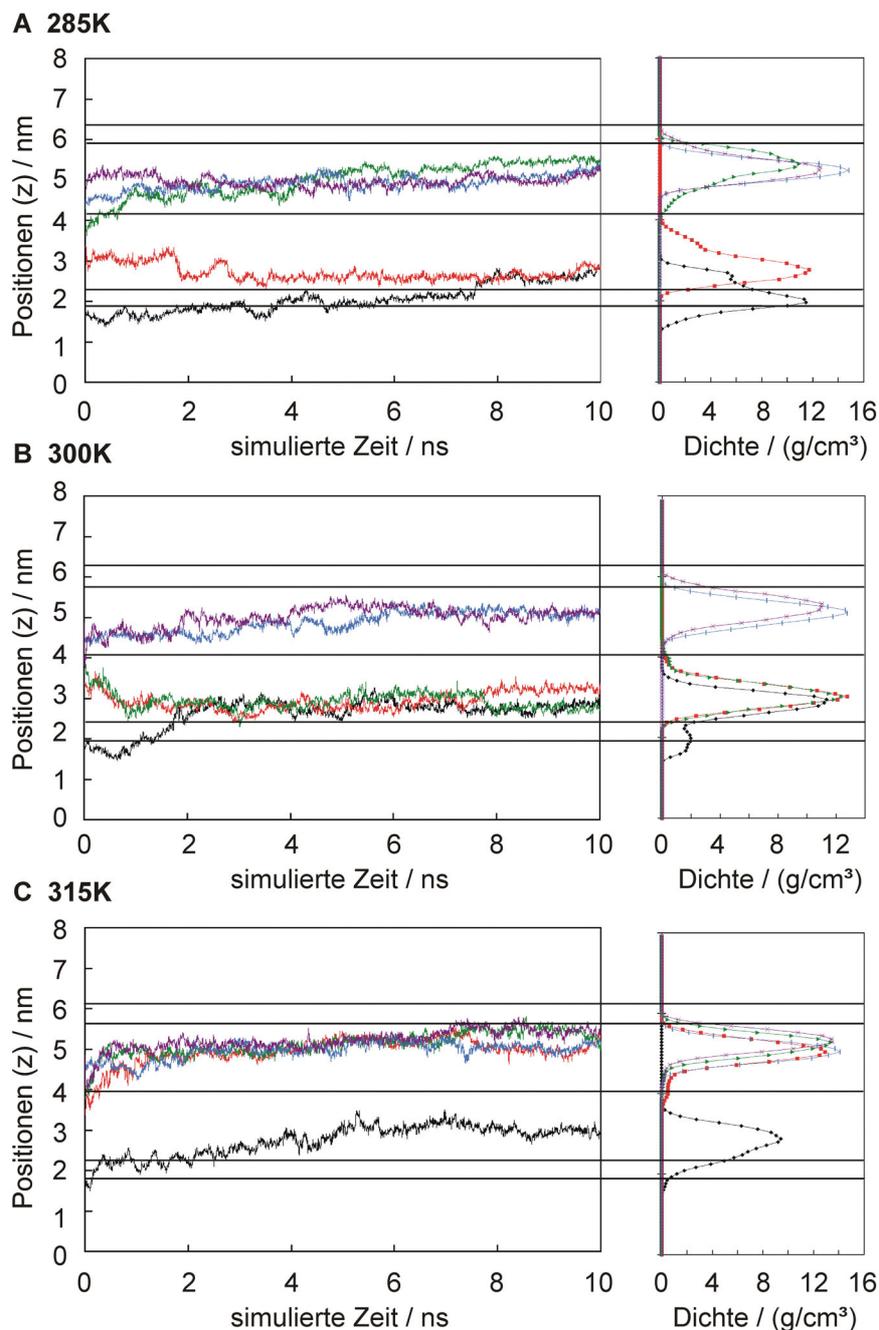


**Bild 7.2:** Links: A Platzbedarf der Lipide in nm<sup>2</sup>, Positionen der Molekülschwerpunkte von Pyren in x- (B) und y- (C) in nm, aufgetragen über die Simulationszeit in ns, bei einer simulierten Temperatur von 300K. Rechts: Positionen der Molekülschwerpunkte von je einem POPC-Molekül der beiden Membranhälften

Befinden sich die Pyren-Moleküle in der Membran, findet über die gesamte Simulationsdauer keine gerichtete Bewegung in x (7.2B)- und y (7.2C)- Richtung statt. Es kommt lediglich zu einer relativen Bewegung, die an die Bewegung der Lipid-Moleküle gekettet ist (Bild 7.2D und 7.2E). Dies erklärt die fast parallelen Positionsverläufe der fünf Pyren-Moleküle, die in x- und y-Richtung mit den Lipid-Molekülen mitgeschleppt werden.

Die Bewegung in z-Richtung (Bild 7.3) zeigt, dass unabhängig von der simulierten Temperatur das im Wasser platzierte Pyren zur Membran wandert und nach kurzem

Aufenthalt an der Außenseite der Kopfgruppen durch diese hindurch in den Soft-Polymer-Bereich diffundiert. Die Moleküle, die in der Membran verteilt waren, diffundieren ebenfalls in die äußeren Regionen des Soft-Polymer-Bereiches. Nach Erreichen dieser Region findet keine weitere Wanderung entlang der z-Achse (Membran-Normalen) statt. Während der gesamten Simulationszeit ist kein Diffundieren über die Membranzmitte hinweg in die andere Hälfte der Membran oder aus der Membran heraus zu beobachten.



**Bild 7.3:** Positionen der Molekülschwerpunkte entlang der z-Achse (links) und Dichte in g/cm<sup>3</sup> über die Positionen entlang der z-Achse (rechts) während der ersten 10 ns der Simulation bei einer Temperatur von 285K (A), 300K (B) und 315K (C). Zur besseren Orientierung sind die einzelnen Bereiche der simulierten Zelle entlang der z-Achse gekennzeichnet (Membranzmitte, Bereich der Kopfgruppen). Legende siehe Bild 7.2

Die Diffusion des außen platzierten Moleküls in das Innere der Membran ist temperaturabhängig (Bild 7.3, linke Hälfte). Bei 285K lagert sich das Molekül ca. 4 ns an den Kopfgruppen an und benötigt noch etwa 4ns zum Durchwandern der Kopfgruppen. Erst nach 8ns erreicht es seine Endposition in z-Richtung. Bei 300K ist das Pyren-Molekül nach etwa 2ns durch die Kopfgruppen in die Membran gewandert, bei 315K diffundiert es unmittelbar nach Start der Simulation zur Membran und durch die Kopfgruppen in die Soft-Polymer Region. Auch die innen platzierten Moleküle brauchen mit niedrigerer Temperatur länger, um ihre bevorzugte Position zu erreichen.

Hervorgehoben wird dieser Umstand beim Auftragen der Aufenthaltswahrscheinlichkeiten als Verteilung der Dichte der Moleküle über die z-Achse (Bild 7.3, rechte Hälfte). Je höher der Peak ist, desto häufiger was das Molekül an dieser Position anzutreffen. In der Membranmitte ist die Dichte der Pyren-Moleküle bei allen drei Temperaturen gleich Null.

Die bevorzugte Position innerhalb der Membran ist jedoch unabhängig von der simulierten Temperatur, wie Tabelle 7.2 zeigt. Nachdem keine gezielte Bewegung in z-Richtung mehr stattfindet, ist der normierte Abstand der Molekül-Schwerpunkte zur Membranmitte (gekennzeichnet durch die geringste Aufenthaltswahrscheinlichkeit der POPC-Moleküle) etwa 0,9-1,2nm.

**Tabelle 7.2:** auf die ursprüngliche Ausdehnung der Simulationsbox normierter Abstand in nm der Pyren-Schwerpunkte (aus der größten Aufenthaltswahrscheinlichkeit über die gesamten Simulationszeiten) zur Membranmitte. Die Membranmitte ist definiert durch die geringste Aufenthaltswahrscheinlichkeit der POPC-Moleküle

Temperatur /K	PYR1	PYR2	PYR3	PYR4	PYR5	Mittelwert
285	1,30*	1,16	1,16	1,01	1,09	1,14
300	1,01	0,94	0,94	0,94	1,16	1,00
315	1,08	0,87	1,08	0,87	1,08	1,00

\* hier wurden die größte Aufenthaltswahrscheinlichkeit der letzten 2 ns genommen

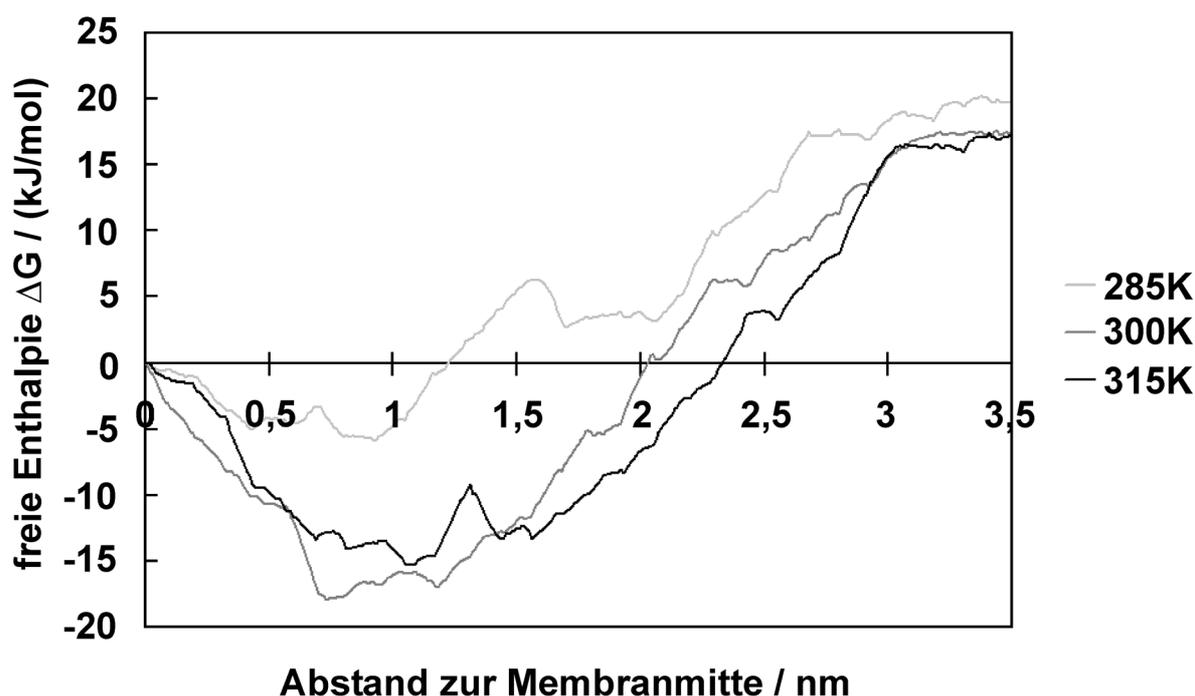
### 7.3.2 Freie Enthalpie $\Delta G$

Der Verlauf der freien Enthalpie  $\Delta G$  wurde aus Umbrella Sampling Simulationen bei 285K, 300K und 315K berechnet. Bild 7.4 zeigt das Profil der freien Enthalpie über die z-Achse einer halben Simulationszelle, wobei  $z = 0\text{nm}$  die Membranmitte und  $z = 3,5\text{nm}$  die Wasserphase darstellt. Da man lediglich Differenzen der freien Energie vergleichen kann, wurden die Werte willkürlich auf  $\Delta G = 0\text{kJ/mol}$  bei  $z = 0\text{nm}$  normiert. Im Bulk-Wasser ( $z = 3,5\text{nm}$ ) ist die freie Enthalpie am größten, die Werte liegen zwischen  $20\text{kJ/mol}$  bei 285K und  $17\text{kJ/mol}$  bei 315 K. Anhand der Enthalpie-Profile ist gut zu erkennen, dass der Bereich des Bulk-Wassers erst etwa  $3,2\text{nm}$  von der Membranmitte beginnt, nämlich dann, wenn kein Gradient in der freien Enthalpie mehr vorhanden ist.

Der Verlauf ist bei den drei Temperaturen ähnlich. Die freie Enthalpie fällt von der wässrigen Phase zum Bereich der Kopfgruppen ab, das Minimum findet sich  $0,7 - 1,1\text{nm}$  von der

Membranmitte entfernt, zur Membranmitte steigt die freie Enthalpie wieder an. Bei 285K gibt es im Bereich der Kopfgruppen einen leichten Anstieg, während bei 315K ein kleiner Peak im Bereich der Glycerin-Gruppen zu finden ist.

Die Differenz der freien Enthalpie  $\Delta G$  wurde zwischen der Bulk-Wasserphase ( $z = 3,5\text{nm}$ ) und der Membranmitte ( $z = 0\text{nm}$ ), sowie zwischen der Bulk-Wasserphase und dem Bereich des Enthalpie-Minimums ( $z = 1\text{nm}$ ) berechnet. Aus dem zweiten Wert wurde nach Gleichung 4.33 der Verteilungskoeffizient  $\log K_{M/W}$  ermittelt. Die Werte sind in Tabelle 7.3 zusammengefasst.



**Bild 7.4:** freie Enthalpie  $\Delta G$  (kJ/mol), berechnet aus Umbrella Sampling Simulationen mit je einem Pyren für eine Membranhälfte, aufgetragen über den Abstand zur Membranmitte ( $z = 0\text{nm}$ ) bei 285K, 300K und 315K

**Tabelle 7.3:** Differenzen der freien Enthalpie  $\Delta G$  aus Umbrella Sampling Simulationen bei verschiedenen Temperaturen, sowie die daraus berechneten Verteilungskoeffizienten, verglichen mit experimentellen Daten

	285 K	300 K	315 K
$\Delta G_{m/w}^*$	-19,8	-17,3	-17,3
$\Delta G_{b/w}$	-24,5	-33,4	-31,3
$\Delta G_{m/b}$	4,8	16,1	14,1
$\log K_{M/W}(b/w)$	4,5	5,8	5,2
$\log K_{M/W,exp}$		7,1 <sup>a</sup>	
$\log K_{O/W}$		5,3 <sup>b</sup>	

\*M: Membran; m: Membranmitte,  $z = 0\text{ns}$ , w: Bulk-Wasser,  $z = 3,5\text{nm}$ , b: bevorzugter Aufenthaltsort; M: Membran; O: Oktanol; <sup>a</sup>Herrenbauer, 2002; <sup>b</sup>Sims, 1983

### 7.3.3 Orientierung der Pyren-Moleküle

#### *Ausrichtung der CH-Bindungen bezüglich der Membrannormalen – $S_{CD}$*

Die Orientierungsparameter, die man aus NMR-Untersuchungen erhält, erlauben Aussagen über die Orientierung der C-H-Bindung bezüglich der Membrannormalen. Um einen direkten Vergleich der Ergebnisse aus den Simulationen mit den NMR-Daten zu erhalten, wurde daher die Ausrichtung der einzelnen C-H-Bindungen der Moleküle bezüglich der z-Achse berechnet. Es gibt fünf verschiedene Paare von C-H-Bindungen in einem Pyren-Moleküle (siehe Bild 7.5), 1/1', 2/2', 3/3', 2''/2'''', and 3''/3'''. Die Orientierungsparameter  $S_{CD}$  der Bindung 1/1' werden zu  $S_{CD}^{\alpha}$  zusammengefasst. Aus Geometrie Gründen ist der  $S_{CD}$ -Wert der Positionen 2/2' und 3/3' fast identisch und kann daher zu einem Parameter  $S_{CD}^{\beta}$  zusammengefasst werden. Gleiches gilt für die Positionen 2''/2'''' und 3''/3''', die einen Parameter  $S_{CD}^{\gamma}$  ergeben. Eine Rotation des Moleküls um die Normale zur Molekülebene beeinflusst diese drei Parameter nicht. Eine Rotation um die Längsachse des Moleküls (der 1/1'-Achse) würde die Parameter  $S_{CD}^{\beta}$  und  $S_{CD}^{\gamma}$  vertauschen, daher werden die Parameter  $S_{CD}^{\beta}$  und  $S_{CD}^{\gamma}$  zu einem gemeinsamen Parameter  $S_{CD}^{\delta}$  zusammengefasst.

Um diese Zusammenfassung abzusichern, wurde die Rotationsbewegungen vom Pyren mit Hilfe des Drehwinkels um die Längsachse analysiert. Die Diagramme sind in Anhang A7.1 aufgelistet. Pyren rotiert, unabhängig von seiner Lage, ununterbrochen um seine eigene Längsachse, was die Zusammenfassung der 2/3-Parameter rechtfertigt.

Für jede C-H-Bindung im Pyren-Molekül wurde  $S_{CD}$  bestimmt und über drei verschiedene Zeiten, nämlich 5-10ns, 10-15ns und 15-25ns gemittelt (Tabelle 7.5). Die gemittelten Werte über die letzten 10ns für die Simulation bei 300K sind in Tabelle 7.4 aufgelistet.

**Tabelle 7.4:** Werte für  $\langle S_{CD} \rangle$ , gemittelt über die letzten zehn Nanosekunden der Simulation (15-25 ns) für alle C-H Bindungen der fünf einzelnen Pyren-Moleküle. Die letzte Spalte  $\langle\langle S_{CD} \rangle\rangle$  zeigt die Mittelwerte  $S_{CD}^{\alpha}$ ,  $S_{CD}^{\beta}$ ,  $S_{CD}^{\gamma}$  und  $S_{CD}^{\delta}$ , welche die Mittelwerte der geometrisch gleichen Typen von C-H-Bindungen darstellen

CH-Bindung	$\langle S_{CD\_PYR1} \rangle$	$\langle S_{CD\_PYR2} \rangle$	$\langle S_{CD\_PYR3} \rangle$	$\langle S_{CD\_PYR4} \rangle$	$\langle S_{CD\_PYR5} \rangle$	$\langle\langle S_{CD} \rangle\rangle$	
1	0.34	0.22	0.43	0.23	0.27	$S_{CD}^{\alpha}$	0.30
1'	0.34	0.22	0.43	0.23	0.28		
2	0.16	0.22	0.19	0.01	0.15	$S_{CD}^{\beta}$	$S_{CD}^{\delta}$
2'	0.16	0.21	0.19	0.02	0.14		
3	0.15	0.21	0.18	0.01	0.14		
3'	0.16	0.21	0.18	0.01	0.14		
2''	0.05	0.11	-0.03	0.29	0.01	$S_{CD}^{\gamma}$	0.11
2'''	0.05	0.11	-0.04	0.28	0.01		
3''	0.05	0.12	-0.04	0.28	0.00		
3'''	0.05	0.11	-0.04	0.28	0.00		

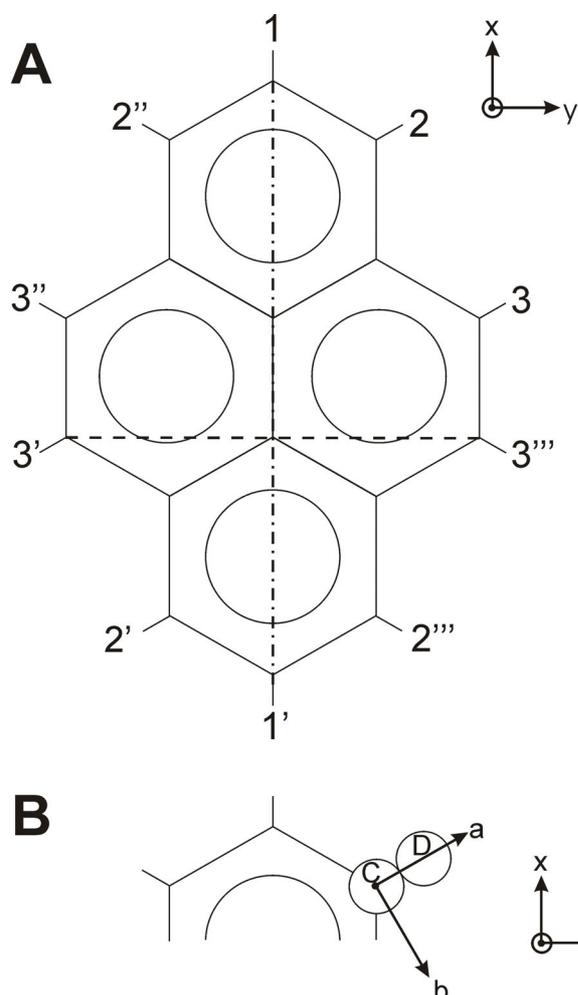
**Tabelle 7.5:** Die Parameter  $S_{CD}^{\alpha}$  and  $S_{CD}^{\delta} = \langle S_{CD}^{\beta}; S_{CD}^{\gamma} \rangle$ , berechnet aus der Simulation bei 300K, gemittelt über drei verschiedenen Zeitspannen und verglichen mit den  $S_{CD}^A$  and  $S_{CD}^B$  aus den NMR-Experimenten

	5-10 ns	10-15 ns	15-25 ns	NMR*	
$S_{CD}^{\alpha}$	0.42	0.35	0.30	$S_{CD}^A$	$\pm 0.32$
$S_{CD}^{\delta}$	0.06	0.10	0.11	$S_{CD}^B$	$\pm 0.14$

\* Mit  $^2\text{H-NMR}$  können nur absolute Werte bestimmt werden

### Der Ordnungstensor von Pyren

Ordnungstensoren beschreiben die Ausrichtung interner Molekülachsen bezüglich eines äußeren Koordinatensystems. Sie bestehen aus drei Parametern,  $S_{XX}$ ,  $S_{YY}$  und  $S_{ZZ}$ . Bei einem symmetrischen Molekül wie Pyren ist es einfach, drei interne Achsen zu definieren, die jeweils senkrecht zueinander stehen (Bild 7.5).  $S_{XX}$  ist entlang der 1/1'-Verbindung festgelegt,  $S_{YY}$ , entlang der 3'/3'''-Verbindung und  $S_{ZZ}$  ist die Normale zur Ringebene. Alle drei Parameter können mit Hilfe der Vektoranalyse berechnet werden. Zur Berechnung von  $S_{ZZ}$  ( $S_N$ ) kann auch das in Kapitel 4.10.4.3 beschriebene Programm `p_aroma` eingesetzt werden. Die Ergebnisse für 300K, gemittelt die letzten 10ns (15-25ns) der Simulation sind in Tabelle 7.7 aufgelistet.



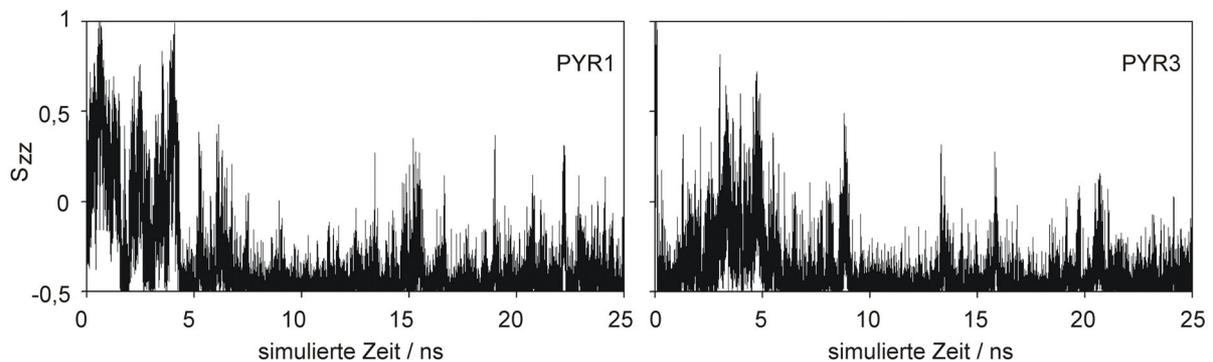
**Bild 7.5:** (A) Die zehn verschiedenen C-H Bindungen von Pyren, bzw. die zehn deuterierten Atome des Pyren- $d_{10}$  Moleküls. Während in der Simulation jede C-H-Bindung unterscheidbar ist, sind in den NMR-Untersuchungen nur die Bindungen 1, 2 und 3 chemisch unterscheidbar

Das interne  $xyz$ -Koordinatensystem des Pyren-Moleküls wurde wie folgt festgelegt:  $\cdot - \cdot -$  die  $x$ -Achse verläuft entlang der 1/1'-Geraden zur Berechnung von  $S_{xx}$ ,  $----$  die  $y$ -Achse verläuft entlang der 3'/3'''-Geraden zur Berechnung von  $S_{yy}$  die  $z$ -Achse zeigt aus der Bildebene heraus und steht senkrecht auf  $x$  und  $y$

(B) Das Quadrupol-Koordinatensystem  $abc$  wird für die Position 2 exemplarisch dargestellt. Die  $a$ -Achse verläuft entlang der C-D-Bindung, die  $b$ -Achse steht senkrecht dazu und die  $c$ -Achse verläuft parallel zur  $z$ -Achse und zeigt aus der Bildebene heraus

### Orientierung der Pyren-Ringebene bezüglich der Membrannormalen – $S_{ZZ}$

Mit dem Parameter  $S_{ZZ}$  kann die Ausrichtung der Ringebene zur Membrannormalen sehr anschaulich beschrieben werden. Ist  $S_{ZZ}=-0,5$  ist die Ringebene parallel zur z-Achse ausgerichtet, ist  $S_{ZZ}=1$ , steht die Ringebene senkrecht zur z-Achse. In Bild 7.6 sind die Werte für  $S_{ZZ}$  der Pyren-Moleküle PYR1 und PYR3 bei 300K zu sehen. Solange PYR1 außerhalb der Membran in der wässrigen Phase ist (0-4ns), kann es frei um alle Achsen rotieren, es werden alle Werte zwischen  $-0,5$  und  $1$  angenommen. Innerhalb der Membran ist die Beweglichkeit stark eingeschränkt, die Werte liegen hauptsächlich zwischen  $-0,3$  und  $-0,5$ . Die Moleküle richten sich mit der Ringebene vorzugsweise parallel zur z-Achse aus.



**Bild 7.6:** Orientierungsparameter  $S_{ZZ}$  von PYR1 und PYR3 bei 300K über die simulierte Zeit in ns

In Tabelle 7.6 sind die zeitlichen Mittelwerte von  $S_{ZZ}$  für alle Pyren-Moleküle bei den drei Temperaturen zusammengefasst. Gemittelt wurde über die letzten 5 ns für 285K und 315K und über die letzten 10ns für 300K.

**Tabelle 7.6:** Zeitliche Mittelwerte von  $S_{ZZ}$  bei den drei simulierten Temperaturen 285K, 300K und 315K

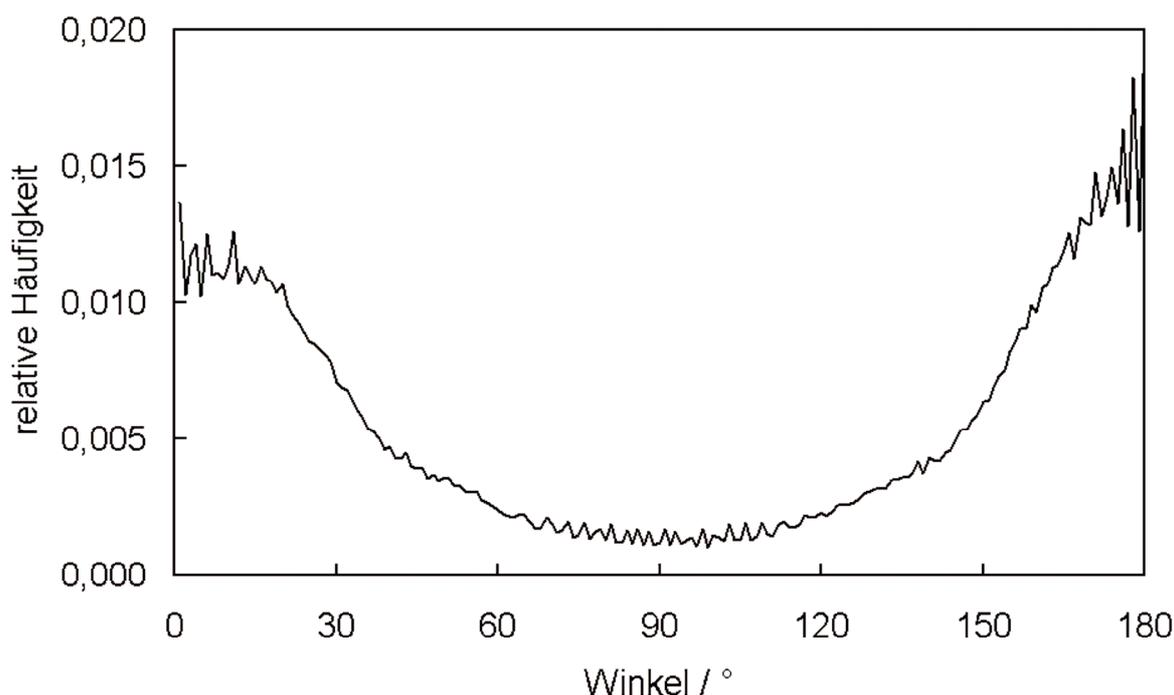
Temperatur / K	PYR1	PYR2	PYR3	PYR4	PYR5	Gemittelte Zeit
285	0,30	-0,37	-0,38	-0,03	-0,35	5-10 ns
300	-0,43	-0,41	-0,44	-0,40	-0,33	15-25 ns
315	-0,40	-0,28	-0,33	-0,36	-0,42	5-10 ns

### Orientierung der Pyren-Längsachse bezüglich der Membrannormalen – $S_{XX}$

Der Parameter  $S_{XX}$  beschreibt die Ausrichtung der Molekül-Längsachse bezüglich der Membran-Normalen. Anschaulich betrachtet bedeutet ein Wert  $S_{XX} = 1$ , dass alle Pyren-Moleküle über die gesamte Simulationszeit starr entlang der Membrannormalen ausgerichtet sind, also nur die Winkel  $0^\circ$  oder  $180^\circ$  einnehmen. Zum besseren Verständnis wurde in Bild 7.7 die normalisierte Häufigkeitsverteilung des Winkels bei 300K, (nicht des daraus

berechneten Parameters  $S_{XX}$ !) zwischen der Längsachse und der Membrannormalen aufgetragen, wobei die Werte aller Pyren-Moleküle über die gesamte Simulationszeit in Betracht gezogen wurden. Da der zu einem Winkel gehörender Vektor eine unterschiedlich große kreisförmige Projektionsfläche abdeckt, würden große Winkel höher gewichtet werden als kleine Winkel. Diese Gewichtung wird dadurch korrigiert, dass die Häufigkeiten durch den Sinus der Histogramm-Mitte geteilt werden.

Am häufigsten werden Winkel zwischen  $0^\circ$  und  $30^\circ$ , bzw.  $150^\circ$  und  $180^\circ$  gefunden. Die Längsachse des Pyren-Moleküls ist vorzugsweise parallel zur Membrannormalen ausgerichtet, mit einem Spielraum von  $\pm 30^\circ$ .



**Bild 7.7:** normalisierte relative Häufigkeit der Winkel zwischen der Längsachse der Pyren-Moleküle ( $1/1'$ ) und der z-Achse des Systems bei 300 K. Es wurden die Daten aller Pyren-Moleküle über die gesamte Simulationszeit in Betracht gezogen

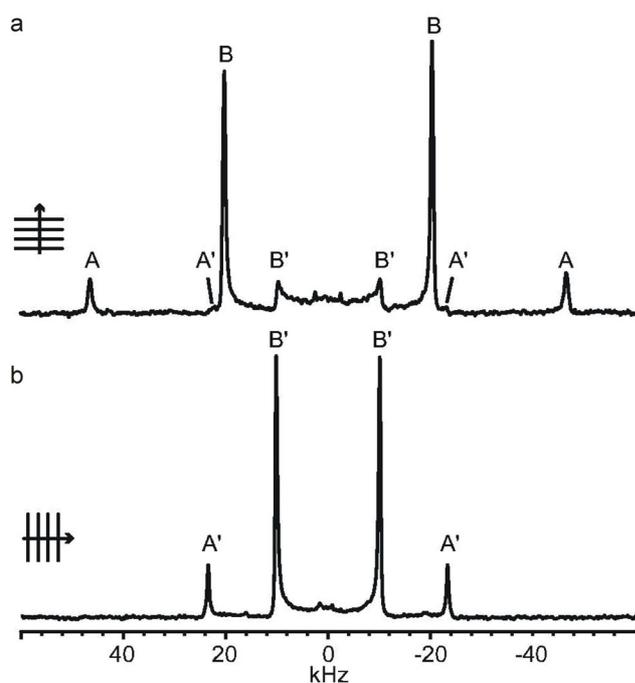
**Tabelle 7.7:** Elemente des Ordnungstensors der einzelnen Pyren-Moleküle, gemittelt über die letzten 10ns (15-25ns) der Simulation. Die letzte Spalte zeigt das Ergebnis des Ordnungstensors aus dem NMR-Versuch. Grau unterlegt sind die Werte, die man aus Simulation und NMR-Untersuchung direkt vergleichen kann

Tensorelement	PYR1	PYR2	PYR3	PYR4	PYR5	Mittelwert	NMR
$S_{XX}$	0,38	0,25	0,47	0,25	0,31	0,33	
$S_{YY}$	0,05	0,17	-0,02	0,14	0,02	0,07	
$S_{ZZ}$	-0,43	-0,41	-0,44	-0,40	-0,33	-0,40	-0,42
$S_{XX}-S_{YY}$	0,34	0,08	0,49	0,11	0,29	0,26	0,25

<sup>2</sup>H-NMR-Untersuchung zur Orientierung von PyrenOrdnungsparameter  $S_{CD}^A$  und  $S_{CD}^B$ 

In Bild 7.8 ist das Deuterium-Spektrum von Pyren- $d_{10}$  in POPC bei 300K zu sehen, in 7.8a ist die Membrannormale parallel zum Magnetfeld ausgerichtet, in 7.8b senkrecht dazu. In Bild a sind vier Quadrupolar-Aufsplittungen zu erkennen, die mit A, A', B und B' bezeichnet wurden, wobei die Peakfläche von A' und B' jeweils etwa die Hälfte der Peakfläche von A, bzw. B ausmacht. In Bild b sind zwei Quadrupolar-Aufsplittungen unterscheidbar, A' und B'.

Ist die Probe parallel zum Magnetfeld ausgerichtet, können die Peaks dem orientierten (Peaks A und B) und dem unorientierten Anteilen der Probe (Peaks A' und B') zugeordnet werden. Ist die Probe senkrecht zum Magnetfeld ausgerichtet, fallen die Peaks des orientierten und des unorientierten Anteils zusammen, so dass nur zwei Dublette (A' und B') zu unterscheiden sind. Daher kann man von zwei verschiedenen Deuterium-Bindungen ausgehen, die zwei Quadrupolar-Aufsplittungen von 93kHz (A) und 20kHz (B) ergeben.



**Bild 7.8:** <sup>2</sup>H-NMR Spektrum einer orientierten Probe von Pyren- $d_{10}$  in POPC  
a: Membrannormale ist parallel zum äußeren Magnetfeld orientiert; b: Die Membrannormale ist senkrecht zum äußeren Magnetfeld orientiert

Aufgrund der Symmetrie des Pyren-Moleküls gibt es drei chemisch unterscheidbare Deuterium-Bindungen, 1, 2 und 3. Aus Bild 7.5 geht hervor, dass 2 und 2', sowie 3 und 3' parallel angeordnet sind und deshalb eine Aufspaltung ergeben. Das gleiche gilt für 2'', 2''', 3'' und 3''', sowie für 1 und 1'. Theoretische erwarten wir also 3 verschiedene Aufsplittungen mit den relativen Intensitäten 1:2:2 (für 1/1':2/2'/3/3':2''/2'''/3''/3''').

Im <sup>2</sup>H-NMR-Spektrum sind jedoch nur zwei Aufsplittungen mit den relativen Intensitäten 1:5 zu erkennen. Die Quadrupol-Aufspaltung ist zusätzlich von der räumlichen Ausrichtung der C-D-Bindungen abhängig, weshalb man aus Geometrie-Gründen für die Positionen 2 und 3 eine Aufspaltung erwartet. Die Aufspaltung A stammt also von den Deuterium-Bindungen 1/1' und die Aufspaltung B von allen anderen Deuterium-Bindungen, vorausgesetzt das Molekül rotiert um seine Längsachse (x-Achse), so dass zum Beispiel die Positionen 2 und

2'' in der gleichen Aufspaltung ausgemittelt werden, dann würde man theoretisch relative Intensitäten von 1:4 erwarten. Die leicht reduzierte Aufspaltungs-Intensität von A stammt möglicherweise aus dem Anregungsprofil, der nicht-ideale 90°-Puls (4,5µs) führt zu einer etwas reduzierten Intensität des äußersten Signals.

Nimmt man  $Q_{CC} = 193$  kHz an (Rowell, 1965), kann man aus Gleichung 5.16 einen Ordnungsparameter  $S_{CD}^A = 0,32$  für Aufspaltung A und  $S_{CD}^B = 0,14$  für Aufspaltung B berechnen.

### Ordnungstensor S

Des Weiteren wurden die Elemente des Ordnungstensors für Pyren in POPC berechnet. Für Pyren in Flüssigkristallen wurde bereits eine Gleichung hergeleitet, welche den Zusammenhang zwischen der Quadrupol-Aufspaltung und den Elementen eines Ordnungstensors herstellt (Shilstone, 1989, Emsley, 1975)

$$\Delta\nu_q^i = \frac{3}{4} q_{aa}^i \{S_{zz} (\eta^i - 1) + (S_{xx} - S_{yy}) [l_{xa}^{i2} - l_{ya}^{i2} + \frac{1}{3} \eta^i (l_{xb}^{i2} - l_{yb}^{i2})]\} \quad (7.1)$$

Das xyz-Koordinatensystem ist in Bild 7.5A, das abc-Quadrupol-Koordinatensystem ist für das Deuterium an Position 2 in Bild 7.5B veranschaulicht. Letzteres wird zur Berechnung des Quadrupol-Wechselwirkungstensors benötigt. Die Koordinatensysteme wurden beide so gewählt, dass Ordnungstensor und Quadrupol-Wechselwirkungstensor spurlos sind. Daher existieren lediglich zwei unabhängige Elemente des Ordnungstensors. Der Quadrupol-Wechselwirkungs-Tensor für ein Deuterium-Atom i ist über die Kopplungskonstante  $q_{aa}^i$  und den Asymmetrie-Parameter  $\eta^i$  definiert. Diese können für die verschiedenen Deuterium-Positionen prinzipiell unterschiedliche Werte annehmen, in diesem Fall sind sie jedoch für alle Positionen gleich. Der Asymmetrie-Parameter ist  $\eta^i = 0,06$  (Shilstone, 1989) und die Kopplungskonstante  $q_{aa}^i$  hat den gleichen Wert wie  $Q_{CC}$ , nämlich 193kHz.  $l^i$  ist der gerichtete Kosinus zwischen den beiden Koordinatensystemen und ist definiert als  $l_{xa}^{i2} = \cos^2 \theta_{xa}^i$ , mit dem Winkel  $\theta_{xa}^i$  zwischen der molekularen x-Achse und der a-Achse des Deuterium-Atoms i. Aus Bild 7.5B ist erkennbar, dass für das Deuterium an Position 1 die a-Achse entlang der C-D-Bindung verläuft, was zu  $l_{xa}^{1,2} = 1$  und  $l_{ya}^{1,2} = 0$  führt. Für das Deuterium am Position 2/3 ist der Winkel zwischen der a- und x-Achse ca. 60° und zwischen der a- und der y-Achse etwa 30°. Die Splittings erhält man aus den NMR-Daten. Sie werden zusammen mit allen anderen Daten in Gleichung 7.1 eingesetzt. Mit den vorgegebenen Werten erhält man zwei Gleichungen mit zwei Unbekannten. Löst man diese, erhält man vier mögliche Lösungen, welche von Vorzeichen der zwei Aufspaltungen abhängen. Die sinnvollen Lösungen sind die, bei denen beide Aufspaltungen positiv gesetzt werden, es ist dann  $S_{zz} = -0,42$  und  $(S_{xx} - S_{yy}) = 0,25$ .

### **7.3.4 Der Einfluss von Pyren auf die Membran – Kettenordnungsparameter $S_{CD}$**

Wie schon in Kapitel 6.2 angesprochen, hat der Platzbedarf einen sehr großen Einfluss auf die Kettenordnung. Daher ist es nicht möglich, Kettenordnungsparameter von nicht-beladenen

und beladenen Membranen oder von Membranen bei verschiedenen Temperaturen zu vergleichen, solange sich der Platzbedarf noch signifikant ändert. Da bei den Simulationen mit 285K und 315K kein stationärer Zustand der Kettenordnung erreicht wird, können hier keine simulierten Werte untereinander oder mit experimentellen Daten verglichen werden, da dies zwangsläufig zu Missinterpretationen führt. Lediglich die Simulation bei 300K kann zum Vergleich herangezogen werden.  $S_{CD}$  wurde aus der Simulation bei 300K (Bild 7.9) und aus  $^2\text{H-NMR}$ -Versuchen (Tabelle 7.8) bei 285K, 300K und 315K bestimmt.

**Tabelle 7.8:** Vergleich der Kettenordnungsparameter  $S_{CD}$  in Ab- und Anwesenheit von Pyren aus den  $^2\text{H-NMR}$ -Versuchen bei 285K, 300K und 315K\*

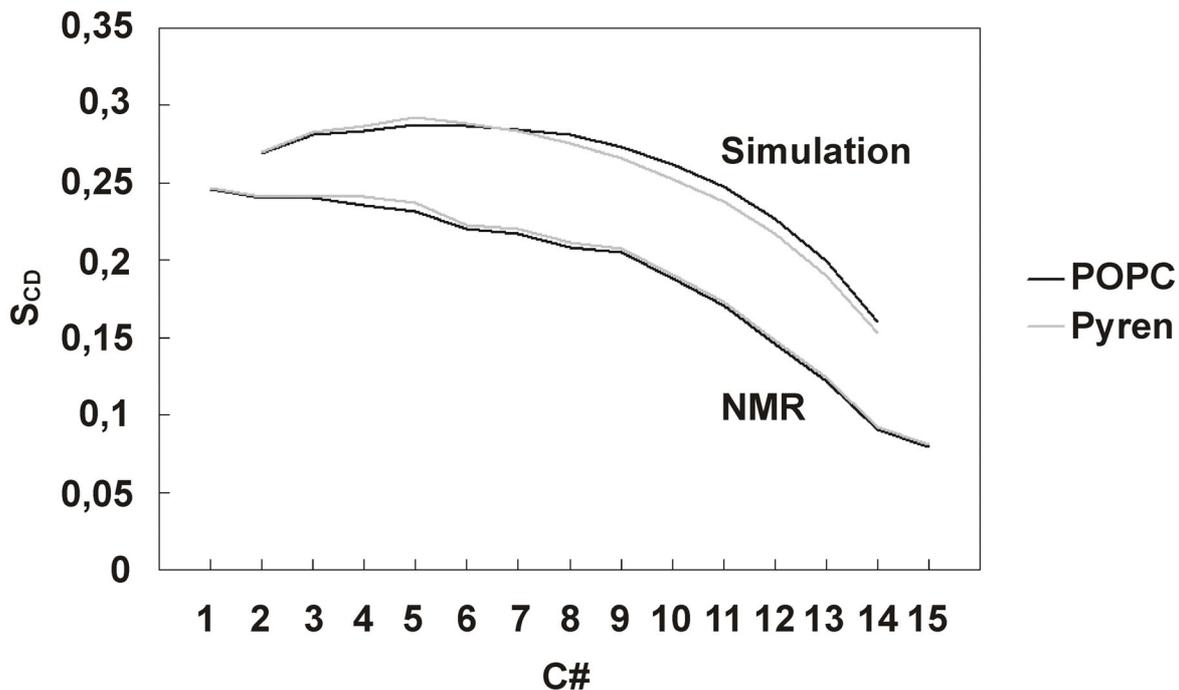
C#	285K			300K			315K		
	$S_{CD\_POPC}$	$S_{CD\_Pyren}$	$\Delta S_{CD}$	$S_{CD\_POPC}$	$S_{CD\_Pyren}$	$\Delta S_{CD}$	$S_{CD\_POPC}$	$S_{CD\_Pyren}$	$\Delta S_{CD}$
1	0,259	0,259	0,000	0,246	0,247	0,000	0,236	0,235	-0,001
2	0,250	0,251	0,000	0,240	0,241	0,001	0,229	0,229	0,000
3	0,250	0,251	0,000	0,240	0,241	0,001	0,229	0,229	0,000
4	0,250	0,247	-0,004	0,236	0,241	0,005	0,225	0,225	0,000
5	0,236	0,237	0,002	0,232	0,237	0,005	0,220	0,225	0,005
6	0,236	0,237	0,002	0,220	0,222	0,002	0,208	0,208	0,000
7	0,224	0,225	0,001	0,217	0,220	0,003	0,206	0,205	0,000
8	0,224	0,225	0,001	0,208	0,211	0,003	0,197	0,197	0,000
9	0,218	0,215	-0,003	0,205	0,207	0,002	0,194	0,197	0,003
10	0,202	0,205	0,002	0,188	0,190	0,002	0,176	0,177	0,001
11	0,185	0,187	0,003	0,170	0,173	0,002	0,158	0,160	0,001
12	0,159	0,161	0,003	0,146	0,148	0,002	0,135	0,136	0,001
13	0,133	0,136	0,002	0,122	0,124	0,002	0,112	0,113	0,001
14	0,099	0,101	0,002	0,090	0,092	0,002	0,083	0,084	0,001
15	0,088	0,090	0,002	0,079	0,081	0,001	0,072	0,073	0,001

\* Die dazugehörigen Spektren und Aufsplittungen sind in Anhang A5.1-3 aufgelistet

Der Verlauf von  $S_{CD}$  über die Kohlenstoffatome der gesättigten Acylkette ist sowohl für MD-Simulationen und NMR, als auch für die verschiedenen Temperaturen prinzipiell ähnlich. Die höchsten Werte des Kettenordnungsparameters  $S_{CD}$  sind Bereich bis zum sechsten Kohlenstoff zu finden. Danach findet ein starker Abfall der Kettenordnung zur Membranmitte hin statt.

Die Ergebnisse aus den  $^2\text{H-NMR}$ -Versuchen zeigen (Tabelle 7.8), dass die Anwesenheit von Pyren keinen signifikanten Einfluss auf die Kettenordnung hat. Insgesamt wird die Ordnung der Ketten leicht erhöht, bei 300K und 315K kommt es zu einer etwas größeren Kettenordnung im Bereich des vierten und fünften Kohlenstoffatoms. Vergleicht man die verschiedenen Temperaturen, zeigt sich dass mit höheren Temperaturen die Kettenordnung deutlich abnimmt.

Die Simulation bei 300K zeigt ein sehr ähnliches Bild. Die Kettenordnung wurde für den Zeitraum 15-25ns bestimmt, also dem Zeitraum, bei dem sich der Platzbedarf nicht mehr nennenswert ändert. Ein Vergleich mit den  $S_{CD}$ -Werten der Simulation mit purem POPC bei 300K über den gleichen Zeitraum zeigt, dass auch hier die Anwesenheit von Pyren kaum eine Auswirkung auf die Kettenordnung hat (Bild 7.9). Lediglich im Bereich des vierten und fünften C-Atoms findet sich eine etwas höhere Kettenordnung in Anwesenheit von Pyren.



**Bild 7.9:** Kettenordnungsparameter S<sub>CD</sub> der gesättigten Acylkette aus der Simulation bei 300K, gemittelt von 15-25ns und aus NMR-Daten bei 300K

#### 7.4 Diskussion

##### *Diffusion aus der wässrigen Phase in die Membran und Verteilungskoeffizienten*

Der Eintritt in die Kopfgruppen, bzw. die Diffusion durch die Kopfgruppenregion scheint mit steigender Temperatur begünstigt zu werden. Die Verteilungsdichte des Pyren-Moleküls PYR1, welches außerhalb platziert war, zeigt bei 285K den höchsten Peak im Bereich der Kopfgruppen. Es braucht fast 8ns, um in und durch die Kopfgruppen zu diffundieren. Bei 300K ist der Peak deutlich kleiner, das Pyren-Molekül ist nach 5ns in der Soft-Polymer-Region. Bei 315K ist kein Peak im Bereich der Kopfgruppen erkennbar, das Molekül ist bereits nach 3,5ns durch diese Region gewandert.

Die freie Enthalpie  $G$  in der wässrigen Phase nimmt mit steigender Temperatur ab. Da gilt, dass  $G=H-TS$  und  $H$  annähernd als konstant angenommen werden kann ( $H$  ist abhängig von Volumen und Druck, der Druck wurde konstant gehalten und das Volumen der simulierten Zelle bei 285K und 315K verändert sich gegenüber der Simulation von 300K lediglich um +/- 0,5%), nimmt der Entropieanteil an der freien Enthalpie mit steigender Temperatur ab. Im Allgemeinen wird die Diffusion von hydrophoben Stoffen aus einer wässrigen in eine hydrophobe Phase als entropiegetrieben betrachtet. Die „Entropiestrafe“ durch ihre Anwesenheit in Wasser treibt diese Stoffe in die polare Phase (Haymet, 1996). Mit Entropiestrafe ist gemeint, dass sich die Wassermoleküle so um das hydrophobe Molekül arrangieren müssen, dass sie möglichst viele Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden, was zu einer nicht mehr zufällig ausgerichteten Wasserstruktur um das gelöste Molekül führt (oft

auch als Clathrat-Hülle bezeichnet) und so die Entropie des Gesamtsystems herabgesetzt wird.

Der Verteilungskoeffizient ist eine charakteristische Stoffgröße, welche die Verteilung eines Stoffes zwischen einer öligen und einer wässrigen Phase beschreibt. Da er meist mehrere Zehnerpotenzen umfasst, wird er in logarithmischer Form als  $\log K_{O/W}$  ausgegeben. Overton und Meyer stellten einen Zusammenhang her zwischen der Wirksamkeit von Anästhetika und ihren Verteilungskoeffizienten (Overton, 1901). Je größer dieser ist, desto mehr Wirkstoff löst sich in der Membran. Daher wurden Membranen modellhaft als ölige Bulk-Phasen dargestellt und der Verteilungskoeffizient zwischen Wasser und einer öligen Phase (Oktanol, Olivenöl, etc.) auf die Wirksamkeit von Pharmazeutika in Membranen übertragen. Dieses einfache Modell weist viele Schwächen auf. Es gibt eine Reihe von Untersuchungen, die zeigen, dass der  $\log K_{O/W}$  nur in erster Näherung die Verteilung zwischen der wässrigen Phase und der Membran wiedergibt (Pohorille, 1996). Die Diskrepanz ist vor allem auf die Vernachlässigung der Grenzschicht Wasser-Kopfgruppen im Oktanol-Wasser-Modell, sowie auf die Behandlung des Membraninneren als Bulk-Phase (vergleiche Kapitel 2.3) zurückzuführen. Andere Modelle wurden entwickelt, welche die Besonderheiten von Lipid-Membranen miteinbeziehen. (De Young, 1988, Xiang, 1998, Mitragotri, 1999) und die Verteilung eines Stoffes zwischen der wässrigen und der Membranphase unter anderem von der Größe des gelösten Stoffes, der Kettenordnung in der Membran und der Packungsdichte der Membranoberfläche abhängig machen. Auch im Fall von Pyren zeigt sich ein Unterschied zwischen dem  $\log K_{O/W}$  und dem  $\log K_{M/W}$ .

Der Verteilungskoeffizient bei 300K wurde aus der Differenz der freien Enthalpie zwischen Bulk-Wasserphase und dem bevorzugten Aufenthaltsort zu  $\log K_{M/W} = 5,8$  errechnet. Herrenbauer bestimmte einen Verteilungskoeffizienten von  $\log K_{M/W} = 7,1$  für Pyren zwischen Wasser und Soja-PC-Liposomen aus Fluoreszenzversuchen (Herrenbauer, 2002). Der größere Verteilungskoeffizient bei Soja-PC-Liposomen kann unter anderem an der etwas anderen Lipid-Zusammensetzung und an der Anwesenheit von Restethanol aus dem Herstellungsverfahren liegen. Die beiden Werte zeigen, dass sich der Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient  $\log K_{O/W}$  nicht unbedingt auf Lipid-Membranen übertragen lässt. Dieser ist für Pyren 5,3, also etwas niedriger als der für Lipid-Membranen. Der größere Verteilungskoeffizient zwischen Wasser und dem bevorzugten Aufenthaltsort in der Membran lässt darauf schließen, dass Pyren eine größere Affinität zu höher geordneten hydrophoben Bereichen, wie dem Soft-Polymer-Bereich zeigt (Baumgart, 2003). Zwischen Wasser und Membranmitte, wo die Verhältnisse ähnlich einer ungeordneten Oktanolphase wären, ist der Verteilungskoeffizient deutlich kleiner.

#### *Größte Aufenthaltswahrscheinlichkeit*

Betrachtet man die Diagramme der Verteilungsdichte (Bild 7.3) bei den drei simulierten Temperaturen, fällt auf, dass sich keine Moleküle in der Mitte der Membran finden, sondern

(fast) alle Moleküle die größte Verweildauer im Soft-Polymerbereich haben. Der Soft-Polymer-Bereich ist ein Bereich hoher Kettenordnung und geringen freien Volumens.

Dies deckt sich mit experimentell gefundenen Ergebnissen. Herrenbauer bestimmte mittels tiefenabhängiger Fluoreszenzlösch-Versuche den bevorzugten Aufenthaltsort von Pyren in unilamellaren Liposomen aus POPC. Die Wasserstoffatome der POPC-Moleküle waren entweder am 5./6., 7./8. oder 9./10. C-Atom der Acylkette mit Brom substituiert. Durch den Schweratomeffekt des Broms wird die Fluoreszenz der Pyren-Moleküle gelöscht. Die Fluoreszenzintensität bei unmarkierten POPC-Liposomen war vergleichbar mit der bei Liposomen mit einer Markierung an den C-Atomen 7, 8, 9 und 10. Die Fluoreszenzlöschung bei Markierungen an C5/6 waren dagegen deutlich höher (Herrenbauer, 2002).

Pyren ist mit einem errechneten Verteilungskoeffizienten von  $\log K_{M/W} = 5,8$  ein sehr hydrophobes Molekül. Daher könnte man vermuten, dass es sich im hydrophobsten Teil der Membran, sprich der Membranmitte anlagert. Aus der Aufenthaltsdichte der Simulationen ist jedoch ersichtlich, dass Pyren überhaupt nicht in der Membranmitte zu finden ist. Um die Abwesenheit in der Membranmitte zu erklären, müssen sowohl energetische als auch sterische Gründe in Betracht gezogen werden.

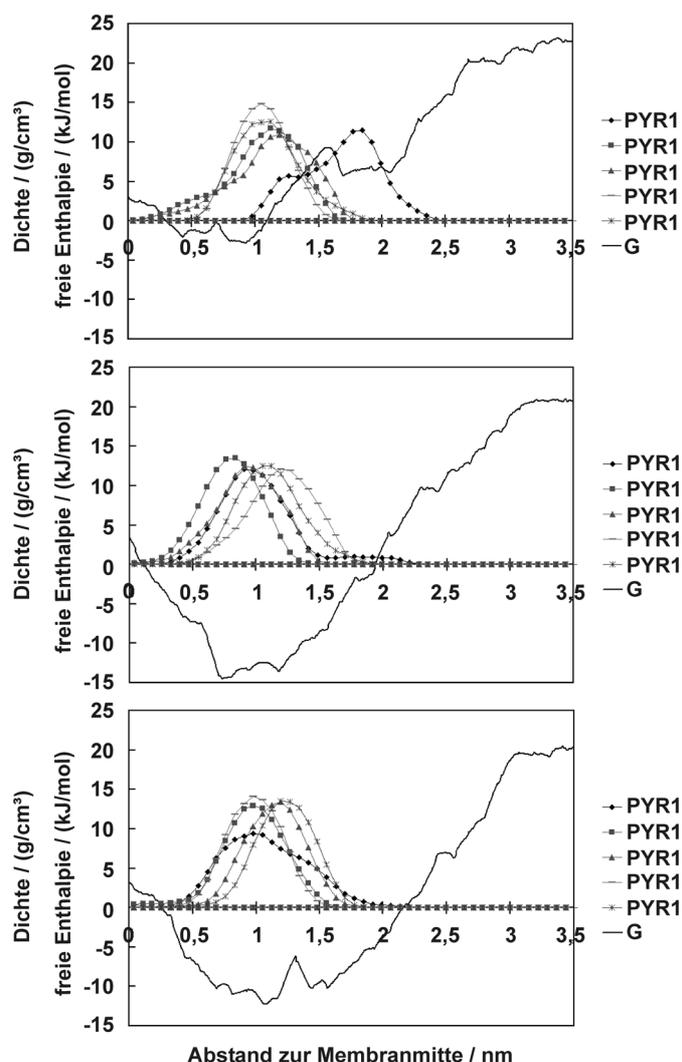
In der Literatur gibt es viele Hinweise darauf, dass sich aromatische Stoffe nicht vollkommen hydrophob verhalten. Für Benzol ist bekannt, dass das große permanente Quadrupolmoment zu einer negativen Partialladung im Ring und einer positiven Partialladung an den Wasserstoffatomen führt (Dougherty, 1996). Obwohl solche Berechnungen für Pyren nicht existieren, ist es sehr wahrscheinlich anzunehmen, dass diese Effekte auch in anderen Aromaten auftreten. Aufgrund der Polarisierung um den aromatischen Ring werden verschiedene neue Wechselwirkungen diskutiert. So kann der negativ polarisierte Ring als Akzeptor für Wasserstoffatome fungieren, ähnlich einer Wasserstoffbrückenbindung (Levitt, 1988). Nishio beschreibt sogenannte CH/ $\pi$ -Wasserstoffbrücken-Bindungen unter anderem in flüssigkristallinen Stoffen (Nishio, 2004). Eine weitere häufig genannte Wechselwirkung ist die Kationen- $\pi$ -Wechselwirkung. Dieser Effekt ist für viele organische Systeme beschrieben, vor allem in Proteinen, deren aromatische Seitenketten mit Aminogruppen wechselwirken (Ma, 1997).  $\alpha$ -Helices, welche die Aminosäuren Trp/Arg enthalten werden, durch Kationen- $\pi$ -Bindungen stabilisiert (Shi, 2002). Es ist durchaus denkbar, dass in der Realität zwischen dem polarisierten Pyren und den partiell geladenen Atomen der Glycerin/Kopfgruppe Wechselwirkungen stattfinden könnten.

In den Simulationen ist Pyren jedoch nicht polarisiert, die Wasserstoff und Kohlenstoffatome tragen lediglich kleine Partialladungen von  $-0,14$ , resp.  $0,14$ . Wechselwirkungen aufgrund von Quadrupolmomenten werden nicht wiedergegeben.

Einen weitaus größeren Einfluss werden demnach die sterischen Effekte haben. In der Membranmitte herrschen molekulare Ordnungsverhältnisse, die vergleichbar sind mit flüssigen Hexan (Marrink, 1994). Die Kettenenden haben einer sehr hohe Beweglichkeit, der

Ordnungsparameter  $S_{CD}$  geht gegen Null. Die Anwesenheit eines großen Moleküls wie Pyren könnte die ungeordnete Bewegung der Ketten stören, die Kettenenden müssten sich um das Molekül herum orientieren (Stichwort: Entropiestrafe). Es könnte zu einer Situation kommen, die mit der Anwesenheit hydrophober Stoffe in Wasser vergleichbar ist. Auch dort müssen sich die Wassermoleküle um das hydrophobe Molekül arrangieren, was zu einem Entropieverlust führt. Der Umstand, dass PAK-Farbstoffe in höher geordneten Bereichen von Liposomen akkumulieren, (Baumgart, 2003) unterstützt diese These.

Bestätigt wird das auch durch Umbrella Sampling Simulationen. In Bild 7.10 ist ein Vergleich der Aufenthaltswahrscheinlichkeit der Pyren-Moleküle aus den MD-Simulation mit den aus Umbrella Sampling Simulationen berechneten Verläufen der freien Enthalpie  $\Delta G$ , welche ebenfalls die Aufenthaltswahrscheinlichkeit wiedergeben, über den Abstand zur Membranmitte aufgetragen. Restriktierte und unrestriktierte Simulationen liefern ein sehr einheitliches Bild.



Die niedrigsten freien Enthalpien, das heißt die energetisch günstigsten Position für Pyren in POPC finden sich nicht in der Membranmitte, sondern im Soft-Polymer-Bereich, etwa 0,8-1,1 nm von der Membranmitte entfernt. Mit steigender Temperatur wird auch der Gewinn an freier Enthalpie größer. Während  $\Delta G$  für 285K etwa bei -24 kJ/mol liegt, ist  $\Delta G$  bei 300K und 315K etwa -32 kJ/mol. Für 285K ist noch mal eine deutliche Barriere im Bereich der Phosphogruppen zu finden, die bei 300K verschwunden ist, bei 315K ist eine kleine Barriere im Bereich der Glyceringruppen zu sehen.

**Bild 7.10:** Vergleich der freien Enthalpie  $\Delta G$  aus den Umbrella Sampling Simulationen mit der normierten Verteilung der Dichte der Pyren-Moleküle aus den unrestriktierten Simulation über den Abstand zur Membranmitte bei 285K (oben), 300K (Mitte) und 315K (unten)

Bei allen drei Temperaturen findet zur Membranmitte hin ein deutlicher Anstieg statt (285K: 6kJ/mol; 300K, 315K: 15 kJ/mol), was erklärt, warum die Pyren-Moleküle nicht in der Mitte

zu finden sind und auch keine Tendenz zum Diffundieren von der einen in die andere Membranhälfte zeigen.

### *Ausrichtung und Beweglichkeit*

Aufgrund der Intensitäten war es möglich, die Peaks des  $^2\text{H}$ -NMR Spektrums eindeutig den C-D-Bindungen, bzw. Parametern zuzuordnen, welche auch in den MD-Simulationen zu beobachten waren. Daher sind die Parameter  $S_{\text{CD}}^\alpha$ , and  $S_{\text{CD}}^\delta$  aus der Simulation direkt vergleichbar mit  $S_{\text{CD}}^{\text{A}}$ , and  $S_{\text{CD}}^{\text{B}}$  aus den NMR-Untersuchungen.

Drei aufeinanderfolgende Simulationsabschnitte von 5 bzw. 10ns wurden analysiert und in Tabelle 7.5 verglichen. Die Unterschiede zwischen den zeitlich gemittelten Werten und ihre immer bessere Übereinstimmung zum Ende der Simulation hat verschiedene Gründe. So lange sich die Pyren-Moleküle in Bewegung befinden (Diffundieren in der Membran oder von der wässrigen in die hydrophobe Phase) können die simulierten Werte nicht mit den NMR-Werten verglichen werden. Ähnlich dem Problem mit den Ordnungsparametern kann ein sinnvoller Vergleich nur dann stattfinden, wenn das simulierte System annähernd in einem Gleichgewichtszustand ist.

Während der ersten 8ns diffundieren die Pyren-Moleküle entlang der z-Achse in Richtung ihres bevorzugten Aufenthaltsortes (Bild 7.3 B). Aufgrund der Cut-Off-Artefakte (Anezo, 2003a, Bild 7.2 A) ändert sich der Platzbedarf der Lipide, bis er bei etwa 15 ns stagniert. Diese Änderung führt zu einer aufgeprägten Bewegung der POPC-Moleküle entlang der x- und y-Achse, mit der Pyren-Moleküle mit den POPC-Molekülen mitgeschleppt werden (Bild 7.2B-E). Nach 15 ns konvergiert der Platzbedarf, es findet keine weitere künstliche Bewegung der POPC- und Pyren-Moleküle statt. Das simulierte System hat also eine Art Gleichgewichtszustand erreicht, weshalb die zeitlich gemittelten Werte von 15-25ns am besten mit den NMR-Ergebnissen übereinstimmen.

Einen weiteren Unterschied zwischen simulierten und experimentellen Werten kann durch die Wahl des  $Q_{\text{CC}}$ -Wertes (Gleichung 5.12) hervorgerufen werden. Für Pyren selbst wurde kein  $Q_{\text{CC}}$ -Wert in der Literatur gefunden. Die NMR-Ordnungsparameter wurden daher mit  $Q_{\text{CC}}=193$  kHz (Rowell, 1965) berechnet, ein Wert, welcher ursprünglich für polykristallines Benzol bestimmt wurde. Die Literaturangaben schwanken jedoch zwischen 181kHz und 198kHz, abhängig vom Molekül und der angewandten Bestimmungsmethode (Millet, 1972).

Die Ordnungstensor-Elemente (Tabelle 7.7) stimmen ebenfalls sehr gut mit den simulierten Daten überein. Mittels  $^2\text{H}$ -NMR (Shilstone, 1989) und  $^{13}\text{C}$ -NMR (Hagemeyer, 1994) wurde  $S_{\text{ZZ}}$  für Pyren in Flüssigkristallen bestimmt. Abhängig von der Temperatur wurden Werte bis -0,43 gefunden. Andere Aromaten in Lipid-Doppelschichten zeigten ähnliche Werte. Mukhopadhyay et al. führte MD-Simulation von PCP in POPC und POPE-Doppelschichten durch. Hier wurden der Winkel zwischen der Membrannormalen und der Ringnormalen auf  $70^\circ$  bis  $80^\circ$  bestimmt, was  $S_{\text{ZZ}}$ -Werten zwischen -0,32 und -0,45 entspricht. Die Autoren

brachten diese Neigung der Aromaten-Ringebene mit der Packungsdichte der Lipide und der Neigung der Acylketten gegenüber der z-Achse in Verbindung. Je geringer die Packungsdichte war, desto mehr Spiel hatten die PCP-Moleküle. Die Neigung der Acylketten bestimmten sie zu  $32^{\circ}$ - $36^{\circ}$  in Anwesenheit der PCP-Moleküle (Mukhopadhyay, 2004).

Aus Bild 7.6 ist ersichtlich, dass Pyren eine bevorzugte Ausrichtung hat. Die Längsachse  $1/1'$  des Moleküls ist in etwa parallel zur Membrannormalen ausgerichtet mit einem Spiel von  $\pm 30^{\circ}$ . Eine waagrechte Ausrichtung der Längsachse ist eher selten zu beobachten. Fasst man die Ergebnisse aus  $S_{ZZ}$  und der Ausrichtung der Längsachse zusammen, so kommt man zu dem Schluss, dass sich die Pyren-Moleküle so ausrichten, dass sie die Umgebung der Acylketten möglichst wenig stören.

Die sehr gute Übereinstimmung aller Werte zeigt an, dass sich die NMR-Resultate fast ausschließlich mit sehr schnellen Bewegungen erklären lassen. Ist ein kleines hydrophobes Molekül in einer Phospholipid-Membran gelöst, treten verschiedene Bewegungen mit unterschiedlichen Zeitkonstanten auf. Es gibt sehr schnelle Bewegungen, wie Bindungs- und Winkelvibrationen, etwas langsamere Rotationsbewegungen um die Molekülachsen und noch langsamere Diffusion entlang der Membrannormalen oder Membranbewegungen.

Bei der NMR-Spektroskopie wird das Signal von  $10^{19}$  Molekülen über mehrere ms im FID gemittelt, womit fast alle Arten der Bewegung erfasst werden können. In MD-Simulation hingegen werden einige tausend Moleküle über wenige ns gemittelt, das heißt nur die sehr schnellen Bewegungen werden ausgemittelt. Daher war die gute Übereinstimmung der experimentellen und simulierten Daten unerwartet.

Ein Vergleich zwischen Simulation und NMR ist nur dann möglich, wenn sich beide Systeme in einer Art Gleichgewichtszustand befinden. Bei den NMR-Experimenten ist dies von Beginn an der Fall, die erfassten Zeiten sind lang genug und die Anzahl der Moleküle groß genug, um auch langsame Bewegungen und statistisch nicht so häufig stattfindende Ereignisse auszumitteln. Bei den Simulationen können nur Ereignisse ausgemittelt werden, die innerhalb weniger Nanosekunden häufig genug stattfinden. Ein Gleichgewichtszustand ist im Fall von Pyren erst dann erreicht, wenn keine Diffusion entlang der Membrannormalen und keine Beeinflussung der Membrandimensionen durch Cut-Off Artefakte mehr stattfindet.

Es zeigte sich, dass die Bewegungsmodi von Pyren überwiegend aus schnellen Bewegungen (z.B. Rotationsbewegungen) bestehen. Den bevorzugten Aufenthaltsort hatten alle Moleküle nach etwa 8ns erreicht, so dass im weiteren Simulationsverlauf keine Diffusion entlang der Membrannormalen mehr stattfand. Da der Gleichgewichtszustand in der Simulation sehr schnell erreicht wurde, genügten bereits wenige Nanosekunden Simulationszeit, um alle Bewegungen, die ein Pyren-Molekül in der Membran macht, auszumitteln und so den guten Vergleich zwischen simulierten und experimentell ermittelten Ergebnissen zu ermöglichen.

### *Kettenordnung*

Der Kettenordnungsparameter  $S_{CD}$  gibt Auskunft über die Fluidität der Membran. Befindet sich die Membran in einem hochgeordneten Gelzustand, nähert sich  $-S_{CD}$  dem Wert 0,5 an, eine völlig ungeordneten Phase, wie z.B. flüssiges Alkan, würde Werte um 0 annehmen. Je geordneter die Ketten sind, desto dichter gepackt und weniger fluid ist eine Lipid-Membran.

Die eingesetzten Konzentration von Pyren zeigen jedoch kaum einen Effekt. Lediglich im Bereich ihrer höchsten Aufenthaltswahrscheinlichkeit um das fünfte C-Atom herum sind die Werte, sowohl in der Simulation, als auch im Experiment leicht erhöht. Dies ist zusätzlich eine weitere experimentelle Bestätigung des bevorzugten Aufenthaltsorts von Pyren in der Membran. Mukhopadhyay (2004) fand ebenfalls eine erhöhte Kettenordnung von POPC in Anwesenheit von PCP, welches ähnlich Pyren ein planarer Aromat ist, der sich bevorzugt in der Soft-Polymer Region aufhält.

In der Natur wird die Kettenordnung und damit die Fluidität der Membran meist durch Cholesterine beeinflusst, welche in ihrer Struktur und Größe dem Pyren nicht unähnlich sind. Die Konzentration dieser Stoffe in der Membran sind in diesen Fällen jedoch ungleich höher, Zellplasma-Membranen können einen Anteil von bis zu 50mol% Cholesterin besitzen. Verschiedene Simulationen von Lipid-Membranen mit unterschiedlichen Cholesterin-Gehalten zeigen zwar Veränderungen der Mikrostruktur um die Cholesterin-Moleküle, diese haben jedoch bis etwa 10mol% keine größere Auswirkung auf die Kettenordnung (Hofsäß, 2003, Jedlovsky, 2003a, Chiu, 2001, Smondyrev, 1999). Bei Pyren-Konzentration von 5mol% war daher auch kein größerer Einfluss auf die Fluidität der Membran zu erwarten.

Die insgesamt höheren  $S_{CD}$ -Werte in der Simulation können wieder auf die Artefakte des Cut-Offs zurückgeführt werden, die eine künstlich höhere Ordnung der Membran zur Folge haben.

Wie aus den NMR-Untersuchungen hervorgeht, hat im vorliegenden Fall die Temperatur einen deutlich größeren Einfluss auf die Kettenordnung als die Ab- oder Anwesenheit von Pyren. Mit steigender Temperatur sinkt die Kettenordnung.

### **7.5 Zusammenfassung**

Mit Hilfe von Simulation und NMR Untersuchungen konnte ein umfassendes Bild zum Verhalten von Pyren in Lipid-Membran und dessen Einfluss auf diese erstellt werden. Mit einem Verteilungskoeffizienten von  $\log K_{W/M}=5,8$  bei 300K finden sich fast alle Pyren-Moleküle in der Lipid-Membran. Die Diffusion aus der wässrigen Phase in die Membran ist temperaturabhängig und entropiegetrieben. Im hier untersuchten Temperaturbereich zwischen 285K und 315K läuft die Diffusion in die Membran bei höheren Temperaturen schneller ab.

Pyren hat in der Membran einen bevorzugten Aufenthaltsort im Soft-Polymer Bereich. Umbrella Sampling Simulationen haben gezeigt, dass sich hier ein Minimum der freien

Enthalpie findet, das heißt, der Gewinn an freier Enthalpie ist am größten. In der Membranmitte hingegen, dem hydrophobsten Bereich der Membran, ist Pyren nicht zu finden. Auch hier spielen Entropiegründe eine Rolle. Die Anwesenheit von Pyren im hochungeordneten Bereich der Acylketten-Enden könnte zu einer Entropieerniedrigung führen, was energetisch ungünstig ist.

Pyren orientiert sich in der Membran so, dass die Kettenordnung möglichst wenig gestört wird. Die Ringebene richtet sich parallel zu den Acylketten aus, die Längsachse ( $1/1'$ -Achse) von Pyren hat richtet sich bevorzugt aufrecht, parallel zur Membrannormalen aus. Der Platzbedarf der Acylketten ist in Anwesenheit von Pyren leicht erhöht, ein Einfluss auf die Kettenordnung zeigt sich lediglich im Bereich der größten Aufenthaltswahrscheinlichkeit, nahe des fünften C-Atoms.

Die Ergebnisse aus Simulation und NMR-Versuchen stimmen sehr gut überein, was darauf zurückzuführen ist, dass sich sehr schnell eine Art Gleichgewichtszustand in der Simulation einstellt und dass alle Bewegung, welche Pyren in der Membran ausführen kann, in den Bereich der sehr schnellen Bewegungen fallen. Daher sind bereits wenige Nanosekunden Simulationszeit ausreichend, um zeitlich ausgemittelte Ordnungsparameter zu erhalten, welche mit den NMR-Ordnungsparametern direkt verglichen werden können.

## Kapitel 8

---

### TFB und TFB<sup>-</sup>

---

#### 8.1 Einleitung

3,5-(Bis-) Trifluoromethyl-Benzoesäure (TFB) dient als Modellschicht, um die Orientierung <sup>19</sup>F-gelabelter Peptide und Proteine in orientierten Doppelschichten zu untersuchen. Anhand dieses Moleküls werden aus Dipolkopplungen in einer CF<sub>3</sub>-Gruppe und zwischen den zwei CF<sub>3</sub>-Gruppen Informationen über die Ausrichtung in orientierten Doppelschichten gewonnen (WEB3, 2005). Hintergrund ist, dass <sup>19</sup>F wesentlich stärkere Signale liefert als <sup>2</sup>H, <sup>13</sup>C oder <sup>15</sup>N. Insbesondere CF<sub>3</sub>-Gruppen können wertvolle Hinweise auf Struktur und dynamisches Verhalten in einer Membran liefern. (Grage, 1999, Grage, 2000)

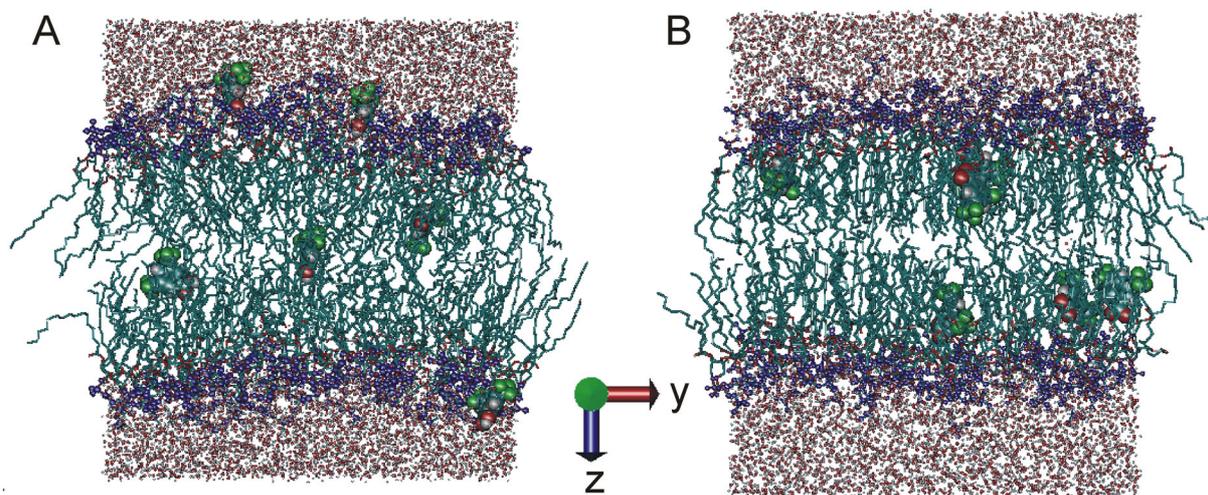
3,5-(Bis-) Trifluoromethyl-Benzoesäure hat einen pK<sub>S</sub>-Wert von 3,38. Bei pH-Werten größer 3,38 liegt es in deprotonierter Form vor. Aufgrund der Carboxyl-Gruppe besitzt dieses Molekül ein hydrophiles Element, in deprotonierter Form liegt es als Ion vor. Das Verhalten dieses Moleküls im untersuchten System wird nicht allein durch die Hydrophobizität des aromatischen Rings, sondern auch durch die hydrophilen, bzw. geladenen Teile des Moleküls entscheidend beeinflusst und wird sich daher von dem der anderen beiden Molekülen unterscheiden.

In Wasser liegt TFB aufgrund seines niedrigen pK<sub>S</sub>-Werts deprotoniert als TFB<sup>-</sup> vor. Über seinen Zustand in der Membran kann nur spekuliert werden. In einer hydrophoben Phase in Abwesenheit von Wasser ist es eher unwahrscheinlich, dass es in deprotonierter Form vorliegt. Denkbar ist, dass es bei seiner Diffusion in die Membran oder aus der Membran im Bereich der Kopfgruppen zu Protonierungs- und Deprotonierungsvorgängen kommt (Ulander, 2003).

Da in den Simulationen keine Umprotonierungen stattfinden können, wurden restriktierte und unrestrictierte Simulation mit der neutralen Form und der einfach negativ geladenen konjugierten Base TFB<sup>-</sup> durchgeführt. Das tatsächliche Verhalten kann dann als Mischform zwischen beiden Extrema interpretiert werden. Da Ergebnisse von NMR-Untersuchungen zur Orientierung von TFB in DMPC vorliegen, wurden neben Simulationen von TFB in POPC- auch Simulationen in DMPC-Membranen durchgeführt. Die Ergebnisse aus diesen Simulationen sollten vor allem die Orientierung des TFBs in der Membran klären und so als Hilfe bei der Interpretation der NMR-Spektren dienen.

## 8.2 Durchgeführte Simulationen

Die Ausgangskonfiguration von TFB und TFB<sup>-</sup> war in beiden Doppelschichten jeweils die gleiche. Bei der Simulation in POPC wurden drei TFB-Moleküle außerhalb der Membran und drei an verschiedenen Stellen innerhalb platziert (Bild 8.1A). Bei den Simulationen mit DMPC ging es vor allen darum, Gleichgewichtsdaten zu erhalten, die mit den NMR-Untersuchungen vergleichbar waren. Aus Vorsimulation wurde die Soft-Polymer-Region als größter Aufenthaltsbereich für TFB in einer Membran bestimmt. Daher wurden alle sechs TFB-Moleküle in unterschiedlichen Ausrichtungen in der Soft-Polymer-Region platziert (Bild 8.1B). Sechs TFB-Moleküle in der Modell-Membran entsprechen einer Beladung von 0,05mol/mol. Dies ist die gleiche Beladung, wie sie in den NMR-Experimenten verwendet wurde.



**Bild 8.1:** Ausgangskonfiguration der vier Simulationen mit TFB, bzw. TFB<sup>-</sup>. A zeigt die Ausgangspositionen der TFB/TFB<sup>-</sup>-Moleküle bei der Simulation in POPC, B zeigt die Ausgangssituation bei der Simulation in DMPC. Die rot-weißen Kugeln stellen das Wasser dar, die blauen Kugeln die Atome der Kopfgruppe, die türkisfarbenen Ketten die Acylketten der POPC, bzw. DMPC-Membran. Die TFB-Moleküle sind in vdW-Darstellung gezeigt und an den grünen Fluor-Atomen erkennbar

**Tabelle 8.1:** Durchgeführte Simulationen und ihre wichtigsten Parameter

Art	Molekül	Lipid	#Moleküle	Temperatur/K	Druck/bar	Länge/ns	cut-off	R <sub>c</sub> /nm
MD	TFB	POPC	5	300	1	20	PME	1,0
MD	TFB	DMPC	5	343	1	20	cut-off	1,8
MD	TFB <sup>-</sup>	POPC	5	300	1	20	PME	1,0
MD	TFB <sup>-</sup>	DMPC	5	343	1	20	cut-off	1,8

Art	Molekül	Lipid	Kraft/ kJ/(mol*nm <sup>2</sup> )	Temperatur/K	Druck/bar	Anzahl/ Länge	cut-off	R <sub>c</sub> /nm
US	TFB	POPC	3600	300	1	29/je 2ns	PME	1,0
US	TFB <sup>-</sup>	POPC	3600	300	1	29/je 2ns	PME	1,0
US	TFB	POPC	3600	315	1	29/je 2ns	PME	1,0

Es wurden je zwei unrestrictierte MD-Simulationen von TFB und TFB<sup>-</sup> in POPC bei 300K mit PME und von TFB und TFB<sup>-</sup> in DMPC bei 343K mit Cut Off durchgeführt. Die simulierte Zeit bei den POPC-Simulationen war 20ns, bei den DMPC-Simulationen 20ns für TFB und 30ns für TFB<sup>-</sup>. Alle weiteren Parameter der Simulationen wurden bereits in Kapitel 6.2 beschrieben.

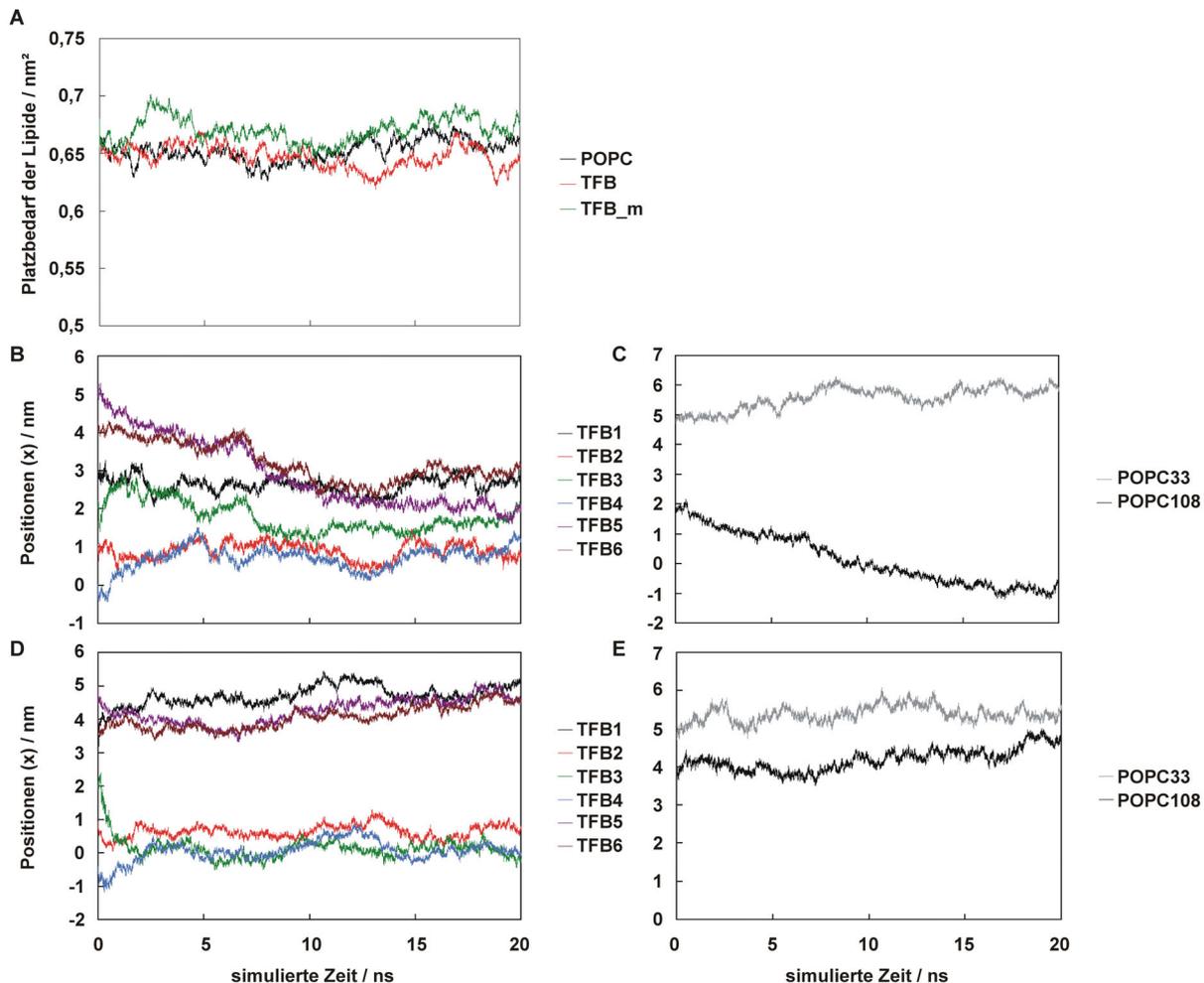
Bei den Umbrella Sampling Simulationen wurde ein TFB-, bzw. TFB<sup>-</sup>-Molekül in einer POPC-Membran mittels eines harmonischen Potentials mit der Federkonstante  $K_S = 3600$  kJ/mol/nm<sup>2</sup> in z-Richtung fixiert. Es wurden 29 Simulationen à 2ns durchgeführt, wobei das Molekül von Simulation zu Simulation mit einer Schrittweite von  $\Delta s = 0,125$ nm weitgeschoben wurde. Die Auswertung der Simulation erfolgte mit Perl-Skripten von MacCallum (Anhang A3), die Schrittweite der Histogramme war 0,01nm, es wurden 10000 Iterationsschritte durchgeführt.

## 8.3 Ergebnisse

### 8.3.1 Bewegung und Verteilung von TFB und TFB<sup>-</sup>

Im Gegensatz zu allen anderen unrestrictierten Simulationen wurden bei den Simulation mit TFB und TFB<sup>-</sup> in POPC die weitreichenden Wechselwirkungen mit Particle Mesh Ewald berechnet. Am konstanten Platzbedarf der Lipide ist zu erkennen, dass hier kein nennenswertes Aufweiten oder Zusammenziehen der Simulationszelle, bzw. der Membran stattfindet (Bild 8.2 A).

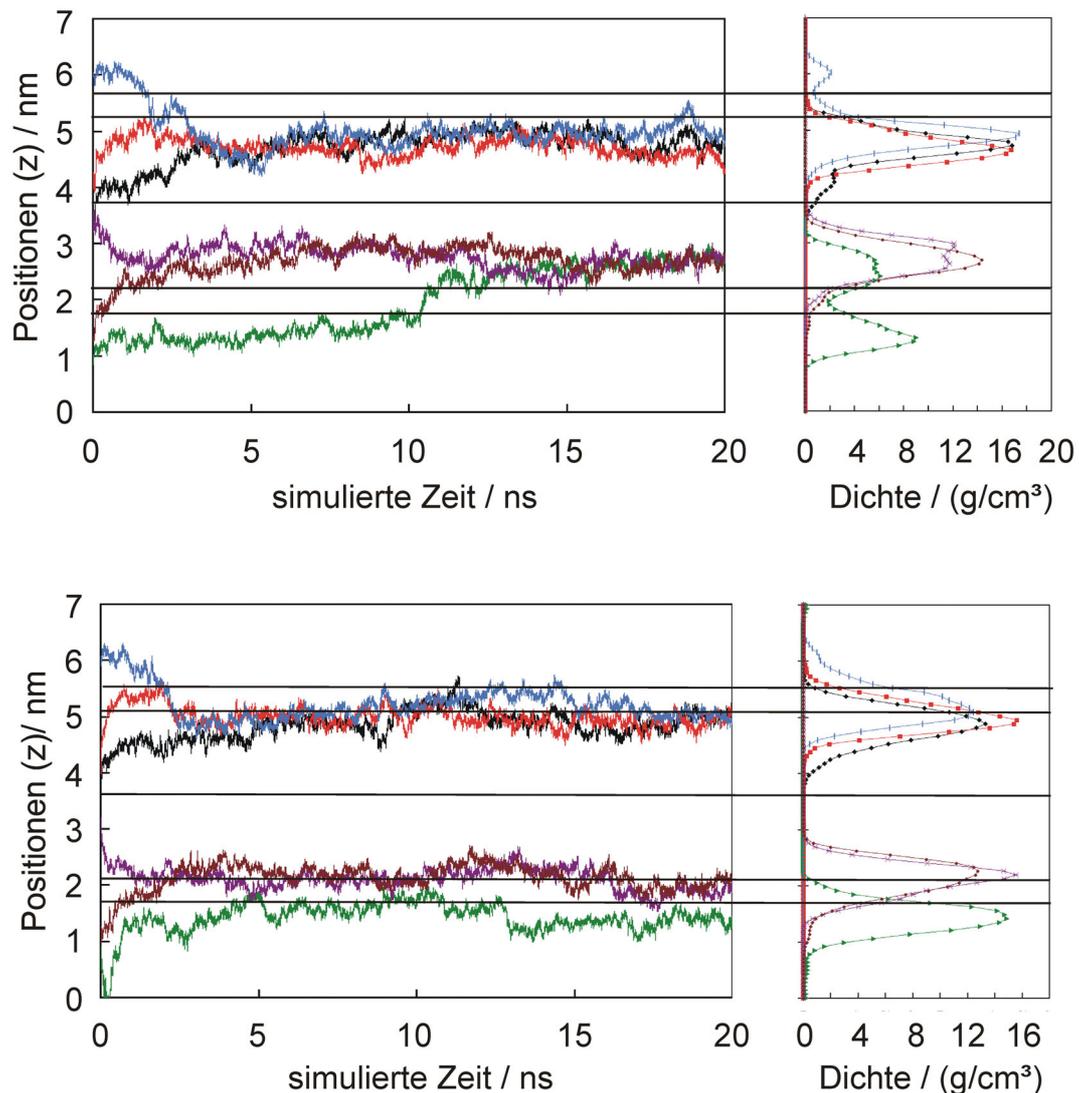
Befinden sich TFB und TFB<sup>-</sup> in der Membran, findet keine gerichtete Wanderung in x- oder y-Richtung statt. Die Bewegung ist direkt an die Bewegung der POPC-Moleküle gekoppelt. In Bild 8.2 ist das anhand der Wanderung von TFB/POPC (B/C) und TFB<sup>-</sup>/POPC (D/E) in x-Richtung verdeutlicht (z.B. TFB4 oder TFB1). Außerhalb der Membran findet ungerichtete Diffusion statt, was am TFB3 sehr gut zu erkennen ist.



**Bild 8.2:** (A) Platzbedarf in nm<sup>2</sup> der puren POPC-Membran, sowie der POPC-Membran in Anwesenheit von TFB und TFB<sup>-</sup> über die Simulationszeit, Positionen der Molekülschwerpunkte von TFB (B) und TFB<sup>-</sup> (D) in x-Richtung über die Simulationszeit, sowie der dazugehörigen POPC-Moleküle je einer Membranhälfte (C, E)

Die Diffusion in z-Richtung ist bei der Säure TFB und konjugierter Base TFB<sup>-</sup> deutlich verschieden (Bild 8.3). Die außen platzierten neutralen TFB3, TFB4 und TFB6 diffundieren zur Membranoberfläche. TFB3 und TFB6 diffundieren sehr schnell (ca. 1ns) durch die Kopfgruppen und haben nach etwa 5ns ihre Endposition in z-Richtung im Bereich der Soft-Polymer-Region erreicht. TFB4 hält sich ca. 10ns an der Außenseite der Kopfgruppen auf, diffundiert dann ebenfalls innerhalb weniger hundert Picosekunden durch die Kopfgruppen hindurch zur Endposition. Die an verschiedenen Stellen in der Membran und in der Kopfgruppe platzierten Moleküle diffundieren unmittelbar nach Start in Richtung Soft-Polymer-Region und zeigen nach Erreichen keinerlei Tendenzen, zur Membranmitte oder in die Kopfgruppen zu diffundieren.

Aus der Dichteverteilung gehen zwei bevorzugte Aufenthaltsorte hervor, nämlich innerhalb der Membran im Soft-Polymer-Bereich und außerhalb der Membran im Übergangsbereich des Wassers.



**Bild 8.3:** Positionen der Molekülschwerpunkte von TFB (oben) und TFB<sup>-</sup> (unten) in POPC bei 300K über die Simulationszeit (links) und Verteilung der Dichte in g/cm<sup>3</sup> der Molekülschwerpunkte über die z-Achse über die gesamte Simulationszeit (rechts). Legende siehe Bild 8.2

Die außen platzierten, einfach negativ geladenen TFB<sup>-</sup>-Moleküle diffundieren innerhalb der ersten 2ns zur Außenseite der Kopfgruppen. Während TFB3 und TFB6 sehr schnell durch die Kopfgruppe hindurch diffundieren und sich dann im Glycerin-Gruppen Bereich aufhalten, lagert TFB4 während der gesamten 20ns an der Außenseite der Phosphogruppen an. Die innen platzierten Moleküle diffundieren in den Bereich der Glyceringruppen und verweilen dort.

TFB<sup>-</sup> hält sich bevorzugt nahe, jedoch nicht in den Kopfgruppen auf. Ist es in der Membran, findet man es im Bereich der Glycerin-Gruppen, im Wasser hält es sich an der Membranoberfläche im Übergangsbereich des Wassers auf. Tabelle 8.2 fasst die Abstände zur Membranmitte von TFB und TFB<sup>-</sup>, gemittelt über die letzten 10ns der Simulation in POPC zusammen.

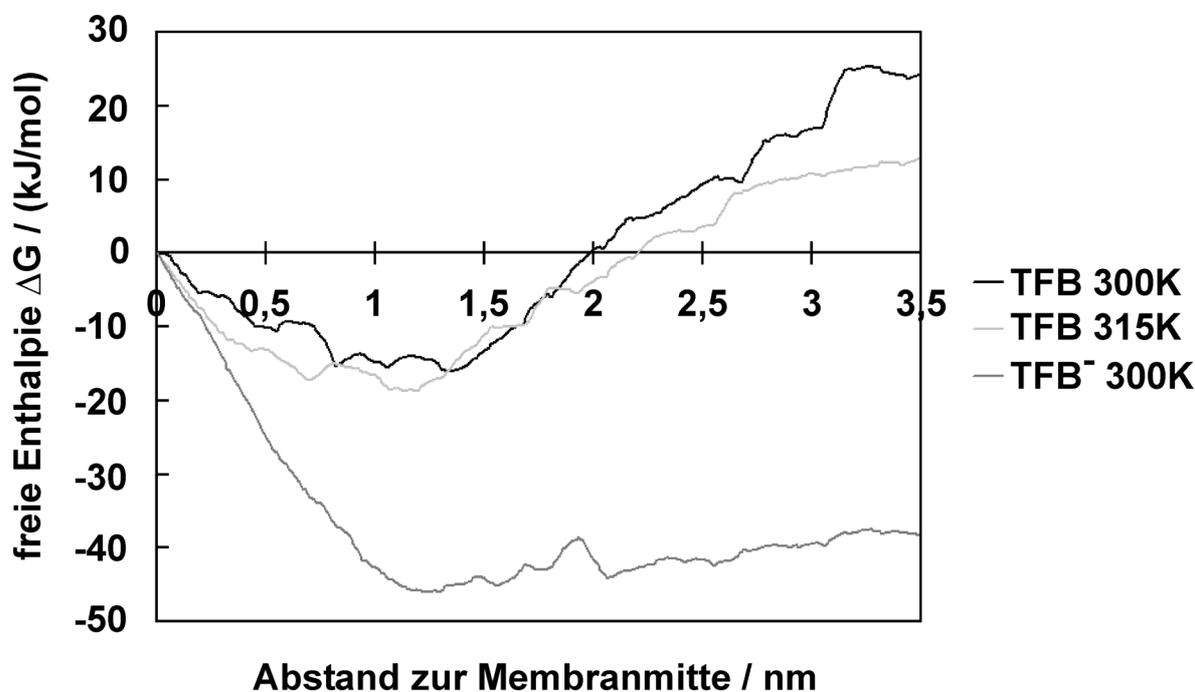
**Tabelle 8.2:** auf die ursprüngliche Ausdehnung der Simulationsbox normierter Abstand in nm der TFB/TFB<sup>-</sup>-Schwerpunkte (aus der größten Aufenthaltsdichte aus den letzten 10ns der Simulation) zur Membranmitte. Die Membranmitte ist definiert durch die geringste Aufenthaltswahrscheinlichkeit der POPC-Moleküle

Simulation	TFB1	TFB2	TFB3	TFB4	TFB5	TFB6	Mittelwert
TFB	1,19	0,98	1,19	1,34	1,05	0,90	1,11
TFB <sup>-</sup>	1,63	1,41	1,99	1,92	1,19	1,12	1,54

### 8.3.2 Die freie Enthalpie $\Delta G$

In Bild 8.4 ist der Verlauf der freien Enthalpie  $\Delta G$ , normiert auf  $\Delta G = 0 \text{ kJ/mol}$  bei  $z = 0 \text{ nm}$  über eine Membranhälfte zu sehen. TFB bei 300K und 315K hat die höchste freie Enthalpie im Bulk-Wasser. Über den Übergangsbereich des Wassers und die Kopfgruppen hinweg fällt die freie Enthalpie ab. Das Minimum befindet sich im Soft-Polymer-Bereich 0,8 - 1,4nm entfernt von der Membranmitte. Zur Membranmitte steigt die freie Enthalpie wieder an.

TFB<sup>-</sup> bei 300K hat sein Maximum in der Membranmitte. Zur Soft-Polymer-Region fällt die freie Enthalpie stark ab. Im Bereich der Phosphogruppen gibt es einen leichten Peak, während die freie Enthalpie im Wasser-Übergangsbereich und im Bereich des Bulk-Wassers relativ konstant bleibt.



**Bild 8.4:** Verlauf der normierten freien Enthalpie  $\Delta G$  in kJ/mol, aufgetragen über den Abstand zur Membranmitte ( $z = 0 \text{ nm}$ ) für die Säure TFB bei 300K und 315K und die konjugierte Base TFB<sup>-</sup> bei 300K

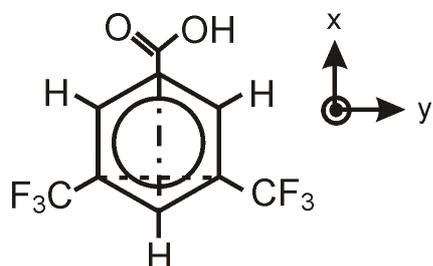
**Tabelle 8.3:** Differenzen der freien Enthalpie  $\Delta G$  aus Umbrella Sampling Simulationen von TFB und TFB<sup>-</sup>, sowie die daraus berechneten Verteilungskoeffizienten

	TFB – 300K	TFB – 315K		TFB <sup>-</sup> - 300K
$\Delta G_{m/w}$	-24,2	-12,8	$\Delta G_{m/w}$	38,2
$\Delta G_{b/w}$	-38,7	-31,0	$\Delta G_{b/w}$	-6,0
$\Delta G_{m/b}$	14,5	18,3	$\Delta G_{m/b}$	44,2
$\log K_{M/W}(m/w)$	4,2	2,1	$\log K_{M/W}(m/w)$	-6,7
$\log K_{M/W}(b/w)$	6,7	5,1	$\log K_{M/W}(b/w)$	1,0

M: Membran; m: Membranmitte,  $z = 0\text{nm}$ ; b; bevorzugter Aufenthaltsort; W: Wasser; w: Bulk-Wasser,  $z = 3,5\text{nm}$

### 8.3.3 Orientierung

Um die Orientierung zu charakterisieren, wurden die Elemente des Ordnungstensors  $S_{XX}$ ,  $S_{YY}$  und  $S_{ZZ}$  (siehe Bild 8.5) und ihre daraus resultierenden Winkel berechnet. Die Ergebnisse für TFB/TFB<sup>-</sup> in DMPC und POPC, gemittelt über die gesamte Simulationszeit sind in Tabelle 8.4 zusammengefasst.



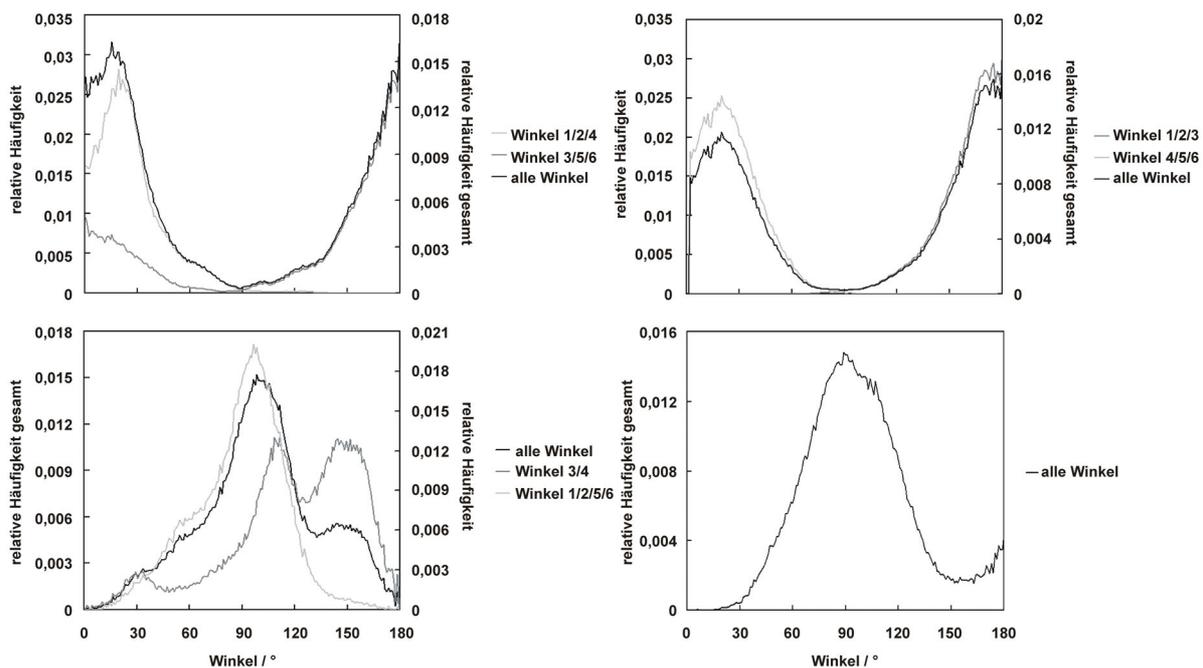
**Bild 8.5:** internes Koordinatensystem von TFB, die x-Achse - - - verläuft entlang der C/COOH-Verbindungsline, die y-Achse - - - verläuft entlang der CF<sub>3</sub>-Verbindungsline, die z-Achse steht senkrecht zu den beiden Achsen und verläuft parallel zur Ringnormalen

**Tabelle 8.4:** Elemente des Ordnungstensors  $S$  von TFB/TFB<sup>-</sup> in POPC und DMPC, gemittelt über die gesamte Simulationszeit

Membran	TFB-Art	gemittelte Zeit	$S_{xx}$	$S_{yy}$	$S_{zz}$
POPC	TFB	20ns	0,454	-0,250	-0,204
	TFB <sup>-</sup>	20ns	0,478	-0,228	-0,250
DMPC	TFB	20ns	0,481	-0,209	-0,272
	TFB <sup>-</sup>	30ns	0,508	-0,175	-0,333
NMR*	TFB <sup>-</sup> /TFB <sup>#</sup>		0,136	-0,057	-0,079

\*Dürr, 2004; #ob TFB in protonierter oder in deprotonierter Form in der Membran vorliegt, ist nicht geklärt

Die simulierten Elemente eines Ordnungstensors unterscheiden sich kaum, unabhängig davon ob TFB oder TFB<sup>-</sup> untersucht wurde, bzw. welche Membran verwendet wurde. Dies weist darauf hin, dass TFB in der Membran relativ unbeweglich ist. Nach Erreichen des bevorzugten Aufenthaltsorts und der bevorzugten Ausrichtung ist es vergleichsweise starr in der Membran verankert. Verdeutlicht wird das durch Bild 8.6, in dem die normalisierten Häufigkeitsverteilungen der Winkel zwischen interner x- und externer z-Achse, bzw. interner z- und externer z-Achse für TFB in POPC und DMPC aufgetragen sind.



**Bild 8.6:** normalisierte Häufigkeitsverteilung der Winkel zwischen interner x- und externer z-Achse (Ausrichtung der COOH-Gruppe, oben) und interner z- und externer z-Achse (Ausrichtung der Ringebene, unten) von TFB in POPC (links) und TFB in DMPC (rechts)

Die obere Spalte gibt die Häufigkeitsverteilung zwischen interner x- und externer z-Achse, sprich der Ausrichtung der COOH-Gruppe wieder. Bei beiden Membranen ist zu erkennen, dass sich die TFB-Moleküle mit den COOH-Gruppen zur den Kopfgruppen hin ausrichten. Dies bedeutet einen bevorzugten Winkel zwischen  $0^\circ$  und  $30^\circ$  für die TFB-Moleküle 1/2/4, bzw. 1/2/3 in der einen Hälfte der POPC-Membran, bzw. DMPC-Membran und einen Winkel zwischen  $150^\circ$  und  $180^\circ$  für die Moleküle, die sich in der anderen Membranhälfte aufhalten.

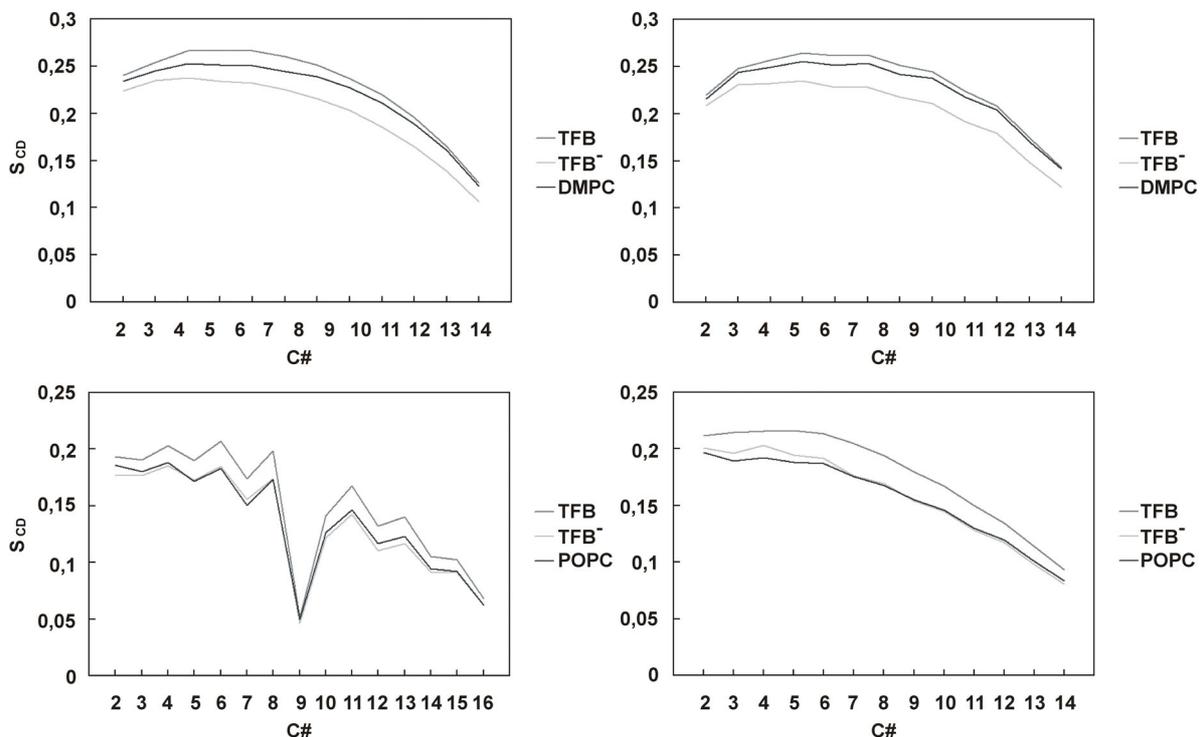
Der leichte Anstieg in der Verteilung von TFB 3/5/6 in POPC ab  $30^\circ$  wird durch TFB3 verursacht. Dieses braucht die Hälfte der gesamten Simulationszeit, um in die Membran zu diffundieren (siehe Bild 8.3 oben). Solange es sich noch in der wässrigen Phase aufhält, zeigt die COOH-Gruppe in Richtung der Kopfgruppen, es liegt also um  $180^\circ$  gedreht an der Außenseite der Membran. In der Simulation mit DMPC waren alle TFB-Moleküle von Beginn in der Membran platziert, weshalb sich hier ein einheitlicheres Bild bietet.

Die untere Spalte zeigt die Verteilung der Winkel bezüglich der Ausrichtung der Ringebene. Die Normale zur Ringebene richtet sich bevorzugt im 90°-Winkel zur Membrannormalen aus. Der Ringebene liegt also meist parallel zur z-Achse. Der kleine Ring hat jedoch relativ viel Spiel, die meisten Winkel finden sich zwischen 60° und 120°. In der Simulation mit POPC führt das über längere Zeit außen platzierte TFB3 zu einen atypischen Peak bei 150°.

### 8.3.4 Einfluss auf die Kettenordnung $S_{CD}$

Die Kettenordnung von TFB/TFB<sup>-</sup> in POPC und DMPC können problemlos analysiert werden. Die Simulation mit POPC wurde mit PME berechnet, daher ist der Lipid-Platzbedarf über die gesamte Simulationsdauer konstant.

Die Simulation mit DMPC wurde zwar mit Cut Offs berechnet, die DMPC-Membran war jedoch für diese Simulationsparameter sehr gut equilibriert, so dass auch in diesem Fall der Platzbedarf über die gesamte Simulationsdauer als konstant angesehen werden konnte. Der Kettenordnungsparameter  $S_{CD}$  wurde bei allen vier Simulationen von 10-20ns gemittelt (Bild 8.7), da in diesem Zeitraum die TFB-Moleküle ihre Position in z-Richtung kaum noch verändern, also auch in dieser Hinsicht ein Gleichgewichtszustand herrscht.



**Bild 8.7:** Kettenordnungsparameter  $S_{CD}$ , aufgetragen über die C-Atome der Acylketten bei den Simulationen in DMPC (oben) und POPC (unten), gemittelt von 10-20ns der Simulationszeit

In Bild 8.7 oben ist der Kettenordnungsparameter  $S_{CD}$  der Simulation in DMPC für beide Myristoyl-Ketten zu sehen. Die Anwesenheit von TFB führt zu einer etwas höheren Kettenordnung als bei der Simulation mit purem DMPC berechnet. Die Kettenordnung in Anwesenheit von TFB<sup>-</sup> ist im Gegensatz dazu deutlich erniedrigt.

Ein ähnliches Bild zeigt sich bei den Simulationen mit POPC. TFB führt für die ungesättigte Oleoyl-Kette (Bild 8.7 links unten) und die gesättigte Palmitoyl-Kette (Bild 8.7 rechts unten) zu einer höheren Kettenordnung als bei der Simulation mit purem POPC. Die Anwesenheit von TFB<sup>-</sup> setzt die Ordnung der ungesättigten Ketten etwas nach unten, auf die gesättigte Kette hat es kaum Einfluss. Bis zum Kohlenstoffatom 6 ist die Kettenordnung leicht erhöht, danach ist sie etwas niedriger als im Vergleich mit purem POPC.

## 8.4 Diskussion

### *Bevorzugter Aufenthaltsort und Ausrichtung*

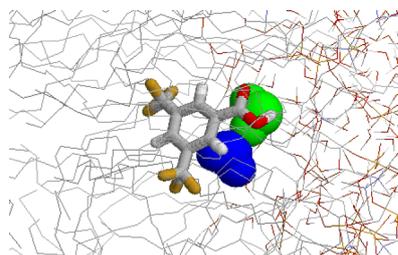
**TFB.** Ist TFB in der wässrigen Phase platziert, wandert es aus dem Bulk-Wasser zu den Kopfgruppen, durch diese hindurch in die Membran und lagert sich im äußeren Soft-Polymer-Bereich an der Grenze zu den Glycerin-Gruppen an. Die im Inneren platzierten Moleküle wandern ebenfalls nach außen in diesen Bereich. Aus den Umbrella Sampling Simulationen lässt sich der energetisch günstigste Aufenthaltsort für TFB auf etwa 1,1nm von der Membranmitte entfernt festlegen.

Der Grund für diesem bevorzugten Aufenthaltsort liegt in der Säure-Gruppe, welche mit den Sauerstoffatomen der Kopfgruppe Wasserstoffbrückenbindungen eingeht. In Tabelle 8.5 ist der Anteil an Wasserstoffbrückenbindungen, den TFB mit Wasser und POPC eingeht, aufgelistet. Die Wasserstoffbrückenbindungen wurden aufgrund geometrischer Faktoren ausgewertet, ausschlaggebend ist dabei der Abstand zwischen Donor- und Akzeptormolekülen, welcher kleiner 0,35nm sein muss, sowie der Winkel zwischen Donor-Wasserstoff-Akzeptor, welcher maximal 30° betragen darf. Sind diese Kriterien zwischen potentiellen Donor- und Akzeptormolekülen erfüllt, liegt ein Wasserstoffbrückenbindung vor. Die Wasserstoffbrückenbindungen mit Atomen der POPC-Moleküle sind nochmals extra aufgeteilt in Wasserstoffbrücken mit der Phosphatgruppe und Wasserstoffbrücken mit der Carboxylgruppe. TFB geht zu einem gewissen Anteil mit Wasser Wasserstoff-Brückenbindungen ein. Die Diffusion von TFB aus der wässrigen Phase in die Membran zeigt jedoch, dass der Gewinn an freier Enthalpie groß genug ist, als dass ein Aufenthalt im Wasser energetisch gerechtfertigt wäre.

Auffallend ist der hohe Anteil an mit Wasser eingegangenen Wasserstoffbrücken des in der Membran platzierten TFB1. Die Erklärung liegt darin, dass TFB1 Wasserstoffbrücken mit in die Membran diffundierten Wassermolekülen ausbildet und diese sich daraufhin über einige Nanosekunden am TFB1 anlagern. (Bild 8.8)

**Tabelle 8.5:** Anteil der von TFB mit Wasser und POPC ausgebildeten Wasserstoffbrückenbindungen, die Anteile der mit POPC ausgebildeten Wasserstoffbrücken sind nochmals unterteilt in den Anteil, den die Phosphorgruppe und die Glyceringruppe daran hat

	TFB1	TFB2	TFB3	TFB4	TFB5	TFB6	Mittel
POPC	33,7%	93,5%	81,9%	85,5%	86,3%	81,9%	76,5%
H <sub>2</sub> O	66,3%	6,5%	18,1%	14,5%	13,7%	18,1%	23,5%
PO <sub>4</sub>	0,4%	0,0%	56,0%	100,0%	3,2%	0,1%	29,7%
CO <sub>2</sub>	99,6%	100,0%	44,0%	0,0%	96,8%	99,9%	70,3%



**Bild 8.8:** Ausschnitt aus einem Schnappschuss der Simulation von TFB in POPC bei  $t = 16078\text{ps}$ ; zu sehen ist das Molekül TFB1 in der Membran, umgeben von zwei Wassermolekülen, welche in Grün und Blau markiert sind

Die meisten Wasserstoffbrücken werden mit der Carboxyl-Gruppe der Glyceringruppe eingegangen. Lediglich die außen platzierten TFB3 und TFB4 gehen auch mit den Sauerstoffatomen der Phosphorgruppe Wasserstoffbrücken ein. Für TFB ist die bevorzugte Lage die, dass die Säure-Gruppe mit den Glycerin- und Kopfgruppen Wasserstoffbrückenbindungen eingeht und der hydrophobe Ring in die Acylketten ragt. Wasserstoffbrückenbindungen sind sehr stabil (ca. 20-30kJ/mol). Hat das Molekül eine Wasserstoffbrücken geknüpft, wird die Ausrichtung nicht mehr verändert. So kommt es während der gesamten Simulationszeit bei dem in der Membran platzierten TFB1 zu keiner Drehung um die molekulare  $y$ -Achse (Anhang A7.2).

Eine ähnliche Beobachtung machte Mukhopdhyay (2004) mit Pentachlorphenol. Auch dieses Molekül lagert sich bevorzugt in der Soft-Polymer-Region an, seine OH-Gruppe geht mit den Glycerin- und Kopfgruppen Wasserstoffbrückenbindungen ein. Auch Salicylsäure in DMPC-Membranen zeigt dieses Verhalten (Anézo, 2003b). Der bevorzugte Aufenthaltsort hier ist die äußere Soft-Polymer-Region, die Ausrichtung der Moleküle ist so, dass die Säuregruppen überwiegend mit den Carboxyl-Gruppen Wasserstoffbrücken eingehen.

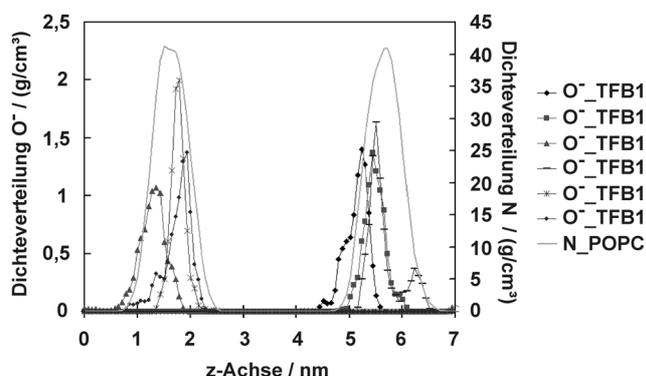
**TFB<sup>-</sup>.** Die in der Membran platzierten TFB<sup>-</sup>-Moleküle haben ihren bevorzugten Aufenthaltsort in der Membran im Bereich 2, dem Übergangsbereich Kopfgruppen-Glyceringruppen. Im Wasser ist TFB<sup>-</sup> sehr gut löslich. Natrium-Benzoat hat bspw. eine Löslichkeit von 3,8mol/L (Benzoessäure: 0,02mol/L). Ist es im Wasser platziert, so diffundiert es sofort in den Übergangsbereich des disturbed waters nahe den Kopfgruppen. Der Gewinn an freier Enthalpie scheint jedoch genügend Antrieb zu geben, dass zwei der drei außerhalb

der Membran platzierten Moleküle bereits während 20ns Simulation durch die Kopfgruppen in die Membran wandern. Tatsächlich ist die Differenz an freier Enthalpie zwischen Bulk-Wasser und bevorzugtem Aufenthaltsort in der Membran mit  $-6\text{kJ/mol}$  leicht negativ. Eine Wanderung über die Membranmitte hinweg findet nicht statt und ist aufgrund der negativen Ladung des Moleküls auch nicht zu erwarten. Die zu überwindende freie Enthalpiedifferenz zwischen dem bevorzugten Aufenthaltsbereich und der Membranmitte liegt bei  $44\text{kJ/mol}$ . Dies ist eine realistische Größe. Ulander et al. berechneten die freien Enthalpieprofile von Valproinsäure, einer kurzkettigen Fettsäure und der deprotonierten Form, dem Valproat in DPPC mittels Constraint-Simulationen. Die freie Enthalpiedifferenz  $\Delta G(z)$  für Valproat zwischen den Kopfgruppen und der Membranmitte lag für  $323\text{K}$  bei etwa  $60\text{kJ/mol}$  (Ulander, 2003).

Die Ausrichtung ist ähnlich der der ungeladenen Form. Die  $\text{COO}^-$ -Gruppe richtet sich bevorzugt so aus, dass sie zu den Kopfgruppen zeigt, egal ob sich das Molekül außerhalb der Membran oder innerhalb befindet. Dies deutet auf eine starke Wechselwirkung zwischen der  $\text{COO}^-$ -Gruppe und einer Gruppe in der Kopfgruppe hin. Die stärkste Wechselwirkung wäre die zwischen dem negativ geladenen Sauerstoffatom der Carboxyl-Gruppe mit der Ladung  $-1$  und der positiv geladenen Gruppe um das Stickstoffatom  $\text{N}(\text{CH}_3)_3$  mit einer Teilladung von  $+0,7$  (für DMPC und POPC). Dies würde auch erklären, warum TFB<sup>-</sup> weiter außen in den Kopfgruppen zu finden ist als TFB.

Die Wechselwirkung zwischen diesen beiden Gruppen kann aus der Simulation nur indirekt nachgewiesen werden, wie etwa durch die Auftragung der Dichteverteilung von Stickstoff und dem negativ geladenen Sauerstoffatom (Bild 8.9).

Die höchste Aufenthaltswahrscheinlichkeit der Sauerstoff- und Stickstoffatome finden sich im gleichen Bereich, wobei Stickstoff einen sehr breiten Aufenthaltsbereich hat. Des Weiteren wurden die Abstände zwischen den Stickstoff-Atomen und den Sauerstoffatomen während der Simulation überprüft. Legt man eine Kugel mit dem Radius  $0,5\text{nm}$  um die Stickstoffatome, so finden sich bei  $40\%$  der simulierten Zeit negativ geladene Sauerstoffatome in diesem Umkreis.



**Bild 8.9:** Dichteverteilung der negativ geladenen Sauerstoffatome der TFB<sup>-</sup>-Moleküle und aller Stickstoff-Atome der POPC-Moleküle über die gesamte Simulationszeit

*Verteilungskoeffizient*

Der Verteilungskoeffizient von TFB ist nicht bekannt, der von Benzoesäure ist  $\log K_{O/W} = 1,87$ . Der Gewinn an freier Enthalpie beim Diffundieren aus dem Wasser in die Membran liegt bei  $-38,7 \text{ kJ/mol}$ , was einem deutlich größeren Verteilungskoeffizienten von  $\log K_{M/W} = 6,7$  entspricht. Die beiden Trifluoromethylgruppen scheinen das hydrophobe Verhalten von TFB, verglichen mit dem der Benzoesäure zu verstärken. Es muss jedoch bedacht werden, dass der tatsächliche Verteilungskoeffizient abhängig vom pH-Wert und eventuellen Umprotonierungsvorgängen in den Kopfgruppen ist und zwischen den beiden Extrema von TFB und TFB<sup>-</sup>, also zwischen 6,7 und 1,0 liegt.

Katzer et al. fanden für das Pflanzenhormon ABA ( $pK_s \approx 5$ ), einer kleinen Säure mit ringähnlicher Struktur, sehr hohe Verteilungskoeffizienten zwischen Wasser und Lipid-Membranen. Diese wurden mittels Differenztemperatur-Kalorimetrie (DSC) bestimmt und lagen, abhängig von der Kettenlänge der Lipide zwischen 6,2 und 7,3 (Katzer, 2003). Das kann daraufhin deuten, dass deprotonierte Säuren bei ihrer Diffusion in die Membran protoniert werden und es so zu einer besseren Löslichkeit in der hydrophoben Phase kommt. Unterstützt wird die hohe Affinität zur Membran durch den hydrophil-hydrophoben Übergangsbereich zwischen Kopfgruppen und Acylketten. In diesem Bereich können sich amphiphile Moleküle so ausrichten können, dass hydrophile und hydrophobe Teile mit den entsprechenden Gruppen wechselwirken können. Ulander et al. schlugen aufgrund der simulierten freien Enthalpie-Profile von Valproinsäure und Valproat ebenfalls Protonierungen im Bereich der Kopfgruppe vor, da sich so aus beiden Profilen der freien Enthalpie das energetisch günstigste Profil über die Membran ableiten lässt (Ulander, 2003).

*Vergleich der simulierten und experimentell ermittelten Ordnungsparameter*

Die Simulationen von TFB/TFB<sup>-</sup> in DMPC bei 343K wurden durchgeführt, um eine anschauliche Hilfestellung bei der Interpretation von <sup>19</sup>F-NMR-Spektren von Sechs-Spin-Systemen zu liefern. Aufgrund der Simulationen wurde bestätigt, dass sich die Moleküle mit der Carboxyl-Gruppe zu den Kopfgruppen hin entlang der Membrannormalen orientieren. Zusätzlich wurde eine Drehung um die x-Achse des Moleküls, Ring-Flop genannt, festgestellt, durch welche die CF<sub>3</sub>-Gruppen vertauscht und deren Signale ausgemittelt werden. Beide Ergebnisse gingen in das Auswertemodell ein.

Vergleicht man die aus den NMR-Daten ermittelten Parameter mit denen aus den Simulationen, fällt auf, dass sie sich um drei bis vier Größenordnungen unterscheiden. Hier spielt eine eventuell zu kurze Simulationszeit eine Rolle.

Zum Einen sind die Rotationsbewegungen um die molekulare x-Achse der TFB-Moleküle etwas langsamer als beispielsweise die von Pyren (vergleiche Anhang A7.2 und A7.3). Daher

ist die simulierte Zeit unter Umständen noch nicht ausreichend, um für alle eine gute Mittelung der Ring-Flops zu erreichen.

Zum Anderen besteht die Möglichkeit, dass noch andere, deutlich langsamere Bewegungsmodi eine wesentliche Rolle spielen. Die sehr niedrigen Ordnungsparameter aus den NMR-Versuchen deuten darauf hin, dass es zu wesentlich mehr Umorientierungen in und an der Membran kommt, die in den NMR-Experimenten zwar ausgemittelt werden, in den Simulationen jedoch nicht sichtbar sind.

So liegen in der Realität nie nur deprotonierte oder protonierte Moleküle vor. Es ist sehr wahrscheinlich, dass es zu Umprotonierungen kommt, die nicht simuliert werden können. Geht man z. B. davon aus, dass die negativ geladene TFB-Form vorliegt, ist durchaus denkbar, dass eine Diffusion aus der Membran in den Übergangsbereich und eine damit verbundene Umorientierung (wie man am TFB3 der Simulation erkennen kann) der Moleküle stattfindet. Genauso ist eine Reprotonierung und eine Rückdiffusion in die Membran möglich. Aufgrund der wesentlich höheren Anzahl an Molekülen tritt dieses Ereignis wahrscheinlich oft genug ein und hat so einen entscheidenden Einfluss auf die Ordnungsparameter.

Würde man über hundert oder mehr Nanosekunden simulieren, sähe man vielleicht eine Diffusion von TFB<sup>-</sup> aus der Membran. Dieses eine Ereignis würde jedoch immer noch nicht ausreichen, um eine bessere Ausmittlung der Ordnungsparameter zu erreichen. Um einen ähnlich guten Vergleich wie bei Pyren zwischen simulierten und experimentell ermittelten Daten zu erhalten, wäre es daher sinnvoll sowohl wesentlich längere Zeiten als auch Mischungen aus TFB und TFB<sup>-</sup> zu simulieren.

#### *Einfluss von TFB/TFB<sup>-</sup> auf die Kettenordnung*

Der Einfluss auf die Kettenordnung ist vom bevorzugten Aufenthaltsort der Moleküle abhängig. TFB findet sich hauptsächlich im Soft-Polymer-Bereich nahe der Glycerin-Gruppen. Seine Anwesenheit führt sowohl in DMPC-Membranen als auch in POPC-Membranen zu einer etwas höheren Kettenordnung. PCP, welches sich generell sehr ähnlich dem TFB verhält, hat den gleichen Effekt auf POPC und POPE-Membranen (Mukhopadhyay, 2004). Die Kettenordnung der gesättigten und der ungesättigten Ketten ist in Anwesenheit von PCP leicht erhöht. Solch kleine Moleküle im Soft-Polymer-Bereich haben also, ähnlich Cholesterin, eine höher geordnete und damit weniger durchlässige Membran zur Folge.

Die negativ geladene Form hat auf die Kettenordnung der gesättigten Acylkette der POPC-Membran kaum einen Einfluss, die Ordnung der ungesättigten Kette ist leicht erniedrigt. In der DMPC-Membran erniedrigt sich die Kettenordnung in Anwesenheit von TFB<sup>-</sup> sogar deutlich. Die TFB<sup>-</sup>-Moleküle finden sich vor allem im Bereich der Glycerin-Gruppen. Ihre Anwesenheit dort wirkt offensichtlich störend auf die weitere Ordnung der Acylketten und es kommt zu einer insgesamt ungeordneteren und durchlässigeren Membran.

## 8.5 Zusammenfassung

Da zu TFB so gut wie keine experimentellen Daten vorlagen, kann man diese Simulationen durchaus als Testfall für die Verhaltens- und Datenvorhersage aus MD-Simulationen werten. Insgesamt stimmt das simulierte Verhalten sich TFB und TFB<sup>-</sup> mit dem erwarteten Verhalten gut überein.

Bei TFB überwiegen die mit den hydrophoben Wechselwirkungen verbundenen Antriebskräfte und es wandert aus der wässrigen Phase in die Membran. Dort findet man es im Soft-Polymer-Bereich in einer energetisch günstigen Ausrichtung. Die Carboxyl-Gruppe geht mit den Glycerin-Sauerstoffatomen Wasserstoffbrückenbindungen ein, der hydrophobe Ring zeigt zu den hydrophoben Acylketten.

In der Membran verhält sich TFB<sup>-</sup> ähnlich, nur dass es etwas weiter außen in der Membran sitzt, so dass es zu Wechselwirkungen zwischen dem Sauerstoff-Anion und der Stickstoff-Gruppe kommen kann.

Aus den Profilen der freien Enthalpie ist ersichtlich, dass TFB<sup>-</sup> aufgrund der negativen Ladung auch im Außenbereich der Membran zu finden ist, bei längerer Simulationsdauer ist es durchaus möglich, dass Moleküle aus der Membran in die wässrige Phase diffundieren.

Da in realen Stoffsystemen je nach pH-Wert ein gewisser Anteil protoniert, bzw. deprotoniert vorliegt, wird sich insgesamt ein Mischverhalten aus den beiden Molekülarten einstellen. Weder die geladene noch die ungeladene Form werden passiv durch die Membran ins Zellinnere diffundieren.

Die aus dem freien Enthalpieprofil errechneten Differenzen  $\Delta G$  sind für beide TFB-Arten in sinnvollen Größenbereichen, so dass davon ausgegangen werden kann, dass auch die daraus errechneten Verteilungskoeffizienten in etwa der Realität entsprechen, wobei stets der aktuelle pH-Wert berücksichtigt werden muss.

Die Simulationen waren auch eine wichtige Ergänzung zur Auswertung der NMR-Spektren. Zum einen wurde die bisher vermutete Ausrichtung der COOH-Gruppen zu den Kopfgruppen hin bestätigt. Aus den Simulationen wurde zudem der sogenannte Ring-Flip, das heißt die Drehung um die x-Achse des Moleküls nachgewiesen, welcher bisher in den Auswertemodellen nicht berücksichtigt wurde. Daraufhin wurde das Auswertemodell neu überarbeitet und die Daten konnten besser angepasst werden. Durch längere Simulationszeiten und einer Mischung aus TFB und TFB<sup>-</sup>-Molekülen ließe sich vielleicht eine noch größere Angleichung der simulierten Ordnungsparameter an die experimentell ermittelten erreichen.



# Kapitel 9

## Benzol

### 9.1 Einleitung

Benzol ist das kleinste und beweglichste Molekül, das simuliert wurde. Bestehend aus einem aromatischen Ring ist es vollkommen symmetrisch. In der Literatur finden sich bereits eine Reihe unterschiedlicher Simulation mit Benzol in Phospholipid-Doppelschichten, so dass Vergleichsmaterial zur Verfügung steht.

In diesem Kapitel werden zunächst die Ergebnisse aus drei 10ns-Simulationen mit Benzol bei 285K, 300K und 315K und den Umbrella Sampling Simulationen bei 285K und 300K vorgestellt und verglichen. Anschließend werden die Daten anhand von Literaturwerten diskutiert.

### 9.2 Durchgeführte Simulationen

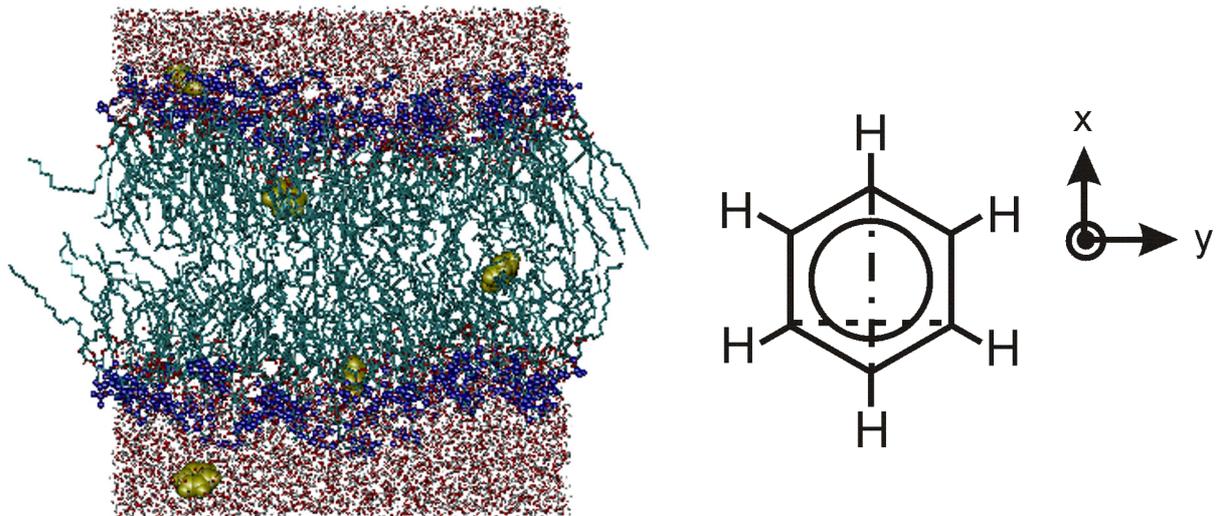
Die mit Benzol in POPC-Membranen durchgeführten Simulation und ihre wichtigsten Parameter sind in Tabelle 9.1 zusammengefasst.

**Tabelle 9.1:** Durchgeführte Simulationen und ihre wichtigsten Parameter

Art	Lipid	#Moleküle	Temperatur/K	Druck/bar	Länge/ns	cut-off	$R_c$ /nm
MD	POPC	5	285	1	10	cut-off	1,8
MD	POPC	5	300	1	10	cut-off	1,8
MD	POPC	5	315	1	10	cut-off	1,8
Art	Lipid	Konstante $K_s$ / kJ/(mol*nm <sup>2</sup> )	Temperatur/K	Druck/bar	Anzahl/ Länge	cut-off	$R_c$ /nm
US	POPC	3600	285	1	29/je 2ns	PME	1,0
US	POPC	3600	300	1	29/je 2ns	PME	1,0

Es wurden bei gleicher Ausgangskonfiguration drei Simulationen bei den Temperaturen 285K, 300K und 315K durchgeführt. Die simulierte Zeit war jeweils 10ns. Ein Schnappschuss der Ausgangskonfiguration ist in Bild 9.1 zu sehen.

Die Umbrella Sampling Simulationen, sowie die Auswertung wurden wie in Kapitel 8.2 beschrieben durchgeführt. Simuliert wurde bei den zwei Temperaturen 285K und 300K.

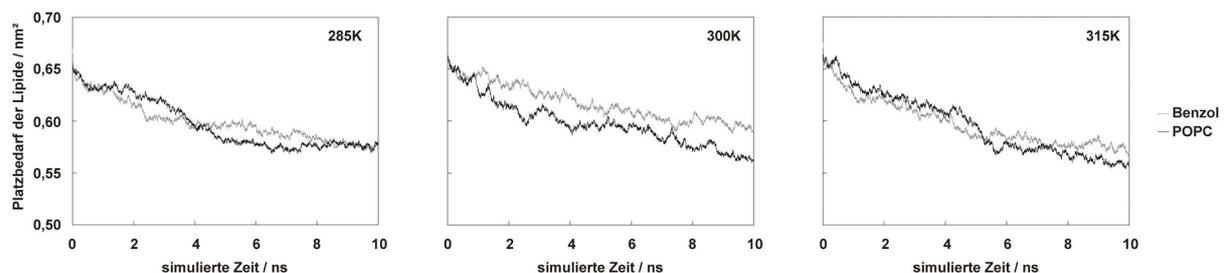


**Bild 9.1:** Schnappschuss der Ausgangskonfiguration ( $t=0\text{ns}$ ) der Benzolsimulationen (links) und Darstellung des internen Koordinatensystems von Benzol (rechts), die x-Achse  $\text{---}\cdot\text{---}$ , y-Achse  $\text{---}\text{---}$ ; die z-Achse steht senkrecht zu den beiden Achsen und verläuft parallel zur Ringnormalen

## 9.3 Ergebnisse

### 9.3.1 Platzbedarf der Lipide, Bewegung und Verteilung

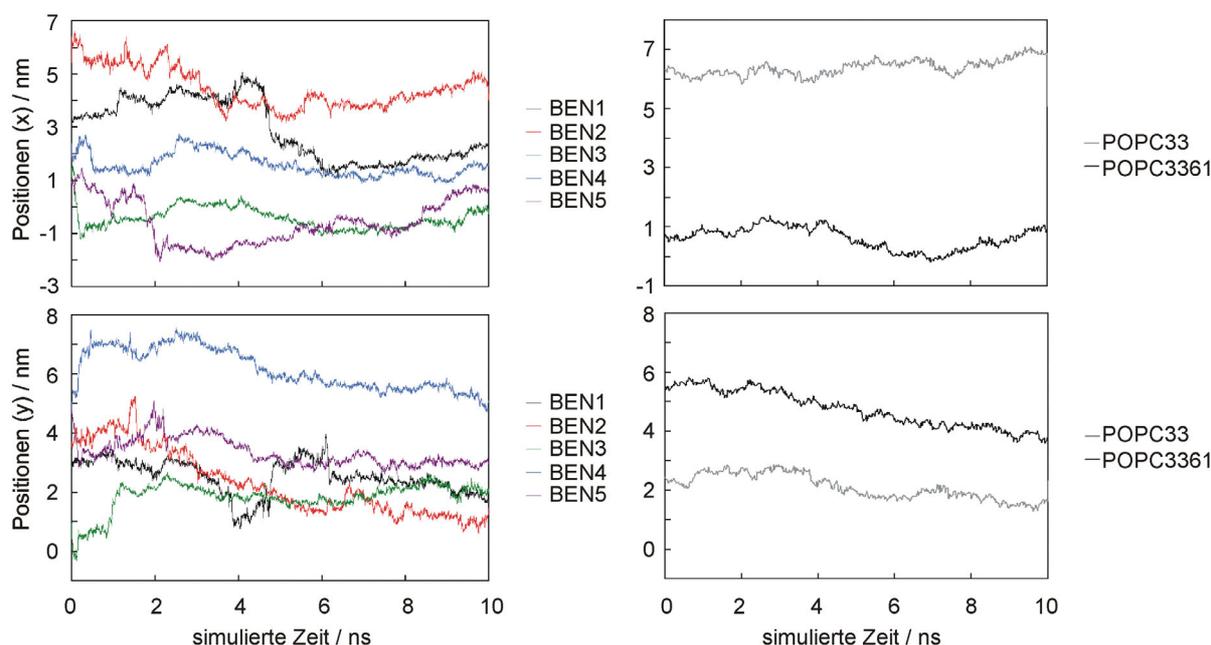
Da jeweils nur 10ns bei Cut Off simuliert wurden, trat bei keiner Simulation eine Konvergenz des Lipid-Platzbedarfs ein (Bild 9.2). Daher wurde darauf verzichtet, die Kettenordnungsparameter  $S_{CD}$  zu diskutieren, da dies zu evtl. verfälschenden Ergebnissen geführt hätte.



**Bild 9.2:** Platzbedarf der Lipide in  $\text{nm}^2$  über die simulierte Zeit in ns in Ab- und Anwesenheit von Benzol bei 285K, 300K und 315K

Die Bewegung der Benzol-Moleküle (links) und POPC-Molekülen (rechts) in x- und y-Richtung bei 300K ist in Bild 9.3 zu sehen. An den teilweise parallelen Verläufen erkennt man auch hier ein Mitschleppen von Benzol mit den Lipid-Molekülen. Benzol zeigt aber im Gegensatz zu Pyren und TFB auch eine Beweglichkeit entgegen der Lipid-Bewegungsrichtung. Beispiel hierfür ist das während der gesamten Simulation in der Membran platzierten BEN1, welches in x- und y-Richtung entgegen der Lipid-Richtung

diffundiert. Solange sich die zu Beginn außen platzierten Moleküle BEN3 und BEN5 noch in der wässrigen Phase befinden, diffundieren diese ebenfalls ungerichtet in x- und y-Richtung.

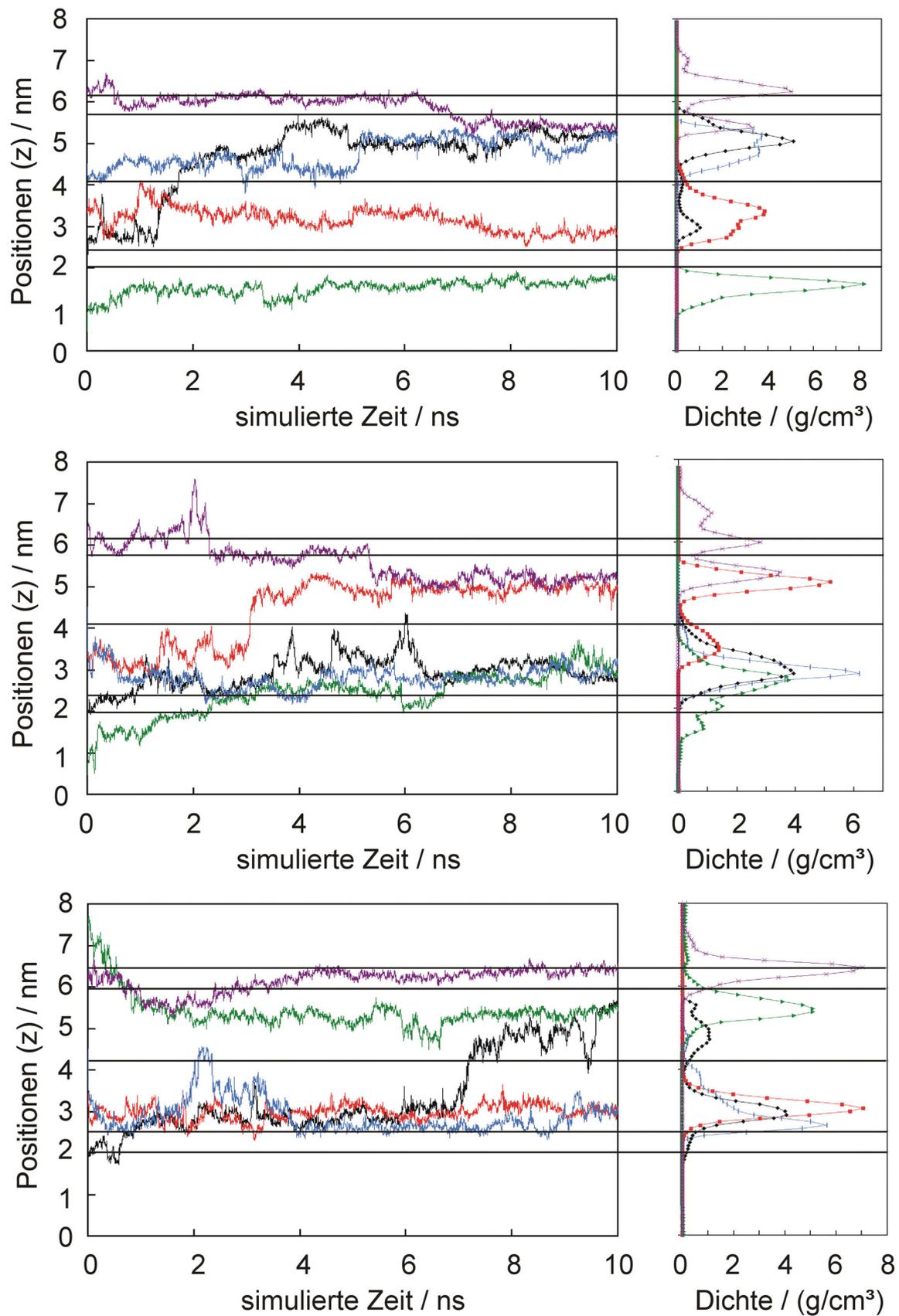


**Bild 9.3:** Bewegung der Schwerpunkte der Benzol-Moleküle in x- und y-Richtung bei 300K (links) und zweier POPC-Moleküle aus je einer Membranhälfte (rechts) über die simulierte Zeit

In Bild 9.4 ist die Bewegung in z-Richtung und die Dichteverteilung bei den drei simulierten Temperaturen aufgetragen. Bei 285K wandert nur eines (BEN5) der zwei außen platzierten Moleküle in die Membran, das zweite (BEN3) diffundiert zwar in Richtung Kopfgruppen und lagert sich dort an, tritt aber während der simulierten 10ns nicht durch diese ins Membraninnere über. BEN5 verweilt etwa 6 ns in den Kopfgruppen, bevor es in die Soft-Polymer-Region wandert. Die im Inneren der Membran platzierten Moleküle zeigen eine hohe Beweglichkeit und diffundieren von der Soft-Polymer-Region zur Membranmitte und umgekehrt (BEN2, BEN4), bzw. diffundieren von einer Membranhälfte in die andere (BEN1).

Bei 300K wandern beide außen platzierten Moleküle unmittelbar nach Beginn der Simulation zur Membran und in die Kopfgruppen. Bevor sie in die Soft-Polymerregion diffundieren, verweilen sie 2-4ns im Bereich der Kopfgruppen. Die innen platzierten Molekülen diffundieren durch die verschiedenen Bereiche der Membran und auch über die Membranmitte hinweg (BEN2).

Bei 315K diffundieren BEN3 und BEN5 innerhalb 1ns aus der wässrigen Phase zur Membran, durch die Kopfgruppen in die Soft-Polymer-Region. BEN5 diffundiert dann zurück in den Bereich der Kopfgruppen und bleibt während der weiteren Simulationszeit dort. Die restlichen Benzol-Moleküle diffundieren über alle Bereiche der Membran und auch bei 315K kommt es zum Übertritt von einer Membranhälfte in die andere (BEN1).

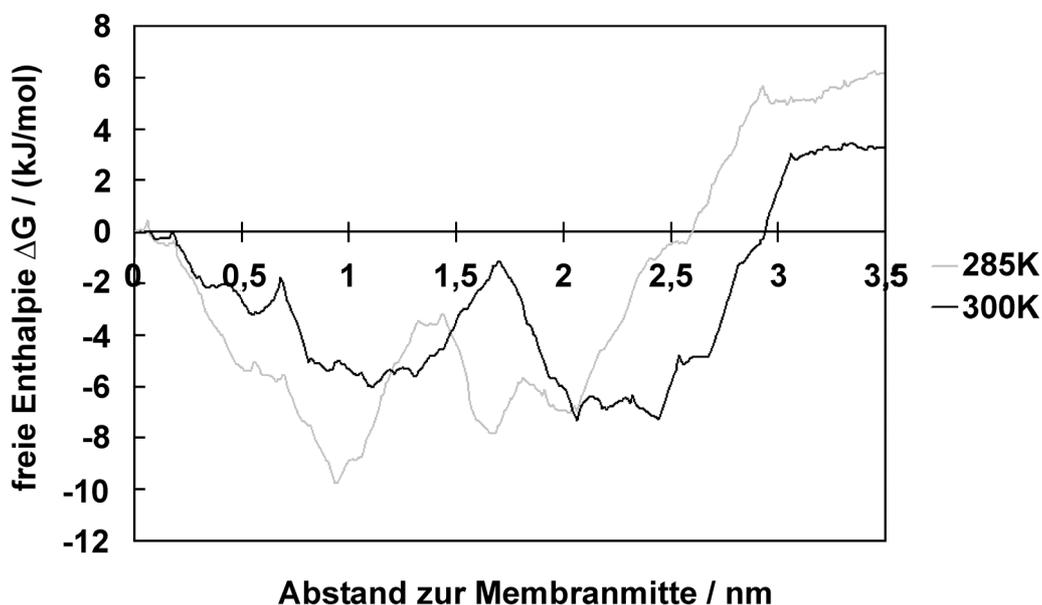


**Bild 9.4:** links: Positionen der Benzol-Moleküle bei 285K (oben), 300K (Mitte) und 315K (unten) über die simulierte Zeit, rechts: Verteilung der Dichte der Benzol-Moleküle in (g/cm<sup>3</sup>) über die gesamte Simulationszeit. Legende siehe Bild 9.2

Aus der Verteilung der Dichte ist erkennbar, dass der bevorzugte Aufenthaltsbereich für Benzol in der Membran der Soft-Polymer-Bereich ist. Dies schließt einer Wanderung in den Kopfgruppen-Bereich, zur Membranmitte oder gar in die andere Hälfte der Membran nicht aus. Mit steigender Temperatur nimmt die Neigung, sich in anderen Bereichen als der Soft-Polymer-Region aufzuhalten, ab.

### 9.3.2 Die freie Enthalpie $\Delta G$

Bild 9.5 zeigt den Verlauf der freien Enthalpie  $\Delta G$  über eine Membranhälfte bei 285K und 300K, normiert auf  $\Delta G = 0 \text{ kJ/mol}$  bei  $z = 0 \text{ nm}$ . Die höchsten freien Enthalpien finden sich im Bereich des Bulk-Wassers. Zur Membran hin fällt  $\Delta G$  ab. Bei 300K gibt es ein Minimum im Bereich des disturbed waters nahe der Kopfgruppen, einen Peak im Übergangsbereich der Phospho-Gruppen, ein zweites Minimum im Soft-Polymer-Bereich und einen leichten Anstieg zur Membranmitte hin. Auch bei 285K ist  $\Delta G$  im Bereich des Bulk-Wassers am größten und fällt zur Membran hin ab. Der Verlauf ist gegenüber dem von 300K etwas verschoben. Das erste Minimum liegt im Gebiet des „disturbed waters“ sehr nahe am äußeren Kopfgruppen-Bereich, der Anstieg findet sich im Übergangsbereich der Glyceringruppen, ein weiteres Minimum im Soft-Polymerbereich und schließlich einen Anstieg zur Membranmitte hin.



**Bild 9.5:** freie Enthalpie  $\Delta G$  (kJ/mol), berechnet aus Umbrella Sampling Simulationen mit je einem Benzol für eine Membranhälfte, aufgetragen über den Abstand zur Membranmitte ( $z = 0 \text{ nm}$ ) bei 285K und 300K

Die Differenz der freien Enthalpie  $\Delta G$  wurde zwischen der Bulk-Wasserphase ( $z = 3,5 \text{ nm}$ ) und Bereich des ersten Enthalpie-Minimums ( $z = 1 \text{ nm}$ ), bzw. des zweiten Enthalpie-Minimums ( $z = 2 \text{ nm}$ ) berechnet. Aus dem Differenzen wurde nach Gleichung 4.33 der Verteilungskoeffizient  $\log K_{M/W}$  ermittelt. Die Werte sind in Tabelle 9.2 zusammengefasst.

**Tabelle 9.2:** Differenzen der freien Enthalpie  $\Delta G$  aus Umbrella Sampling Simulationen bei verschiedenen Temperaturen, sowie die daraus berechneten Verteilungskoeffizienten, verglichen mit experimentellen Daten

	285 K	300 K
$\Delta G_{m/w}$	-6,1	-3,3
$\Delta G_{b1/w}$	-15,0	-8,6
$\Delta G_{b2/w}$	-13,1	-9,3
$\Delta G_{m/b1}$	8,9	5,4
$\log K_{M/W}(b1/w)$	2,8	1,5
$\log K_{M/W}(b2/w)$	2,4	1,6
$\log K_{O/W}$		2,13 <sup>b</sup>

M: Membran; m: Membranmitte,  $z = 0\text{nm}$ ; b1: bevorzugter Aufenthaltsort 1; b2: bevorzugter Aufenthaltsort 2; W: Wasser; w: Bulk-Wasser,  $z = 3,5\text{nm}$ ; O: Oktanol; <sup>b</sup>Cheremisinoff, 1979

### 9.3.3 Orientierung

Benzol zeigt keine bevorzugte Orientierung, weder außerhalb noch innerhalb der Membran, wie Tabelle 9.3 zeigt. Die über die gesamte Simulationszeit gemittelten Werte von  $S_{XX}$ ,  $S_{YY}$  und  $S_{ZZ}$  (siehe Bild 9.4) liegen für die 5 Benzolmoleküle nahe Null. Werte um Null entsprechenden einem ungeordneten Zustand, die Benzol-Moleküle rotieren frei um alle Molekülachsen.

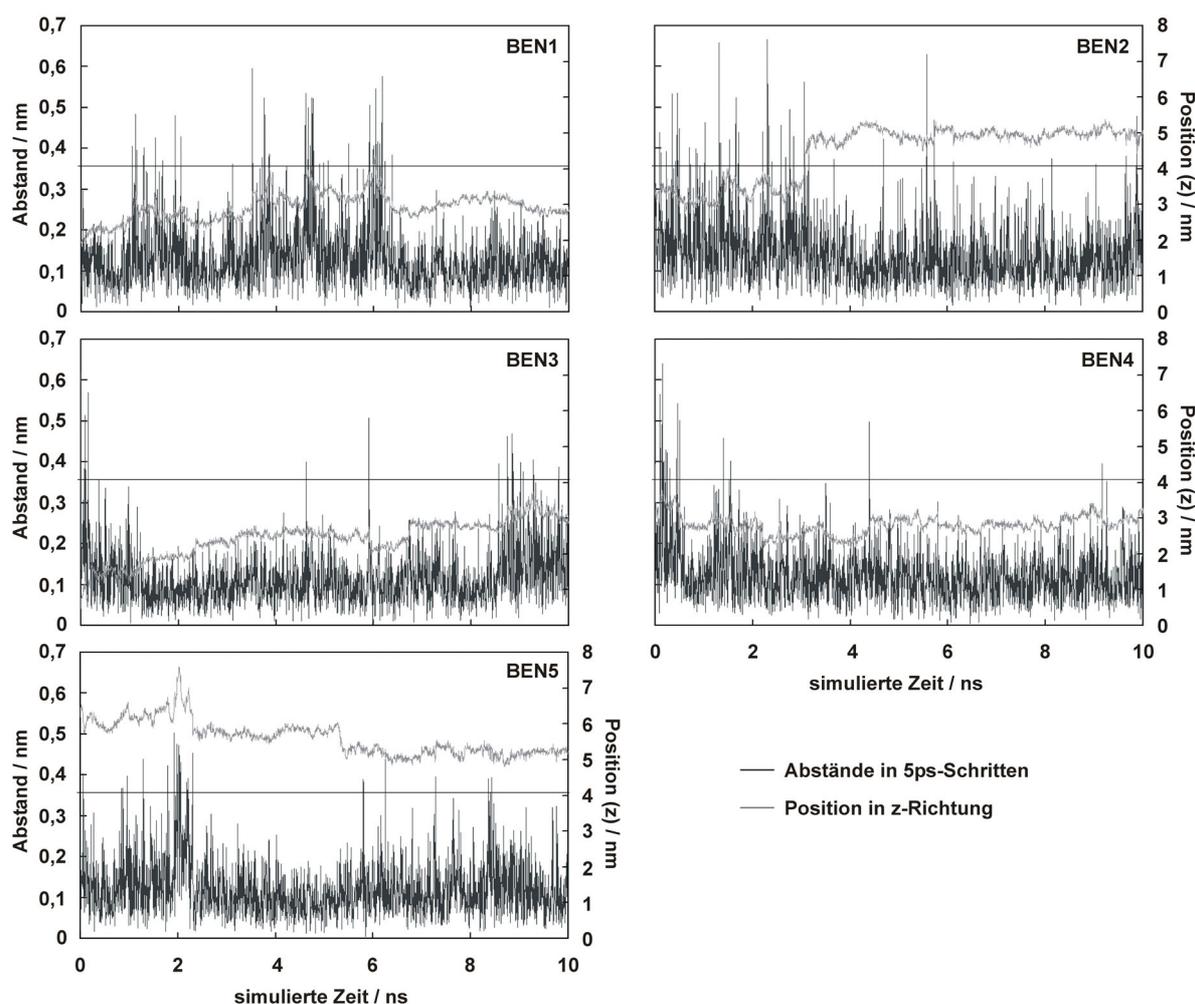
**Tabelle 9.3:** Ordnungsparameter  $S_{XX}$ ,  $S_{YY}$  und  $S_{ZZ}$  der Benzolmoleküle, gemittelt über die gesamte Simulationsdauer bei 285K, 300K und 315K

	S	BEN1	BEN2	BEN3	BEN4	BEN5	Mittel
285K	$S_{XX}$	0,08	0,10	0,07	0,11	-0,06	0,06
	$S_{YY}$	0,07	0,09	0,04	0,13	-0,06	0,05
	$S_{ZZ}$	-0,15	-0,19	-0,11	-0,23	0,12	-0,11
300K	$S_{XX}$	0,05	0,05	0,06	-0,02	0,08	0,04
	$S_{YY}$	0,05	0,05	0,04	-0,02	0,10	0,04
	$S_{ZZ}$	-0,10	-0,10	0,10	0,04	-0,16	-0,04
315K	$S_{XX}$	0,09	0,04	0,04	-0,02	0,16	0,06
	$S_{YY}$	0,07	0,04	0,04	-0,03	0,14	0,05
	$S_{ZZ}$	-0,17	-0,10	-0,09	0,05	-0,28	-0,11

## 9.4 Diskussion

### *Diffusion und Verteilung*

Betrachtet man die Aufenthaltswahrscheinlichkeiten (Bild 9.3), wird ersichtlich, dass mit steigender Temperatur Benzol offenbar die äußeren Region der Membran, also den Soft-Polymer-Bereich als Aufenthaltbereich bevorzugt. Dies bedeutet nicht, wie etwa bei Pyren, dass sich Benzol nur in diesem Bereich aufhält. Es kommt bei allen Temperaturen zur Wanderung von Benzol-Molekülen entlang der z-Achse, teilweise in die Kopfgruppen oder sogar in die andere Membranhälfte. Bassolino et al. simulierten Benzol in DMPC-Doppelschichten (Bassolino-Klimas, 1993, 1995). Obwohl sie lediglich eine Nanosekunde simulierten, erkannten sie ebenfalls diese Tendenz. Mehrere Gründe wurden für dieses Verhalten genannt. Das freie Volumen in der DMPC-Membran ist mit steigender Temperatur anders verteilt. Da man sich die Diffusion von Benzol als „Hopping“ von einer Lücke zur nächsten vorstellt, spielt die Verteilung der Lücken natürlich eine Rolle. Zwar stand keine Analyse des freien Volumen in POPC-Membranen zur Verfügung, aber ein Vergleich der zurückgelegten Abstände in 5ps-Rhythmus bei 300K brachte folgendes Ergebnis (Bild 9.6).



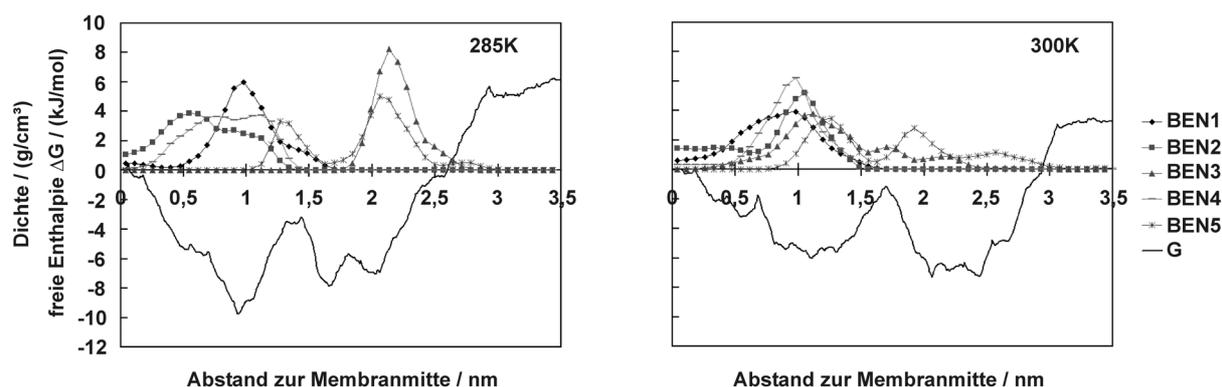
**Bild 9.6:** Abstände in nm, welche die Benzol-Moleküle während 5ps-Schritten zurückgelegt haben (schwarz) und die dazugehörige Position in z-Richtung (grau) über die simulierte Zeit in ns bei 300K

Hielten sich die Benzol-Moleküle in der Nähe der Membranmitte auf (vor allem BEN1 und BEN2), so waren die zurückgelegten Abstände innerhalb von 5ns deutlich größer als der Durchschnitt, es gab überdurchschnittlich viele Peaks größer 0,3nm. Dies ist eine Bestätigung, dass vor allem in der Membranmitte der überwiegende Fortbewegungsmechanismus der des Hoppings ist.

Des weiteren wurde spekuliert, dass ungünstigere energetische Verhältnisse herrschen, wenn die Benzol-Moleküle in der Membranmitte sind. Da die Beweglichkeit der Kettenenden sehr hoch ist, könnte die Anwesenheit von Benzol dort die Entropie herabsetzen. Mit steigender Temperatur werden die Kettenenden noch beweglich, damit wird der Aufenthalt von Benzol-Molekülen unwahrscheinlicher. Die „Entropiestrafe“ für einen Aufenthalt in der Membranmitte wäre also mit steigender Temperatur ungleich höher als bei einem Aufenthalt in weniger beweglichen Teilen der Membran.

Im Vergleich der unrestriktierten Simulation mit den Ergebnissen aus den Umbrella Sampling Simulationen zeigt sich, dass in der Membran ein Minimum der freien Enthalpie im Bereich der Soft-Polymer-Region zu finden ist. Um von einer in die andere Membranhälfte zu gelangen ist die zu überwindende freie Enthalpie  $\Delta G = 5-9\text{kJ/mol}$ , was deutlich kleiner ist als bei Pyren oder TFB.

Ein zweites freies Enthalpie-Minimum liegt im äußeren Bereich der Kopfgruppen, bzw. des disturbed waters. Offensichtlich ist hier ein weiteres bevorzugtes Aufenthaltsgebiet für Benzol. Ein Vergleich zwischen unrestriktierten Simulationen und Umbrella Sampling Simulationen zeigt deutlich, dass dieser zweite Bereich auch von den außen platzierten Molekülen besetzt wird, bevor diese in die Membran diffundieren (Bild 9.7).



**Bild 9.7:** Vergleich der freien Enthalpie  $G$  aus den Umbrella Sampling Simulationen mit der normierten Verteilung der Dichte der Benzol-Moleküle aus den unrestriktierten Simulation über den Abstand zur Membranmitte bei 285K (links) und 300K (rechts)

In diesem Bereich ist die freie Enthalpie etwa genauso groß wie im Soft-Polymer-Bereich. Die zu überwindende Differenz der freien Enthalpie liegt bei etwa  $6\text{kJ/mol}$ . Bemporad et al. errechneten ein Profil der freien Enthalpie für Benzol über eine DPPC-Membran mittels Constraint-Simulationen. Zwar besitzt dieses Profil nur 10 Stützstellen pro Membranhälfte,

ein leichter Anstieg der freien Enthalpie im Bereich der Kopfgruppen ist auch hier zu erkennen. Die zu überwindende Energiebarriere ist etwa 5-10kJ/mol (Bemporad, 2004). Damit ein Benzol-Molekül in die Membran wandert, muss es daher genügend kinetische Energie besitzen, um durch den Kopf- und Glyceringruppen-Bereich zu diffundieren. Bei 285K sehen wir, dass nur ein Benzol-Molekül diese Wanderung innerhalb von 10ns schafft. Das zweite dringt nicht einmal in den Bereich der Kopfgruppen ein. Bei 300K wandern beide außen platzierten Moleküle in die Membran, die Verweilzeit in den Kopfgruppen liegt bei etwa 2-4ns, während bei 315K innerhalb einer Nanosekunde beide Moleküle in der Membran sind. Eine höhere Temperatur (verbunden mit mehr kinetischer Energie) begünstigt, ähnlich wie bei Pyren die Diffusion in die Membran. Eine umgekehrte Diffusion aus der Membran in den Bereich des „disturbed waters“ sehen wir bei einer Simulationszeit von 10ns jedoch nicht, obwohl diese durchaus möglich wäre.

Aus der Temperatur kann man auf mittlere kinetische Energie der Moleküle nach  $E_{\text{kin}} = (3/2)k_{\text{B}}/T$  schließen. Für 300K liegt die mittlere kinetische Energie demnach bei 3,7kJ/mol. Um den Bereich der Kopfgruppen zu überwinden, bzw. um über die Membranmitte zu diffundieren, ist lediglich 5-6kJ/mol nötig. Geht man davon aus, dass eine gewisse Verteilung der kinetischen Energie vorliegt, ist die Überwindung beider Barrieren energetisch denkbar. Bei der Diffusion über die Membranmitte erleichtert die Möglichkeit des Hoppings zusätzlich eine Wanderung in die andere Membranhälfte.

#### *Verteilungskoeffizient*

Aus der Differenz der freien Enthalpie lässt sich der Verteilungskoeffizient  $\log K_{\text{M/W}}$  von der Bulk-Wasserphase zum bevorzugten Aufenthaltsbereich des Benzols in der Membran zu 2,8 bei 285K und 1,5 bei 300K berechnen. Die Werte für den bevorzugten Aufenthaltsort außerhalb der Membran sind mit 2,4 und 1,6 fast identisch. Diese Werte liegen in der gleichen Größenordnung wie der Oktanol-Wasser Verteilungskoeffizienten  $\log K_{\text{O/W}}$ , welcher 2,13 ist. Hier ist die Diskrepanz zwischen errechnetem und experimentellem Wert nicht so gravierend wie bei Pyren. Experimentelle Daten in POPC-Membranen liegen nicht vor, jedoch bestimmten De Young et al. Verteilungskoeffizienten von Benzol für DMPC-, DLPC- und DPPC-Membranen in Abhängigkeit der Temperatur und des Cholesteringehalts. Auf diese Art und Weise beeinflussten sie die Packungsdichte der Membran. Mit steigender Packungsdichte verkleinerte sich der Verteilungskoeffizient. Sie fanden Werte zwischen 3 und 3,7 (De Young, 1988). Eine steigende Packungsdichte bedeutet eine weniger fluide und durchlässige Membran.

Die kleineren Verteilungskoeffizienten, zusammen mit den im Vergleich zu TFB und Pyren deutlich niedrigeren Werten der freien Enthalpie im Bulk-Wasser erklären auch die bessere Löslichkeit des hydrophoben Benzols in Wasser (Benzol: 0,82g/L  $\leftrightarrow$  Pyren: 0,135mg/L). Ein Grund dafür könnte wieder die Ladungsverhältnisse im Benzol-Molekül sein, denen zu Folge der negativ polarisierte Ring als Akzeptor für Wasserstoffbrückenbindungen dienen

kann (Levitt, 1988). Auch wenn in unseren Simulationen eine solche Polarisation nicht explizit berücksichtigt wird, wurde in anderen Simulationen eine Bereitschaft des aromatischen Rings nachgewiesen als Akzeptor für Wasserstoffbrückenbindungen zu fungieren (Meng, 1996).

### *Orientierung*

Bei der Orientierung zeigt sich, dass das kleine symmetrische Molekül keinerlei Vorzugsausrichtung hat. Auch die Ringebene ist nicht vorzugsweise parallel zur Membrannormalen ausgerichtet. Dies weist auf eine sehr hohe Rotationsbeweglichkeit um alle drei Achsen hin. Bestätigt wird das auch durch die annähernd statistische Verteilung der Rotationswinkel um die molekulare x- und y-Achse (Anhang A7.4). Dies heißt jedoch nicht, dass die Lücken zwischen den Ketten sogar im Soft-Polymerbereich so groß sind, dass Benzol frei um alle Molekülachsen rotieren kann, vielmehr ist die Rotation in Kombination mit gleichzeitiger lateraler und axialer Beweglichkeit zu sehen. Es ist denkbar, dass Benzol bei der Bewegung um die Acylketten rotiert.

## **9.5 Zusammenfassung**

Benzol ist das kleinste und beweglichste Molekül, welches simuliert wurde. Es kann relativ ungehindert innerhalb von POPC-Membranen diffundieren und ist auch in seinen Rotationsbewegungen nicht eingeschränkt. Aus den Simulationen zeigte sich keine bevorzugte Ausrichtung des Moleküls.

Mit steigender Temperatur hält sich Benzol jedoch bevorzugt in den äußeren Bereichen der Membran, der Soft-Polymer-Region auf. Dies wurde bereits in anderen Simulationen erkannt. Es ist dennoch nicht ortsgebunden und kann aus dieser Region in andere Regionen der Membran, auch über die Membranmitte in die andere Hälfte der Membran diffundieren. Energetisch ist es auch denkbar, dass es aus der Membran in die wässrige Phase wandert. Anhand der Umbrella Sampling Simulationen zeigte sich im Bereich des disturbed waters ein weiterer energetisch günstiger Aufenthaltsbereich für Benzol. Dies konnte im simulierten Zeitraum von 10ns jedoch nicht beobachtet werden.

Der Diffusionsmechanismus in der Membran kann mit dem Hopping-Mechanismus umschrieben werden. Beim Überwinden größerer Entfernung in der Membran kommt es zu Bewegungssprüngen. Diese treten auch dann sehr häufig dann auf, wenn sich das Molekül in der Nähe der Membranmitte aufhält. Das weist auf größere freie Volumina in der Membranmitte hin, zwischen denen Benzol hin- und herspringen kann.

Der aus der Umbrella Sampling Simulation bestimmte Verteilungskoeffizient stimmt gut mit experimentell ermittelten Daten überein.

## Kapitel 10

---

### Zusammenfassung

---

Phospholipid-Membranen sind der Grundbaustein jeder Zellmembran. In Form von Liposomen werden sie vielfältig in der Forschung und in kommerziellen Produkten eingesetzt. In der vorliegenden Arbeit wurde das Transport-Verhalten aromatischer Stoffe an und in Phospholipid-Membranen mittels molekulardynamischer (MD) Simulationen und Festkörper-NMR an orientierten Phospholipid-Doppelschichten untersucht. Die ausgewählten Aromaten unterschieden sich in Größe und Hydrophobizität und deckten so eine gewisse Bandbreite der Aromaten ab, die in Natur und Technik eine Rolle spielen.

Das Verhalten der ausgewählten Aromaten Pyren, Benzol, 3,5-(Bis-) Trifluoromethyl-Benzoessäure (TFB) und deren konjugierte Base  $\text{TFB}^-$  wurde mittels unrestringierter und restringierter MD-Simulation bei verschiedenen Temperaturen im Bereich zwischen 285K und 315K charakterisiert. Dazu wurde die Diffusion aus der wässrigen Phase in die Membran, die Verteilung in der Membran, die Orientierung der Aromaten in der Membran, sowie deren Einfluss auf die Kettenordnung der Acylketten analysiert. Zusätzlich lieferten Umbrella Sampling Simulationen Profile der freien Enthalpie  $G$  des gelösten Stoffes über die Membran, aus denen Verteilungskoeffizienten berechnet werden konnten.

Daneben wurden  $^2\text{H}$ -NMR-Untersuchungen an orientierten POPC-Doppelschichten in Ab- und Anwesenheit von Pyren durchgeführt, um eine Validierung der simulierten Daten mit experimentellen Daten zu ermöglichen. Dabei musste insbesondere darauf geachtet werden, dass die Versuchsbedingungen so weit wie möglich den Bedingungen in den Simulationen entsprachen, um einen direkten Vergleich der Ergebnisse beider Methoden zu gewährleisten.

Alle untersuchten Aromaten lagern sich unabhängig von ihrer Größe und Ladung bevorzugt in der Soft-Polymer-Region an, also dem Bereich der Membran, in dem die Packungsdichte der Ketten am größten und das freie Volumen, sowie die Beweglichkeit am kleinsten ist. Die Gründe dafür sind jedoch unterschiedlich.

Pyren und Benzol bevorzugen diesen Bereich aus energetischen und sterischen Gründen. Benzol ist klein genug, um in der Membran und zwischen den Membranhälften zu diffundieren, es nutzt dazu das freie Volumen in der Membran und springt von „Lücke zu Lücke“. Die Anwesenheit in der Membranmitte wird jedoch durch die hohe Beweglichkeit der Kettenenden (vor allem bei steigender Temperatur) gestört und führt zu einem Entropieverlust. Daher hält es sich bevorzugt, aber nicht ausschließlich in der Soft-Polymer-Region auf.

Pyren ist zu groß, um diesen Hopping-Mechanismus zu nutzen. Außerdem würde seine Anwesenheit in der Membranmitte zu einer ungleich größeren Entropiestrafe führen. Da ein Aufenthalt für Pyren aufgrund seiner Hydrophobizität auch in der Kopfgruppenregion energetisch ungünstig ist, bleibt nur der Soft-Polymer-Bereich. Es ist in keiner Simulation zu einer Wanderung von Pyren aus der Membran oder von einer Hälfte der Membran in die andere Hälfte gekommen.

Bei TFB spielen vor allem die hydrophilen Wechselwirkungen eine Rolle. Es hält sich bevorzugt in der Soft-Polymer-Region auf, weil die hydrophile Carboxylgruppe so Wasserstoffbrückenbindungen mit den Sauerstoffatomen der Glycerin- und der Phosphatgruppe eingehen kann. Der hydrophobe Rest ragt in die Acylketten. Ein noch deutlicheres Bild ergibt sich beim ladungsbehafteten TFB<sup>-</sup>. Diese Moleküle sind vor allem im äußersten Soft-Polymer-Bereich und in den Glyceringruppen zu finden. So kann die negative Ladung mit den positiven Ladungen der Kopfgruppe wechselwirken und der hydrophobe Ring mit den Acylketten.

Die in den unrestrictierten Simulationen gefundenen Verteilungen wurden durch restriktierte Umbrella Sampling Simulationen durchweg bestätigt. Aus diesen Simulationen erhielt man ein Profil der freien Enthalpie der untersuchten Moleküle über die Membran. Die Minima der freien Enthalpie fanden sich alle im Soft-Polymer-Bereich. Es wurde gezeigt, dass die Diffusion aus dem wässrigen Phase in die Membran immer mit einem Gewinn an freier Enthalpie verbunden ist. Das bedeutet, dass das gesamte System nach der Diffusion der gelösten Stoffe in die Membran in einem energetisch günstigeren Zustand ist. Die aus den Profilen der freien Enthalpie berechneten Verteilungskoeffizienten lagen alle in einem sinnvollen Größenbereich und wurden, soweit vorhanden, sehr gut durch experimentelle Daten bestätigt.

Aus <sup>2</sup>H-NMR und <sup>19</sup>F-NMR Untersuchungen und aus den Simulationen wurden Ordnungsparameter zur Überprüfung der Orientierung der Moleküle in der Membran gewonnen. Dabei wurde darauf geachtet, dass experimentelles und simuliertes System hinsichtlich ihrer Umgebungsbedingungen und Membranbeladung identisch waren. So konnte erstmals ein direkter Vergleich zwischen simulierten und experimentell ermittelten Ordnungsparametern durchgeführt werden.

Die Ergebnisse der <sup>2</sup>H-NMR Untersuchungen zur Orientierung von Pyren bestätigten die simulierten Ergebnisse sehr gut. Die NMR-Daten unterschieden sich teilweise erst in der zweiten Nachkommastelle von den simulierten Daten. Bedenkt man die starken Vereinfachungen in den MD-Simulationen, sind das sehr gute Ergebnisse. Möglich war dies deshalb, da sich die Simulation mit Pyren innerhalb weniger Nanosekunden in einem quasistationären Zustand befand, ähnlich dem in den NMR-Versuchen. Pyren führte keine

gerichtete Diffusion entlang der Membrannormalen mehr aus, die laterale Bewegung war an die Membranbewegung gekoppelt. Die Zeitkonstanten der Rotations-Bewegungen, welche Pyren in der Membran ausführt, waren hinreichend klein, um in der kurzen simulierten Zeit ausgemittelt zu werden. Prinzipiell ist die Längsachse und die Ringebene des Pyren-Moleküls bevorzugt parallel zur Membrannormalen ausgerichtet, auf diese Weise wird die Ordnung der Acylketten am wenigsten gestört.

Zu den Simulation mit TFB lagen mittels  $^{19}\text{F}$ -NMR bestimmte Ordnungsparameter vor. In diesem Fall unterschieden sich simulierte und experimentelle Daten um 3-4 Größenordnungen. Gründe waren ein im realen System sehr wahrscheinliches Mischverhalten von TFB und  $\text{TFB}^-$ , verbunden mit Protonierungsvorgängen, welche nicht in der Simulation wiedergegeben werden können. Dadurch kann es während der NMR-Experimente zur Diffusion in die Membran und aus der Membran kommen, welche mit einer Umorientierung der Moleküle an der Membranoberfläche einhergehen. In den experimentell bestimmten Ordnungsparametern werden all diese Bewegungen im freien Induktionsabfall FID über mehrere Millisekunden bis Sekunden gemittelt. Die Zeit von wenigen Nanosekunden Simulation reicht in diesem Fall nicht aus, alle Bewegungsabläufe zu erfassen und auszumitteln und eine gute Anpassung der experimentell ermittelten und simulierten Ordnungsparameter zu erhalten.

Dennoch war ein Einsatz der Simulationen hier sinnvoll. So lieferten die Simulationen wertvolle Zusatzinformationen, die eine Auswertung der NMR-Daten erleichterten. Es konnte die vermutete Orientierung der Moleküle in der Membran bestätigt werden. So richtet sich die hydrophile  $\text{COOH}/\text{COO}^-$ -Gruppe zu den hydrophilen Kopfgruppen hin aus, der hydrophobe Ring zeigt in Richtung der Glyceringruppen und Acylketten. Schnelle Bewegungsmodi, wie die Rotation um die Molekül-Längsachse wurden in den Simulationen detektiert und mussten bei der Interpretation der Spektren berücksichtigt werden. Am Beispiel der Simulationen mit TFB und  $\text{TFB}^-$  konnte der prädikative Einsatz von MD-Simulationen belegt werden.

Will man also MD-Simulationen einsetzen, um aus mikroskopischen Strukturänderungen auf makroskopische Stoffgrößen zu schließen, muss man sich der Grenzen, insbesondere der zeitlichen und räumlichen Rahmenbedingungen bewusst sein. Für schnelle Vorgänge im Nanosekundenbereich sind unrestrictierte MD-Simulationen ein sehr anschauliches Mittel.

Stoffdaten beschreiben jedoch meist Gleichgewichtszustände, so dass geprüft werden muss, ob bei einem simulierten System Nano- bis Microsekunden zum Erreichen eines quasistationären Zustands ausreichen. Ist dies nicht der Fall, bietet sich der Einsatz restriktierter MD-Simulationen, z. B. Umbrella-Sampling Simulation an. Sie können bei der Berechnung oder Interpretation schwer zugänglicher oder stark von der Messmethode abhängiger thermodynamischer Größen, wie Transferenergien oder Verteilungskoeffizienten eine gute Alternative oder Ergänzung zu experimentellen Methoden sein.

Voraussetzung dafür ist natürlich ein optimiertes Kraftfeld, welches für das zu untersuchende Stoffsystem geeignet ist, sowie eine gute Abstimmung aller in der Simulation eingesetzten Parameter. Trotz der teils beträchtlichen Vereinfachungen, die zur Kraftfeld-Simulation von Atomen und Molekülen angenommen werden, lässt sich durch Vergleich mit experimentellen Befunden eine sehr gute Wiedergabe der Realität finden. Neue, genauere, jedoch teils rechenzeitaufwändigere Verfahren zur Berechnung weitreichender Wechselwirkungen, eine der größten Fehlerquellen der MD-Simulationen, können heute dank gesteigerter Prozessorleistung und optimierter Algorithmen eingesetzt werden.

Das in dieser Arbeit verwendete Gromacs-Kraftfeld, welches für Lipide und Proteine optimiert ist, wurde für sehr unterschiedliche Aromaten (geladen, fluoriert, chloriert etc.) ohne weitere Anpassung in allen Simulationen verwendet. Mit einem Parametersatz bietet sich so eine breite Anwendung, mit dem sich das Verhalten aromatischer Verbindungen in Lipid-Membranen sehr gut vorhersagen lässt. Eine Lipid-Membran hat zwar nur wenige Nanometer Durchmesser, zeichnet sich jedoch durch eine sehr komplexe Struktur aus. Die vielfältigen Wechselwirkungen in und an der Membran werden in den Simulationen sehr anschaulich und genau wiedergegeben. Daher eignet sich diese Methode sehr gut zur Aufklärung von Vorgängen in biologischen Systemen, wie der Adsorption gelöster Stoffe an Zellmembranen oder der Funktionsweise von Membranproteinen.

Mit der Möglichkeit, in Zukunft auch größere Simulationszellen in vertretbarem Zeitaufwand zu berechnen, wird auch die Simulationen anderer (künstlicher) Membranen, wie etwa Polymermembranen mit einer größeren räumlich Ausdehnung denkbar. Neben größeren Simulationszellen sind inzwischen auch die simulierten Zeiten deutlich gestiegen. Waren vor drei Jahren noch Simulationszeiten von wenigen Nanosekunden Stand der Technik, so werden heute mehrere hundert Nanosekunden simuliert.

Trotz der oben erwähnten Einschränkungen bietet diese Methode im Bereich der Verfahrenstechnik überall dort Einsatzmöglichkeiten, wo Vorgänge auf molekularer Ebene, insbesondere an Grenzflächen, ausschlaggebend sind für das makroskopische Verhalten des gesamten Stoffsystems. Dies ist zum Beispiel bei der Vorhersage von Adsorptionsvorgängen an Membranen und der damit verbundenen Auslegung von Membraneigenschaften der Fall. Kondensationsvorgänge aus der Gasphase könnten ebenso simuliert werden, wie Vorgänge in mikrostrukturierten Fluiden, etwa micellaren Systemen und Emulsionen, wie sie täglich in der Lebensmittelverfahrenstechnik zum Einsatz kommen. In diesen Fällen könnten die Simulationen helfen, experimentelle Daten vorherzusagen oder zu bestätigen und deren Interpretation auf molekularer Ebene zu erleichtern.

---

## Literaturverzeichnis

---

- Adams, M. C., Moore, J. N., Fabry, L. G., and Ahn, J.-H. (1992). Thermal stabilities of aromatic acids as geothermal tracers. *Geothermics* **21**, 323-339.
- Allinger, N. L., Yuh, Y. H., and Lii, J. H. (1989). Molecular Mechanics - the Mm3 Force-Field for Hydrocarbons .1. *Journal of the American Chemical Society* **111**, 8551-8566.
- Allinger, N. L., Chen, K. S., and Lii, J. H. (1996). An improved force field (MM4) for saturated hydrocarbons. *Journal of Computational Chemistry* **17**, 642-668.
- Andersen, H. C. (1980). Molecular-Dynamics Simulations at Constant Pressure and-or Temperature. *Journal of Chemical Physics* **72**, 2384-2393.
- Anézo, C., de Vries, A. H., Holtje, H. D., Tieleman, D. P., and Marrink, S. J. (2003a). Methodological issues in lipid bilayer simulations. *Journal of Physical Chemistry B* **107**, 9424-9433.
- Anézo, C. (2003b). Molecular models for drug permeation across phospholipid membranes. Dissertation, Universität Düsseldorf. Elektronische Dissertation. <http://diss.ub.uni-duesseldorf.de/ebib/diss/show?dissid=600>.
- Arnaud, J. P. (1998). Liposome-based functional drinks. *Agro Food Industry Hi-Tech* **9**, 37-40.
- Ash, W. L., Zlomislíc, M. R., Oloo, E. O., and Tieleman, D. P. (2004). Computer simulations of membrane proteins. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* **1666**, 158-189.
- Bacey, J. (2000). Environmental Fate of Hydramethylnon. In "Fate Reviews", pp. 7. Department of Pesticide Regulation, Environmental Monitoring Branch, State of California.
- Bassolino-Klimas, D., Alper, H. E., and Stouch, T. R. (1993). Solute Diffusion in Lipid Bilayer-Membranes - an Atomic-Level Study by Molecular-Dynamics Simulation. *Biochemistry* **32**, 12624-12637.
- Bassolino-Klimas, D., Alper, H. E., and Stouch, T. R. (1995). Mechanism of Solute Diffusion through Lipid Bilayer-Membranes by Molecular-Dynamics Simulation. *Journal of the American Chemical Society* **117**, 4118-4129.
- Baumgart, T., Hess, S. T., and Webb, W. W. (2003). Imaging coexisting fluid domains in biomembrane models coupling curvature and line tension. *Nature* **425**, 821-824.
- Beckstein, O., Biggin, P. C., Bond, P., Bright, J. N., Domene, C., Grottesi, A., Holyoake, J., and Sansom, M. S. P. (2003). Ion channel gating: insights via molecular simulations. *Febs Letters* **555**, 85-90.
- Bemporad, D., Essex, J. W., and Luttmann, C. (2004). Permeation of small molecules through a lipid bilayer: A computer simulation study. *Journal of Physical Chemistry B* **108**,

4875-4884.

- Bennett, A. E., Rienstra, C. M., Auger, M., Lakshmi, K. V., and Griffin, R. G. (1995). Heteronuclear Decoupling in Rotating Solids. *Journal of Chemical Physics* **103**, 6951-6958.
- Berendsen, H. J. C. (1981). H<sub>2</sub>O interaction models for water in relation to protein hydration. In "Intermolecular forces" (B. Pullman, Ed.). D. Reidel Publishing Co., Dordrecht, The Netherlands.
- Berendsen, H. J. C., Postma, J. P. M., Vangunsteren, W. F., Dinola, A., and Haak, J. R. (1984). Molecular-Dynamics with Coupling to an External Bath. *Journal of Chemical Physics* **81**, 3684-3690.
- Berendsen, H. J. C., Vanderspoel, D., and Vandrunen, R. (1995). Gromacs - a Message-Passing Parallel Molecular-Dynamics Implementation. *Computer Physics Communications* **91**, 43-56.
- Berger, O., Edholm, O., and Jahnig, F. (1997). Molecular dynamics simulations of a fluid bilayer of dipalmitoylphosphatidylcholine at full hydration, constant pressure, and constant temperature. *Biophysical Journal* **72**, 2002-2013.
- Binder, H. (2003). The molecular architecture of lipid membranes - New insights from hydration-tuning infrared linear dichroism spectroscopy. *Applied Spectroscopy Reviews* **38**, 15-69.
- Blume, A. (1991). Biological Calorimetry - Membranes. *Thermochimica Acta* **193**, 299-347.
- Bockmann, R. A., Hac, A., Heimburg, T., and Grubmuller, H. (2003). Effect of sodium chloride on a lipid bilayer. *Biophysical Journal* **85**, 1647-1655.
- Brooks, B. R., Bruccoleri, R. E., Olafson, B. D., States, D. J., Swaminathan, S., and Karplus, M. (1983). Charmm - a Program for Macromolecular Energy, Minimization, and Dynamics Calculations. *Journal of Computational Chemistry* **4**, 187-217.
- Bruce, R. B., and Maynard, W. R. (1968). Fenfluramine Metabolism. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **57**, 1173-&.
- Cheremisinoff, P. N. (1979). "Benzene basic and hazardous properties Paul N. Cheremisinoff ; Angelo C. Morresi." Dekker, New York.
- Chiu, S. W., Jakobsson, E., and Scott, H. L. (2001). Combined Monte Carlo and molecular dynamics simulation of hydrated lipid-cholesterol lipid bilayers at low cholesterol concentration. *Biophysical Journal* **80**, 1104-1114.
- Chrai, S. S., Murari, R., and Ahmad, I. (2002). Liposomes (a review) - Part two: Drug delivery systems. *Biopharm-the Applied Technologies of Biopharmaceutical Development* **15**, 40ff.
- Chrai, S. S., Murari, R., and Ahmad, I. (2002). Liposomes (a review) - Part one: Manufacturing Issues. *Biopharm-the Applied Technologies of Biopharmaceutical Development* **15**, 28-34.

- Cornell, W. D., Cieplak, P., Bayly, C. I., Gould, I. R., Merz, K. M., Ferguson, D. M., Spellmeyer, D. C., Fox, T., Caldwell, J. W., and Kollman, P. A. (1995). A 2nd Generation Force-Field for the Simulation of Proteins, Nucleic-Acids, and Organic-Molecules. *Journal of the American Chemical Society* **117**, 5179-5197.
- Cuno, M., Weigert, B., Behrendt, J., and Wiesmann, U. (1995). Biologischer Abbau von Öl/Wasser-Emulsionen und polycyclischen Kohlenwasserstoffen (PAK). *Vom Wasser* **84**, 105-116.
- Daems, D., Vandenzegel, M., Boens, N., and Deschryver, F. C. (1985). Fluorescence Decay of Pyrene in Small and Large Unilamellar L $\alpha$ -Dipalmitoylphosphatidylcholine Vesicles above and Below the Phase-Transition Temperature. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters* **12**, 97-105.
- Darden, T., York, D., and Pedersen, L. (1993). Particle Mesh Ewald - an N.Log(N) Method for Ewald Sums in Large Systems. *Journal of Chemical Physics* **98**, 10089-10092.
- Davis, J. H., Jeffrey, K. R., Bloom, M., Valic, M. I., and Higgs, T. P. (1976). Quadrupolar Echo Deuteron Magnetic-Resonance Spectroscopy in Ordered Hydrocarbon Chains. *Chemical Physics Letters* **42**, 390-394.
- De Young, L. R., and Dill, K. A. (1988). Solute Partitioning into Lipid Bilayer-Membranes. *Biochemistry* **27**, 5281-5289.
- Deloof, H., Nilsson, L., and Rigler, R. (1992). Molecular-Dynamics Simulation of Galanin in Aqueous and Nonaqueous Solution. *Journal of the American Chemical Society* **114**, 4028-4035.
- Dill, K. A. (1990). The Meaning of Hydrophobicity. *Science* **250**, 297-297.
- Dougherty, D. A. (1996). Cation- $\pi$  interactions in chemistry and biology: A new view of benzene, Phe, Tyr, and Trp. *Science* **271**, 163-168.
- Dürr, U. (2004). Persönliche Mitteilungen.
- Egberts, E., Marrink, S. J., and Berendsen, H. J. C. (1994). Molecular-Dynamics Simulation of a Phospholipid Membrane. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters* **22**, 423-436.
- EKL. (2003). Benzol in der Schweiz. In "Schriftenreihe Umwelt", pp. 38. Bundesamt für Umwelt, Wald und Landschaft (BUWAL), Bern.
- Emsley, J. W., and Lindon, J. C. (1975). "NMR spectroscopy using liquid crystal solvents." Pergamon Pr., Oxford u.a.
- Emsley, J. W. (1996). Liquid crystals: general considerations. In "Encyclopedia of NMR" (M. Harris, R. K. Harris, and D. Grant, Eds.), pp. 2788-2799. Wiley, New York.
- Engelke, M., Jessel, R., Wiechmann, A., and Diehl, H. A. (1997). Effect of inhalation anaesthetics on the phase behaviour, permeability and order of phosphatidylcholine bilayers. *Biophysical Chemistry* **67**, 127-138.
- Galla, H.-J., and Müller, H.-J. (1988). "Spektroskopische Methoden in der Biochemie. 13

- Tabellen." Thieme, Stuttgart u.a.
- Grage, S. L., and Ulrich, A. S. (1999). Structural parameters from F-19 homonuclear dipolar couplings, obtained by multipulse solid-state NMR on static and oriented systems. *Journal of Magnetic Resonance* **138**, 98-106.
- Grage, S. L., and Ulrich, A. S. (2000). Orientation-dependent F-19 dipolar couplings within a trifluoromethyl group are revealed by static multipulse NMR in the solid state. *Journal of Magnetic Resonance* **146**, 81-88.
- Griebel, M. (2004). "Numerische Simulation in der Moleküldynamik. Numerik, Algorithmen, Parallelisierung, Anwendungen." Springer, Berlin u.a.
- Hagemeyer, A., Tarroni, R., and Zannoni, C. (1994). Determination of Orientational Order Parameters in Liquid-Crystals from Temperature-Dependent C-13 Nmr Experiments. *Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions* **90**, 3433-3442.
- Hagenmaier, H., Kaut, H., and Krauss, P. (1986). Analysis of Polycyclic Aromatic-Hydrocarbons in Sediments, Sewage Sludges and Composts from Municipal Refuse by Hplc. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* **23**, 331-345.
- Haymet, A. D. J., Silverstein, K. A. T., and Dill, K. A. (1996). Hydrophobicity reinterpreted as 'minimisation of the entropy penalty of solvation'. *Faraday Discussions*, 117-124.
- Hermans, J., Berendsen, H. J. C., Vangunsteren, W. F., and Postma, J. P. M. (1984). A Consistent Empirical Potential for Water-Protein Interactions. *Biopolymers* **23**, 1513-1518.
- Herrenbauer, M. (2002). Biosorption von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) an Mikroorganismen und Liposomen. Dissertation, Universität Karlsruhe. Shaker, Aachen.
- Hockney, R. (1970). The potential calculation and some applications. *Methods Comp. Phys.* **9**, 136-211.
- Hofsäß, C., Lindahl, E., and Edholm, O. (2003). Molecular dynamics simulations of phospholipid bilayers with cholesterol. *Biophysical Journal* **84**, 2192-2206.
- Hoover, W. G. (1985). Canonical Dynamics - Equilibrium Phase-Space Distributions. *Physical Review A* **31**, 1695-1697.
- Hückel, E. (1931). Quantentheoretische Beiträge zum Benzolproblem I. Die Elektronenkonfiguration des Benzols und anderer verwandter Verbindungen. *Z. Phys* **70**, 204-286.
- IARC. (1983). Polynuclear Aromatic Compounds, Part 1: Chemical, Environmental and Experimental Data. In "IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans and their Supplements", Vol. 32, pp. 477. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.
- IARC. (1987). Overall Evaluations of Carcinogenicity: An Updating of IARC Monographs Volumes 1 to 42. In "IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans and their Supplements", Vol. Supplement No. 7, pp. 440. International

- Agency for Research on Cancer, Lyon, France.
- Jedlovsky, P., and Mezei, M. (2003). Effect of cholesterol on the properties of phospholipid membranes. 1. Structural features. *Journal of Physical Chemistry B* **107**, 5311-5321.
- Jedlovsky, P., and Mezei, M. (2003). Effect of cholesterol on the properties of phospholipid membranes. 2. Free energy profile of small molecules. *Journal of Physical Chemistry B* **107**, 5322-5332.
- Jedlovsky, P., Medvedev, N. N., and Mezei, M. (2004). Effect of cholesterol on the properties of phospholipid membranes. 3. Local lateral structure. *Journal of Physical Chemistry B* **108**, 465-472.
- Karplus, M., and McCammon, J. A. (2002). Molecular dynamics simulations of biomolecules. *Nature Structural Biology* **9**, 646-652.
- Katzer, M., and Stillwell, W. (2003). Partitioning of ABA into bilayers of di-saturated phosphatidylcholines as measured by DSC. *Biophysical Journal* **84**, 314-325.
- Kekulé, A. (1866). "Lehrbuch der organischen Chemie oder der Chemie der Kohlenstoffverbindungen von Aug. Kekulé." Enke, Erlangen.
- Kouros, B., and Dehnen, W. (1990). Benzol - Vorkommen, biologische Wirkung und Wirkungsmechanismen. *Umwelthygiene - Jahresbericht* **22**, 110-155.
- Kox, A. J., Michels, J. P. J., and Wiegel, F. W. (1980). Simulation of a Lipid Monolayer Using Molecular-Dynamics. *Nature* **287**, 317-319.
- König, B. (1993). Untersuchungen zum Hydratationsverhalten von mit nichtionischen Tensiden modifizierten Phospholipidmembranen. In "Fakultät für Physik und Geowissenschaften". Universität Leipzig, Leipzig.
- König, B., Dietrich, U., and Klose, G. (1997). Hydration and structural properties of mixed lipid/surfactant model membranes. *Langmuir* **13**, 525-532.
- Kumar, S., Bouzida, D., Swendsen, R. H., Kollman, P. A., and Rosenberg, J. M. (1992). The Weighted Histogram Analysis Method for Free-Energy Calculations on Biomolecules .1. The Method. *Journal of Computational Chemistry* **13**, 1011-1021.
- Kunz, R. W. (1997). "Molecular modelling für Anwender. Anwendung von Kraftfeld- und MO-Methoden in der organischen Chemie." Teubner, Stuttgart.
- Lantzsch, G., Binder, H., Heerklotz, H., Wendling, M., and Klose, G. (1996). Surface areas and packing constraints in POPC/C(12)EO(n) membranes. A time-resolved fluorescence study. *Biophysical Chemistry* **58**, 289-302.
- LaRocca, C., Conti, L., Crebelli, R., Crochi, B., Iacovella, N., Rodriguez, F., TurrioBaldassarri, L., and diDomenico, A. (1996). PAH content and mutagenicity of marine sediments from the Venice lagoon. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **33**, 236-245.
- Lasic, D. (1992). Liposomes. *American Scientist* **80**, 20-31.

- Lasic, D. D. (1993). "Liposomes from physics to applications D.D.Lasic." Elsevier, Amsterdam
- Leach, A. R. (1996). "Molecular modelling. principles and applications." Longman, Harlow.
- Levitt, M., and Perutz, M. F. (1988). Aromatic Rings Act as Hydrogen-Bond Acceptors. *Journal of Molecular Biology* **201**, 751-754.
- Lindahl, E., Hess, B., and van der Spoel, D. (2001). GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis. *Journal of Molecular Modeling* **7**, 306-317.
- Ma, J. C., and Dougherty, D. A. (1997). The cation-pi interaction. *Chemical Reviews* **97**, 1303-1324.
- MacCallum, J. L., and Tieleman, D. P. (2003). Calculation of the water-cyclohexane transfer free energies of neutral amino acid side-chain analogs using the OPLS all-atom force field. *Journal of Computational Chemistry* **24**, 1930-1935.
- MacCallum, J. L. (2004). Skripte zur Berechnung der freien Enthalpie.
- MacKerell, A. D., Bashford, D., Bellott, M., Dunbrack, R. L., Evanseck, J. D., Field, M. J., Fischer, S., Gao, J., Guo, H., Ha, S., Joseph-McCarthy, D., Kuchnir, L., Kuczera, K., Lau, F. T. K., Mattos, C., Michnick, S., Ngo, T., Nguyen, D. T., Prodhom, B., Reiher, W. E., Roux, B., Schlenkrich, M., Smith, J. C., Stote, R., Straub, J., Watanabe, M., Wiorkiewicz-Kuczera, J., Yin, D., and Karplus, M. (1998). All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *Journal of Physical Chemistry B* **102**, 3586-3616.
- Madigan, M. T. (2000). "Brock biology of microorganisms Michael T. Madigan ; John M. Martinko ; Jack Parker." Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ.
- Marrink, S. J., and Berendsen, H. J. C. (1994). Simulation of Water Transport through a Lipid-Membrane. *Journal of Physical Chemistry* **98**, 4155-4168.
- Marrink, S. J., and Berendsen, H. J. C. (1996). Permeation process of small molecules across lipid membranes studied by molecular dynamics simulations. *Journal of Physical Chemistry* **100**, 16729-16738.
- Marrink, S. J., Berger, O., Tieleman, P., and Jahnig, F. (1998). Adhesion forces of lipids in a phospholipid membrane studied by molecular dynamics simulations. *Biophysical Journal* **74**, 931-943.
- Martins, J., and Melo, E. (2001). Molecular mechanism of lateral diffusion of py(10)-PC and free pyrene in fluid DMPC bilayers. *Biophysical Journal* **80**, 832-840.
- McMullen, T. P. W., and McElhaney, R. N. (1996). Physical studies of cholesterol-phospholipid interactions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **1**, 83-90.
- Meng, E. C., and Kollman, P. A. (1996). Molecular dynamics studies of the properties of water around simple organic solutes. *Journal of Physical Chemistry* **100**, 11460-11470.
- Millett, F. S., and Dailey, B. P. (1972). Nmr Determination of Some Deuterium Quadrupole

- Coupling-Constants in Nematic Solutions. *Journal of Chemical Physics* **56**, 3249-&.
- Mitragotri, S., Johnson, M. E., Blankschtein, D., and Langer, R. (1999). An analysis of the size selectivity of solute partitioning, diffusion, and permeation across lipid bilayers. *Biophysical Journal* **77**, 1268-1283.
- Mukhopadhyay, P., Vogel, H. J., and Tieleman, D. P. (2004). Distribution of pentachlorophenol in phospholipid bilayers: A molecular dynamics study. *Biophysical Journal* **86**, 337-345.
- Müller, R. H., and Mehnert, W. (1995). Neue Arzneimittel mit Nanopartikeln. *Deutsche Apotheker Zeitung* **135**, 35-41.
- Neff, J. M. (1979). "Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. sources, fates and biological effects." Applied Science Publ., London.
- Neus, J. (2002). "Aromatizität: Geschichte und mathematische Analyse eines fundamentalen chemischen Begriffs." Hyle Publications, Karlsruhe.
- Nishio, M. (2004). CH/pi hydrogen bonds in crystals. *Crystengcomm* **6**, 130-158.
- Overton, E. (1901). "Studien über die Narkose. zugl. e. Beitr. zur allgemeinen Pharmakologie." Fischer, Jena.
- Pabst, G., Rappolt, M., Amenitsch, H., Bernstorff, S., and Laggner, P. (2000). X-ray kinematography of temperature-jump relaxation probes the elastic properties of fluid bilayers. *Langmuir* **16**, 8994-9001.
- Parrinello, M., and Rahman, A. (1980). Crystal-Structure and Pair Potentials - a Molecular-Dynamics Study. *Physical Review Letters* **45**, 1196-1199.
- Pathirana, S., Connell, D. W., and Vowles, P. D. (1994). Distribution of Polycyclic Aromatic-Hydrocarbons (Pahs) in an Urban Roadway System. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **28**, 256-269.
- Patra, M., Karttunen, M., Hyvonen, M. T., Falck, E., Lindqvist, P., and Vattulainen, I. (2003). Molecular dynamics simulations of lipid bilayers: Major artifacts due to truncating electrostatic interactions. *Biophysical Journal* **84**, 3636-3645.
- Patra, M., Karttunen, M., Hyvonen, M. T., Falck, E., Lindqvist, P., and Vattulainen, I. (2003). Molecular dynamics simulations of lipid bilayers: Major artifacts due to truncating electrostatic interactions. *Biophysical Journal* **84**, 3636-3645.
- Petrasek, A. C., Kugelman, I. J., Austern, B. M., Pressley, T. A., Winslow, L. A., and Wise, R. H. (1983). Fate of Toxic Organic-Compounds in Wastewater-Treatment Plants. *Journal Water Pollution Control Federation* **55**, 1286-1296.
- Pickering, P. J., and Southern, C. R. (1997). Clean-up to chirality - Liquid membranes as a facilitating technology? *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **68**, 417-424.
- Pohorille, A., Cieplak, P., and Wilson, M. A. (1996). Interactions of anesthetics with the membrane-water interface. *Chemical Physics* **204**, 337-345.

- Powers, J. D., Kilpatrick, P. K., and Carbonell, R. G. (1989). Protein-Purification by Affinity Binding to Unilamellar Vesicles. *Biotechnology and Bioengineering* **33**, 173-182.
- Raichle, A., Traa, Y., and Weitkamp, J. (2001). Aromatics: From valuable base chemicals to surplus components? *Chemie Ingenieur Technik* **73**, 947-956.
- Rance, M., and Byrd, R. A. (1983). Obtaining High-Fidelity Spin-1/2 Powder Spectra in Anisotropic Media - Phase-Cycled Hahn Echo Spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance* **52**, 221-240.
- Rowell, J. C., Phillips, W. D., Melby, L. R., and Panar, M. (1965). Nmr Studies of Some Liquid Crystal Systems. *Journal of Chemical Physics* **43**, 3442-&.
- Saiz, L., and Klein, M. L. (2001). Structural properties of a highly polyunsaturated lipid bilayer from molecular dynamics simulations. *Biophysical Journal* **81**, 204-216.
- Saupe, A. (1964). Kernresonanzen in Kristallinen Flüssigkeiten + in Kristallinflüssigen Lösungen .I. *Zeitschrift Fur Naturforschung Part a-Astrophysik Physik Und Physikalische Chemie A* **19**, 161-171.
- Saupe, A. (1968). Recent Results in Field of Liquid Crystals. *Angewandte Chemie-International Edition* **7**, 97-112.
- Schlick, T. (2002). "Molecular modeling and simulation. an interdisciplinary guide." Springer, New York u.a.
- Seelig, J., and Waespesarcevic, N. (1978). Molecular Order in Cis and Trans Unsaturated Phospholipid Bilayers. *Biochemistry* **17**, 3310-3315.
- Shepherd, C. M., Vogel, H. J., and Tieleman, D. P. (2003). Interactions of the designed antimicrobial peptide MB21 and truncated dermaseptin S3 with lipid bilayers: molecular-dynamics simulations. *Biochemical Journal* **370**, 233-243.
- Shi, Z. S., Olson, C. A., and Kallenbach, N. R. (2002). Cation-pi interaction in model alpha-helical peptides. *Journal of the American Chemical Society* **124**, 3284-3291.
- Shilstone, G. N., Zannoni, C., and Veracini, C. A. (1989). Solute Alignment in Liquid-Crystal Solvents - the Saupe Ordering Matrix for Perylene and Pyrene. *Liquid Crystals* **6**, 303-317.
- Sims, R. C., and Overcash, M. R. (1983). Fate of Polynuclear Aromatic-Compounds (Pnas) in Soil-Plant Systems. *Residue Reviews* **88**, 1-68.
- Skoog, D. A., and Leary, J. J. (1996). "Instrumentelle Analytik. Grundlagen, Geräte, Anwendungen ; mit 86 Tabellen." Springer, Berlin u.a.
- Smondjrev, A. M., and Berkowitz, M. L. (1999). Structure of dipalmitoylphosphatidylcholine/cholesterol bilayer at low and high cholesterol concentrations: Molecular dynamics simulation. *Biophysical Journal* **77**, 2075-2089.
- Subczynski, W. K., Markowska, E., Gruszecki, W. I., and Sielewiesiuk, J. (1992). Effects of Polar Carotenoids on Dimyristoylphosphatidylcholine Membranes - a Spin-Label Study. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1105**, 97-108.

- Tieleman, D. P., and Berendsen, H. J. C. (1996). Molecular dynamics simulations of a fully hydrated dipalmitoyl phosphatidylcholine bilayer with different macroscopic boundary conditions and parameters. *Journal of Chemical Physics* **105**, 4871-4880.
- Tieleman, D. P., Marrink, S. J., and Berendsen, H. J. C. (1997). A computer perspective of membranes: molecular dynamics studies of lipid bilayer systems. *Biochimica Et Biophysica Acta-Reviews on Biomembranes* **1331**, 235-270.
- Tieleman, D. P., Forrest, L. R., Sansom, M. S. P., and Berendsen, H. J. C. (1998). Lipid properties and the orientation of aromatic residues in OmpF, influenza M2, and alamethicin systems: Molecular dynamics simulations. *Biochemistry* **37**, 17554-17561.
- Torrie, G. M., and Valleau, J. P. (1974). Monte-Carlo Free-Energy Estimates Using Non-Boltzmann Sampling - Application to Subcritical Lennard-Jones Fluid. *Chemical Physics Letters* **28**, 578-581.
- Toukmaji, A. Y., and Board, J. A. (1996). Ewald summation techniques in perspective: A survey. *Computer Physics Communications* **95**, 73-92.
- Ulander, J., and Haymet, A. D. J. (2003). Permeation across hydrated DPPC lipid bilayers: Simulation of the titrable amphiphilic drug valproic acid. *Biophysical Journal* **85**, 3475-3484.
- Ulrich, A. S. (2002). Biophysical aspects of using liposomes as delivery vehicles. *Bioscience Reports* **22**, 129-150.
- Van der Ploeg, P., and Berendsen, H. J. C. (1982). Molecular-Dynamics Simulation of a Bilayer-Membrane. *Journal of Chemical Physics* **76**, 3271-3276.
- van der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., van Buuren, A. R., Apol, E., Meulenhoff, P. J., Tieleman, D. P., Sijbers, A. L. T. M., Feenstra, K. A., van Drunen, R., and Berendsen, H. J. C. (2004). "Gromacs User Manual version 3.2."
- Verlet, L. (1967). Computer Experiments on Classical Fluids .I. Thermodynamical Properties of Lennard-Jones Molecules. *Physical Review* **159**, 98-&.
- WEB1. (2005). POPC-Membran (D. P. Tieleman). Gromacs-Quellcodes für eine POPC-Membran. <http://moose.bio.ucalgary.ca/Downloads/>
- WEB2. (2005). DMPC-Membran (D. P. Tieleman).Gromacs-Quellcodes für eine DMPC-Membran. <http://moose.bio.ucalgary.ca/Downloads/>
- WEB3. (2005). TFB als Modellsubstanz für <sup>19</sup>F-NMR (A. S. Ulrich). [http://www-ifia.fzk.de/IFIA\\_Webseiten/Webseiten\\_Ulrich/index.html](http://www-ifia.fzk.de/IFIA_Webseiten/Webseiten_Ulrich/index.html)
- Weigert, B., Cuno, M., Reinke, M., and Wiesmann, U. (1995). Study of the Biological Degradation of Polycyclic Aromatic-Hydrocarbons in a Laboratory-Scale Plant. *Acta Hydrochimica Et Hydrobiologica* **23**, 149-156.
- Winter, R., and Noll, F. (1998). "Methoden der biophysikalischen Chemie." Teubner, Stuttgart.
- Xiang, T. X., and Anderson, B. D. (1998). Influence of chain ordering on the selectivity of

- dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer membranes for permeant size and shape. *Biophysical Journal* **75**, 2658-2671.
- Yau, W. M., Wimley, W. C., Gawrisch, K., and White, S. H. (1998). The preference of tryptophan for membrane interfaces. *Biochemistry* **37**, 14713-14718.
- Zander, M. (1995). "Polycyclische Aromaten. Kohlenwasserstoffe und Fullerene." Teubner, Stuttgart.
- Zhang, W. X., Bouwer, E. J., and Ball, W. P. (1998). Bioavailability of hydrophobic organic contaminants: Effects and implications of sorption-related mass transfer on bioremediation. *Ground Water Monitoring and Remediation* **18**, 126-138.

---

## Anhang

---

### Anhang A1: Auflistung der in der Natur häufig vorkommenden Fettsäuren

#### Gesättigte Fettsäuren

<b>Kürzel</b>	<b>Nomenklatur</b>	<b>Trivialname</b>
12:0	Dodecansäure	Laurinsäure
14:0	Tetradecansäure	Myristinsäure
16:0	Hexadecansäure	Palmitinsäure
18:0	Octadecansäure	Stearinsäure
20:0	Eicosansäure	Arachinsäure
22:0	Docosansäure	Behensäure
24:0	Tetracosansäure	Lignocerinsäure

#### ungesättigte Fettsäuren

<b>Kürzel</b>	<b>Nomenklatur</b>	<b>Trivialname</b>
16:1	9-Hexadecensäure	Palmitoleinsäure
18:1	9-Octadecensäure	Ölsäure
18:2	9, 12-Octadecadiensäure	Linolsäure
18:3	9, 12, 15-Octadecatriensäure	$\alpha$ -Linolensäure
20:4	5, 8, 11, 14-Eicosatetraensäure	Arachidonsäure
22:1	13-Docosensäure	Erucasäure
24:1	15-Tetracosensäure	Nervensäure

## Anhang A2: Gromacs-Kraftfelddateien

## A2.1 Benzol – benzene.itp

```
;Benzene by Barbara Hoff
;
;
[ moleculetype ]
; Name          nrexcl
BEN              3
;
[ atoms ]
;  nr   type  resnr residue  atom  cgnr   charge   mass   typeB  chargeB   massB
;   1  CR6   1     BEN    C1    1    -0.14   12.011 ; qtot -0.14
;   2  HCR   1     BEN    H1    1     0.14    1.008 ; qtot  0
;   3  CR6   1     BEN    C2    2    -0.14   12.011 ; qtot -0.14
;   4  HCR   1     BEN    H2    2     0.14    1.008 ; qtot  0
;   5  CR6   1     BEN    C3    3    -0.14   12.011 ; qtot -0.14
;   6  HCR   1     BEN    H3    3     0.14    1.008 ; qtot  0
;   7  CR6   1     BEN    C4    4    -0.14   12.011 ; qtot -0.14
;   8  HCR   1     BEN    H4    4     0.14    1.008 ; qtot  0
;   9  CR6   1     BEN    C5    5    -0.14   12.011 ; qtot -0.14
;  10  HCR   1     BEN    H5    5     0.14    1.008 ; qtot  0
;  11  CR6   1     BEN    C6    6    -0.14   12.011 ; qtot -0.14
;  12  HCR   1     BEN    H6    6     0.14    1.008 ; qtot  0
;
[ bonds ]
;  ai  aj  funct          c0          c1          c2          c3
;   1  2  1
;   1  3  1
;   1 11  1
;   3  4  1
;   3  5  1
;   5  6  1
;   5  7  1
;   7  8  1
;   7  9  1
;   9 10  1
;   9 11  1
;  11 12  1
;
[ angles ]
;  ai  aj  ak  funct          c0          c1          c2          c3
;   1  2  3  5  1
;   1  3  4  1
;   1 11 12  1
;   1 11  9  1
;   2  1  3  1
;   2  1 11  1
;   3  1 11  1
;   3  5  6  1
;   3  5  7  1
;   4  3  5  1
;   5  7  8  1
;   5  7  9  1
;   6  5  7  1
;   7  9 10  1
;   7  9 11  1
;   8  7  9  1
;   9 11 12  1
;  10  9 11  1
;
[ pairs ]
;  ai  aj  funct          c0          c1          c2          c3
;   1  6  1
;   1  7  1
;   1 10  1
;   2  4  1
;   2  5  1
;   2  9  1
;   2 12  1
;   3  8  1
;   3  9  1
;   3 12  1
;   4  6  1
;   4  7  1
;   4 11  1
```

```

5 10 1
5 11 1
6 8 1
6 9 1
7 12 1
8 10 1
8 11 1
10 12 1
;
[ dihedrals ]
; ai aj ak al funct c0 c1 c2 c3
1 3 5 7 2
3 5 7 9 2
5 7 9 11 2
7 9 11 1 2
9 11 1 3 2
11 1 3 5 2
1 3 11 2 2
3 5 1 4 2
5 7 3 6 2
7 9 5 8 2
9 11 7 10 2
11 1 9 12 2
; Include Position restraint file
#ifdef POSRES
#include "posre.itp"
#endif

```

## A2.2 Pyren – pyrene.itp

```

; This is your topology file
; Groningen Machine for Chemical Simulation
[ moleculetype ]
; Name nrexcl
Pyrene 3
[ atoms ]
; nr type resnr residue atom cgnr charge mass typeB chargeB massB
1 CR6 1 PYR C 1 -0.14 12.011 ; qtot -0.14
2 HCR 1 PYR H 1 0.14 1.008 ; qtot 0
3 CR6 1 PYR C2 2 -0.14 12.011 ; qtot -0.14
4 HCR 1 PYR H12 2 0.14 1.008 ; qtot 0
5 CR6 1 PYR C3 3 0 12.011 ; qtot 0
6 CR6 1 PYR C4 4 -0.14 12.011 ; qtot -0.14
7 HCR 1 PYR H13 4 0.14 1.008 ; qtot 0
8 CR6 1 PYR C5 5 0 12.011 ; qtot 0
9 CR6 1 PYR C6 6 0 12.011 ; qtot 0
10 CR6 1 PYR C7 7 -0.14 12.011 ; qtot -0.14
11 HCR 1 PYR H15 7 0.14 1.008 ; qtot 0
12 CR6 1 PYR C8 8 -0.14 12.011 ; qtot -0.14
13 HCR 1 PYR H16 8 0.14 1.008 ; qtot 0
14 CR6 1 PYR C9 9 0 12.011 ; qtot 0
15 CR6 1 PYR C10 10 -0 12.011 ; qtot 0
16 CR6 1 PYR C1 11 -0.14 12.011 ; qtot -0.14
17 HCR 1 PYR H1 11 0.14 1.008 ; qtot 0
18 CR6 1 PYR C18 12 0 12.011 ; qtot 0
19 CR6 1 PYR C19 13 -0.14 12.011 ; qtot -0.14
20 HCR 1 PYR H23 13 0.14 1.008 ; qtot 0
21 CR6 1 PYR C20 14 -0.14 12.011 ; qtot -0.14
22 HCR 1 PYR H24 14 0.14 1.008 ; qtot 0
23 CR6 1 PYR C11 15 -0.14 12.011 ; qtot -0.14
24 HCR 1 PYR H2 15 0.14 1.008 ; qtot 0
25 CR6 1 PYR C12 16 -0.14 12.011 ; qtot -0.14
26 HCR 1 PYR H3 16 0.14 1.008 ; qtot 0
[ bonds ]
; ai aj funct c0 c1 c2 c3
1 2 1
1 3 1
1 5 1
3 4 1
3 6 1
5 8 1
5 10 1
6 7 1
6 9 1
8 9 1
8 15 1
9 25 1

```

## Anhang

---

```
10 11 1
10 12 1
12 13 1
12 14 1
14 15 1
14 16 1
15 18 1
16 17 1
16 21 1
18 19 1
18 23 1
19 20 1
19 21 1
21 22 1
23 24 1
23 25 1
25 26 1
[ pairs ]
; ai aj funct c0 c1 c2 c3
1 7 1
1 9 1
1 11 1
1 12 1
1 15 1
2 6 1
2 8 1
2 10 1
3 8 1
3 10 1
3 25 1
4 5 1
4 9 1
5 6 1
5 13 1
5 14 1
5 18 1
5 25 1
6 15 1
6 23 1
6 26 1
18 22 1
18 26 1
19 24 1
19 25 1
20 23 1
21 23 1
[ angles ]
; ai aj ak funct c0 c1 c2 c3
2 1 3 1
2 1 5 1
3 1 5 1
1 3 4 1
1 3 6 1
4 3 6 1
1 5 8 1
1 5 10 1
8 5 10 1
3 6 7 1
3 6 9 1
7 6 9 1
5 8 9 1
5 8 15 1
9 8 15 1
6 9 8 1
6 9 25 1
8 9 25 1
5 10 11 1
5 10 12 1
11 10 12 1
10 12 13 1
10 12 14 1
13 12 14 1
12 14 15 1
12 14 16 1
15 14 16 1
8 15 14 1
8 15 18 1
14 15 18 1
```

```

14 16 17 1
14 16 21 1
17 16 21 1
15 18 19 1
15 18 23 1
19 18 23 1
18 19 20 1
18 19 21 1
20 19 21 1
16 21 19 1
16 21 22 1
19 21 22 1
18 23 24 1
18 23 25 1
24 23 25 1
9 25 23 1
9 25 26 1
23 25 26 1
[ dihedrals ]
; ai aj ak al funct c0 c1 c2 c3
1 3 5 2 2
1 3 6 9 2
1 5 8 9 2
3 1 6 4 2
3 1 5 8 2
3 6 9 8 2
5 1 3 6 2
5 8 9 6 2
5 1 10 8 2
5 8 15 14 2
5 10 12 14 2
6 3 9 7 2
8 9 15 5 2
8 5 10 12 2
8 9 25 23 2
8 15 18 23 2
9 6 25 8 2
9 8 15 18 2
9 25 23 18 2
10 5 12 11 2
10 5 8 15 2
10 12 14 15 2
12 14 15 8 2
12 10 14 13 2
14 12 16 15 2
14 15 18 19 2
14 16 21 19 2
15 14 18 8 2
15 14 16 21 2
15 18 19 21 2
15 8 9 25 2
15 18 23 25 2
16 14 21 17 2
16 14 15 18 2
18 23 25 9 2
18 19 23 15 2
18 19 21 16 2
19 21 18 20 2
21 16 19 22 2
23 18 25 24 2
25 9 23 26 2
; Include Position restraint file
#ifdef POSRES
#include "posre.itp"
#endif

```

### A2.3 TFB – tfb\_h.itp

```

; This is your topology file
; TFB by Barbara Hoff
[ moleculetype ]
; Name nrexcl
TFB 3
[ atoms ]
; nr type resnr residue atom cgnr charge mass typeB chargeB massB
1 CR6 1 TFB C1 1 -0.140 12.0110 ; qtot -0.14
2 CR6 1 TFB C2 2 -0.140 12.0110 ; qtot -0.28

```

# Anhang

```

3   CR6   1   TFB   C3   3   -0.140   12.0110 ; qtot -0.42
4   CR6   1   TFB   C4   4   -0.140   12.0110 ; qtot -0.56
5   CR6   1   TFB   C5   5   -0.140   12.0110 ; qtot -0.70
6   CR6   1   TFB   C6   6   -0.140   12.0110 ; qtot -0.84
7     F    1   TFB   F1   1   -0.250   18.9984 ; qtot -1.09
8     F    1   TFB   F2   1   -0.250   18.9984 ; qtot -1.34
9     F    1   TFB   F3   1   -0.250   18.9984 ; qtot -1.59
10  CB    1   TFB   C7   1     0.890   12.0110 ; qtot -0.70
11  F     1   TFB   F4   5   -0.250   18.9984 ; qtot -0.95
12  F     1   TFB   F5   5   -0.250   18.9984 ; qtot -1.20
13  F     1   TFB   F6   5   -0.250   18.9984 ; qtot -1.45
14  CB    1   TFB   C8   5     0.890   12.0110 ; qtot -0.56
15  C     1   TFB   C9   4     0.480   12.0110 ; qtot -0.08
16  O     1   TFB   O1   4   -0.190   15.9994 ; qtot -0.27
17  OA    1   TFB   O2   4   -0.550   15.9994 ; qtot -0.82
18  HCR   1   TFB   H1   2     0.140    1.0080 ; qtot -0.68
19  HCR   1   TFB   H2   3     0.140    1.0080 ; qtot -0.54
20  HCR   1   TFB   H3   6     0.140    1.0080 ; qtot -0.40
21  HO    1   TFB   H4   4     0.400    1.0080 ; qtot  0

;charge for F from
[ bonds ]
; ai  aj  funct          c0          c1          c2          c3
  1   2   1
  1   3   1
  1  10   1
  2  18   1
  2   4   1
  3  19   1
  3   5   1
  4  15   1   0.1390   418400 ;ffgmxbon CB-CR6
  4   6   1
  5  14   1
  5   6   1
  6  20   1
  7  10   1   0.1360   418400 ;ffgmxbon C-F
  8  10   1   0.1360   418400
  9  10   1   0.1360   418400
 11  14   1   0.1360   418400
 12  14   1   0.1360   418400
 13  14   1   0.1360   418400
 15  16   1
 15  17   1
 17  21   1

[ pairs ]
; ai  aj  funct          c0          c1          c2          c3
  1  15   1
  1   6   1
  1  14   1
  2   7   1
  2   8   1
  2   9   1
  2  16   1
  2  17   1
  2   5   1
  2  20   1
  2  19   1
  3   7   1
  3   8   1
  3   9   1
  3  18   1
  3   4   1
  3  20   1
  3  11   1
  3  12   1
  3  13   1
  4  21   1
  4  14   1
  4  10   1
  5  10   1
  5  15   1
  6  19   1
  6  18   1
  6  17   1
  6  16   1
  6  11   1
  6  12   1
  6  13   1
 10  18   1

```

```

10 19 1
14 19 1
14 20 1
15 18 1
15 20 1
16 21 1
[ angles ]
; ai aj ak funct c0 c1 c2 c3
1 10 9 1 126.20 418.400 ;angle from calculation
1 10 8 1 126.20 418.400
1 10 7 1 126.20 418.400
1 2 18 1
1 2 4 1
1 3 19 1
1 3 5 1
2 1 10 1
2 1 3 1
2 4 15 1 120.00 418.400 ;ffgmx2bon CB-CR6-CR6
2 4 6 1
3 1 10 1
3 5 14 1
3 5 6 1
4 15 16 1 116.00 418.400 ;angle from calculation
4 15 17 1 120.00 418.400 ;ffgmxbon CR6-CB-OA
4 2 18 1
4 6 20 1
4 6 5 1
5 14 11 1 126.20 418.400
5 14 12 1 126.20 418.400
5 14 13 1 126.20 418.400
5 6 20 1
5 3 19 1
6 5 14 1
6 4 15 1 120.00 418.400 ;ffgmxbon CB-CR6-CR6
7 10 8 1 107.60 460.240 ;ffgmxbon F-C-F
7 10 9 1 107.60 460.240
8 10 9 1 107.60 460.240
11 14 12 1 107.60 460.240
11 14 13 1 107.60 460.240
12 14 13 1 107.60 460.240
15 17 21 1
16 15 17 1 124.00 502.080 ;ffgmxbon OA-C-O
[ dihedrals ]
; ai aj ak al funct c0 c1 c2 c3
;around the ring
1 2 4 6 2
2 4 6 5 2
4 6 5 3 2
6 5 3 1 2
5 3 1 2 2
3 1 2 4 2
;substituents1
4 15 6 2 2
2 18 4 1 2
1 10 2 3 2
5 14 3 6 2
6 20 5 4 2
3 19 1 5 2
;substituents2
4 6 2 15 2 0.000 334.600
2 4 1 18 2
1 2 3 10 2
3 1 5 19 2
5 3 6 14 2
6 5 4 20 2
;COOH
6 4 15 17 2 0.000 167.360
2 4 15 16 2 0.000 167.360
15 16 4 17 2 0.000 167.360 ;ffgmxbon CB-OA
15 17 4 16 2
; Include Position restraint file
#ifdef POSRES
#include "posre.itp"
#endif

```

A2.4 TFB<sup>-</sup> - tfb\_m.itp

```
; This is your topology file
; TFB_m by Barbara Hoff
[ moleculetype ]
; Name          nrexcl
TFB             3
[ atoms ]
;  nr  type  resnr  residue  atom  cgnr  charge  mass  typeB  chargeB  massB
;   1  CR6   1      TFB     C1   1     -0.140  12.0110 ; qtot -0.14
;   2  CR6   1      TFB     C2   2     -0.140  12.0110 ; qtot -0.28
;   3  CR6   1      TFB     C3   3     -0.140  12.0110 ; qtot -0.42
;   4  CR6   1      TFB     C4   4     -0.140  12.0110 ; qtot -0.56
;   5  CR6   1      TFB     C5   5     -0.140  12.0110 ; qtot -0.70
;   6  CR6   1      TFB     C6   6     -0.140  12.0110 ; qtot -0.84
;   7   F    1      TFB     F1   1     -0.250  18.9984 ; qtot -1.09
;   8   F    1      TFB     F2   1     -0.250  18.9984 ; qtot -1.34
;   9   F    1      TFB     F3   1     -0.250  18.9984 ; qtot -1.59
;  10  CB    1      TFB     C7   1      0.890  12.0110 ; qtot -0.70
;  11  F     1      TFB     F4   5     -0.250  18.9984 ; qtot -0.95
;  12  F     1      TFB     F5   5     -0.250  18.9984 ; qtot -1.20
;  13  F     1      TFB     F6   5     -0.250  18.9984 ; qtot -1.45
;  14  CB    1      TFB     C8   5      0.890  12.0110 ; qtot -0.56
;  15  C     1      TFB     C9   4      0.330  12.0110 ; qtot -0.23
;  16  O     1      TFB     O1   4     -0.190  15.9994 ; qtot -0.42
;  17  OM    1      TFB     O2   4     -1.000  15.9994 ; qtot -1.42
;  18  HCR   1      TFB     H1   2      0.140   1.0080 ; qtot -1.28
;  19  HCR   1      TFB     H2   3      0.140   1.0080 ; qtot -1.14
;  20  HCR   1      TFB     H3   6      0.140   1.0080 ; qtot -1
;charge for F from
[ bonds ]
;  ai  aj  funct  c0  c1  c2  c3
;   1  2    1      0.1390  418400 ;ffgmxbon CB-CR6
;   1  3    1
;   1 10    1
;   2 18    1
;   2  4    1
;   3 19    1
;   3  5    1
;   4 15    1
;   4  6    1
;   5 14    1
;   5  6    1
;   6 20    1
;   7 10    1
;   8 10    1
;   9 10    1
;  11 14    1
;  12 14    1
;  13 14    1
;  15 16    1
;  15 17    1
;   7 10    1
;   8 10    1
;   9 10    1
;  11 14    1
;  12 14    1
;  13 14    1
;  15 16    1
;  15 17    1
;   7 10    1
;   8 10    1
;   9 10    1
;  11 14    1
;  12 14    1
;  13 14    1
;  15 16    1
;  15 17    1
[ pairs ]
;  ai  aj  funct  c0  c1  c2  c3
;   1 15    1
;   1  6    1
;   1 14    1
;   2  7    1
;   2  8    1
;   2  9    1
;   2 16    1
;   2 17    1
;   2  5    1
;   2 20    1
;   2 19    1
;   3  7    1
;   3  8    1
;   3  9    1
;   3 18    1
;   3  4    1
;   3 20    1
;   3 11    1
;   3 12    1
;   3 13    1
;   4 14    1
;   4 10    1
;   5 10    1
;   5 15    1
```

```

6 19 1
6 18 1
6 17 1
6 16 1
6 11 1
6 12 1
6 13 1
10 18 1
10 19 1
14 19 1
14 20 1
15 18 1
15 20 1
[ angles ]
; ai aj ak funct c0 c1 c2 c3
1 10 9 1 126.20 418.400 ;angle from calculation
1 10 8 1 126.20 418.400
1 10 7 1 126.20 418.400
1 2 18 1
1 2 4 1
1 3 19 1
1 3 5 1
2 1 10 1
2 1 3 1
2 4 15 1 120.00 418.400 ;ffgmx2bon CB-CR6-CR6
2 4 6 1
3 1 10 1
3 5 14 1
3 5 6 1
4 15 16 1 116.00 418.400 ;angle from calculation
4 15 17 1 120.00 418.400 ;ffgmxbon CR6-CB-OA
4 2 18 1
4 6 20 1
4 6 5 1
5 14 11 1 126.20 418.400
5 14 12 1 126.20 418.400
5 14 13 1 126.20 418.400
5 6 20 1
5 3 19 1
6 5 14 1
6 4 15 1 120.00 418.400 ;ffgmxbon CB-CR6-CR6
7 10 8 1 107.60 460.240 ;ffgmxbon F-C-F
7 10 9 1 107.60 460.240
8 10 9 1 107.60 460.240
11 14 12 1 107.60 460.240
11 14 13 1 107.60 460.240
12 14 13 1 107.60 460.240
16 15 17 1 124.00 502.080 ;ffgmxbon OA-C-O
[ dihedrals ]
; ai aj ak al funct c0 c1 c2 c3
;around the ring
1 2 4 6 2
2 4 6 5 2
4 6 5 3 2
6 5 3 1 2
5 3 1 2 2
3 1 2 4 2
;substituents1
4 15 6 2 2
2 18 4 1 2
1 10 2 3 2
5 14 3 6 2
6 20 5 4 2
3 19 1 5 2
;substituents2
4 6 2 15 2 0.000 334.600
2 4 1 18 2
1 2 3 10 2
3 1 5 19 2
5 3 6 14 2
6 5 4 20 2
;COOH
6 4 15 17 2 0.000 167.360
2 4 15 16 2 0.000 167.360
15 16 4 17 2 0.000 167.360 ;ffgmxbon CB-OA
15 17 4 16 2
; Include Position restraint file
#ifdef POSRES

```

```
#include "posre.itp"
#endif
```

### Anhang A3: Perl-Skript Dateien zur Ermittlung der freien Enthalpie G nach J. MacCallum, University of Calgary, Canada

#### A3.1: make\_histo.pl

```
#!/usr/bin/perl -w

open(OUTPUT, "> $ARGV[2]") || die "Can't open output: $!";

open(INPUT, " $ARGV[0]") || die "Can't open input: $!";

$mol = $ARGV[1];
$min = $ARGV[3];
$max = $ARGV[4];
$bins = $ARGV[5];

$delta = ($max - $min) / $bins;

$line = <INPUT>;
if($mol == 1) {
    $line = <INPUT>;
} else {
    $tmp = <INPUT>;
}
if($mol == 2) {
    $line = <INPUT>;
} else {
    $tmp = <INPUT>;
}

($name, $x, $k) = split(/\s+/, $line);

$name = '';
print OUTPUT "$x\n$k\n$min\n$max\n$bins\n";

$line = <INPUT>;

while($line=<INPUT>) {
    ($a,$b) = split(' ', $line);
    $a=$a+0.0;
    #    $b=$b+0.0;

    if($mol == 1) {
        $num = $a + $x;
    }

    if($mol == 2) {
        $num = $b + $x;
    }

    if($num >= $min && $num <= $max) {
        $hist[( $num - $min)/$delta]+=1;
    }
}

for($i=0;$i<$bins;++$i) {
    $hist[$i] += 0;
    print OUTPUT "$hist[$i]\n";
}

close(INPUT);

close(OUTPUT);
```

## A3.2: wham.pl

```
#!/usr/bin/perl -w

$temperature = shift(@ARGV);
$RT = $temperature * 8.314e-3;
$min = shift(@ARGV);
$max = shift(@ARGV);
$bins = int(shift(@ARGV));
$rep = shift(@ARGV);

print STDERR "$temperature\t$min\t$max\t$bins\t$rep\n";

$delta = ($max - $min) / $bins;

$file = 0;

foreach $file (@ARGV) {
    open(INPUT, "$file") or die;
    my @tmp;

    $x[$file] = <INPUT> + 0.0;
    $k[$file] = <INPUT> + 0.0;
    $F[$file] = 1.0;
    $N[$file] = 0.0;

    $t_min = <INPUT>;
    if($t_min != $min) {
        print STDERR "$tmin != $min in file $file\n";
        die;
    }

    $t_max = <INPUT>;
    if($t_max != $max) {
        die;
    }

    $t_bins = <INPUT>;
    if($t_bins != $bins) {
        die;
    }

    $b = 0;
    while($line = <INPUT>) {
        $tmp[$b] = $line + 0.0;
        $N[$file] += $tmp[$b];
        $b++;
    }
    $hist[$file] = [@tmp];
    $file += 1;
    close(INPUT);
}

do {
    print STDERR "$rep steps left...\n";
    $rep--;
    for($curr_bin=0; $curr_bin < $bins; $curr_bin++) {
        my $numerator = 0.0;
        my $denominator = 0.0;

        $pos = $curr_bin/$bins*($max - $min) + $min + 0.5*$delta;

        for($curr_file = 0; $curr_file < $file; $curr_file++) {
            $U = 0.5 * $k[$curr_file] * ($pos - $x[$curr_file])**2;
            $numerator += $hist[$curr_file][$curr_bin];
            $denominator += $N[$curr_file] * exp((-$F[$curr_file]-$U) / $RT);
        }

        $out_hist[$curr_bin] = $numerator/$denominator;
    }

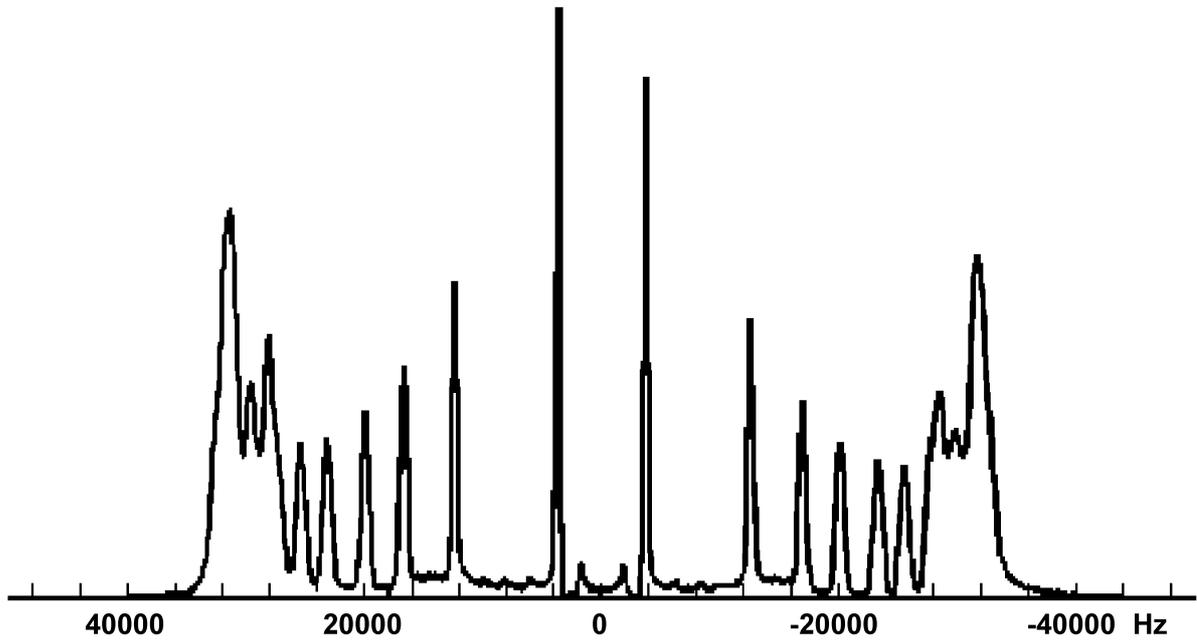
    for($curr_file = 0; $curr_file < $file; $curr_file++) {
        $Z = 0.0;
        for($curr_bin = 0; $curr_bin < $bins; $curr_bin++) {
            $pos = $curr_bin/$bins*($max - $min) + $min + 0.5*$delta;
```

```
    $U = 0.5 * $k[$curr_file] * ($pos - $x[$curr_file])**2;
    $Z += $out_hist[$curr_bin] * exp(-$U/$RT);
  }
  $F[$curr_file] = - $RT * log($Z);
}
$tmp = $F[0];
for($curr_file = 0; $curr_file < $nfile; $curr_file++) {
  $F[$curr_file] -= $tmp;
}
} while($rep > 0);

for($i=0; $i < $bins; $i++) {
  print "$out_hist[$i]\n";
}
```

**Anhang A4:  $^2\text{H}$ -NMR-Spektren und Aufspaltung von POPC- $d_{31}$  zur Ermittlung des Kettenordnungsparameters  $S_{\text{CD}}$**

**A4.1: 285K**

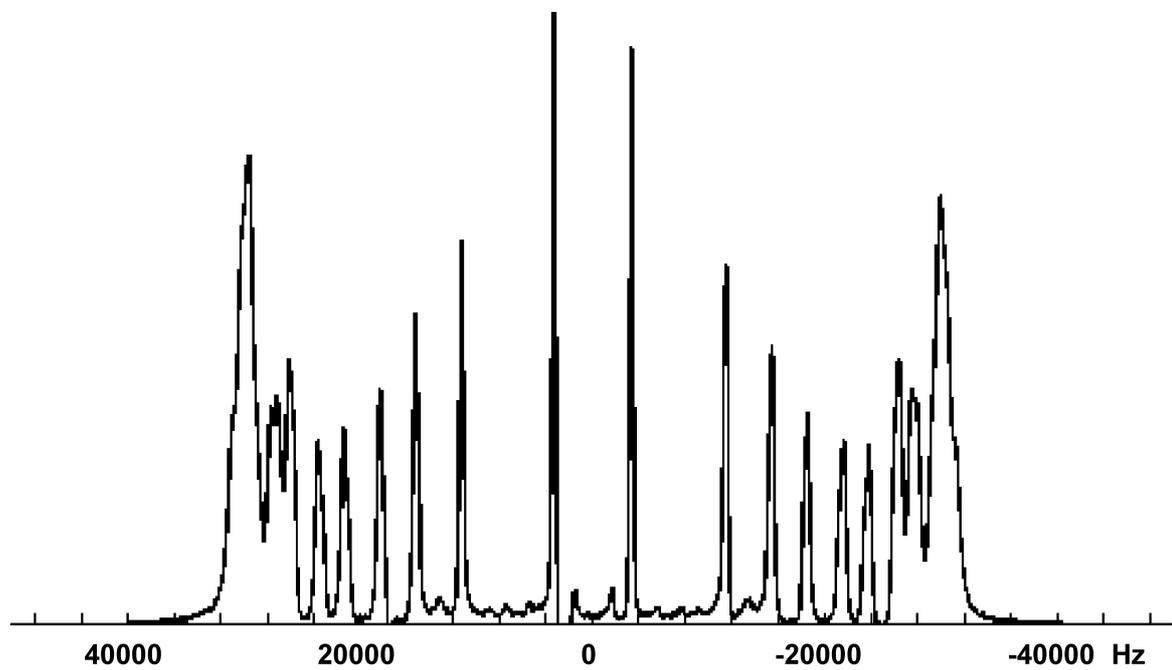


**Bild A4.1:**  $^2\text{H}$ -NMR Spektrum von POPC- $d_{31}$  bei 285K

**Tabelle A4.1:** Aufspaltungen der Peaks bei 285K und daraus berechnete Ordnungsparameter  $S_{\text{CD}}$  mit  $Q_{\text{CC}} = 168\text{kHz}$

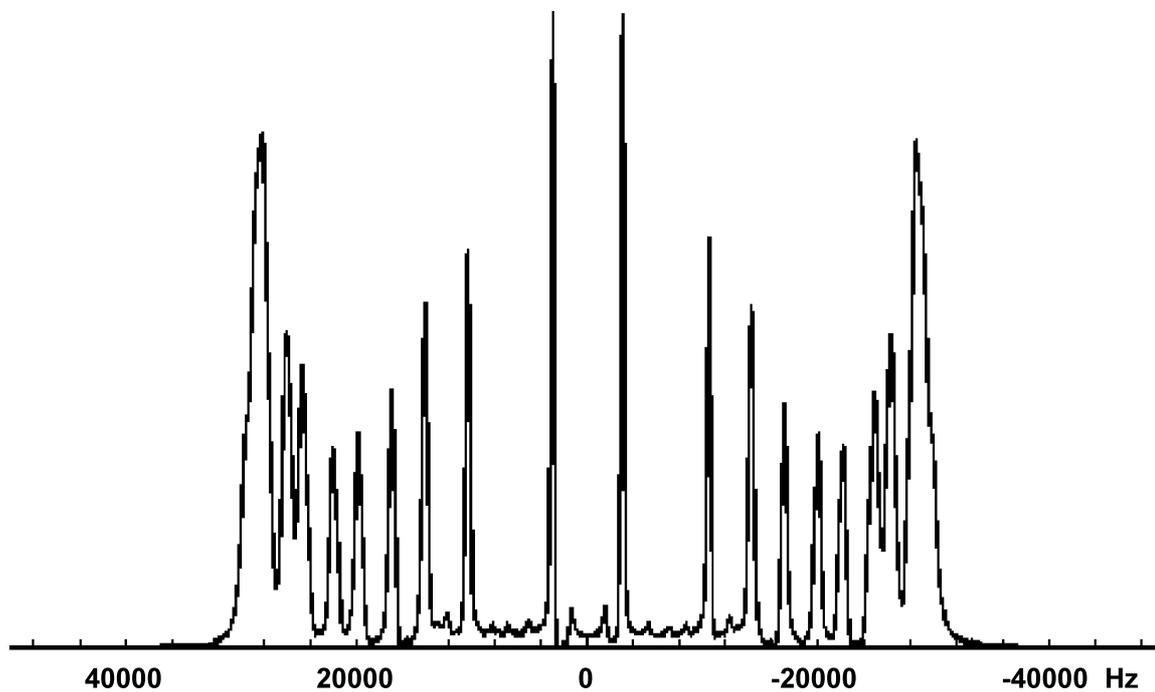
Peak	Splitting / kHz	$S_{\text{CD}}$
1	7416	0,088
2	25010	0,099
3	33598	0,133
4	40032	0,159
5	46501	0,185
6	50996	0,202
7	54998	0,218
8	56571	0,224
9	56571	0,224
10	59378	0,236
11	59378	0,236
12	63086	0,250
13	63086	0,250
14	63086	0,250
15	65186	0,259

## A4.2: 300K

Bild A4.2:  $^2\text{H}$ -NMR Spektrum von POPC- $d_{31}$  bei 300KTabelle A4.2: Aufsplittungen der Peaks bei 300K und daraus berechnete Ordnungsparameter  $S_{\text{CD}}$  mit  $Q_{\text{CC}} = 168\text{kHz}$ 

Peak	Splitting / kHz	$S_{\text{CD}}$
1	6677	0,079
2	22792	0,090
3	30731	0,122
4	36770	0,146
5	42956	0,170
6	47362	0,188
7	51695	0,205
8	52521	0,208
9	54637	0,217
10	55505	0,220
11	58362	0,232
12	59437	0,236
13	60515	0,240
14	60515	0,240
15	62061	0,246

## A4.3: 315K

Bild A4.3:  $^2\text{H}$ -NMR Spektrum von POPC- $d_{31}$  bei 315KTabelle A4.3: Aufsplittungen der Peaks bei 315K und daraus berechnete Ordnungsparameter  $S_{\text{CD}}$  mit  $Q_{\text{CC}} = 168\text{kHz}$ 

Peak	Splitting / kHz	$S_{\text{CD}}$
1	6060	0,072
2	20920	0,083
3	28301	0,112
4	34019	0,135
5	39909	0,158
6	44267	0,176
7	48774	0,194
8	49590	0,197
9	51850	0,206
10	52409	0,208
11	55484	0,220
12	56574	0,225
13	57613	0,229
14	57613	0,229
15	59443	0,236

## Anhang A5: $^2\text{H}$ -NMR-Spektren und Aufspaltung von Pyren- $d_{10}$ zur Ermittlung des Kettenordnungsparameters $S_{\text{CD}}$

### A5.1: 285K

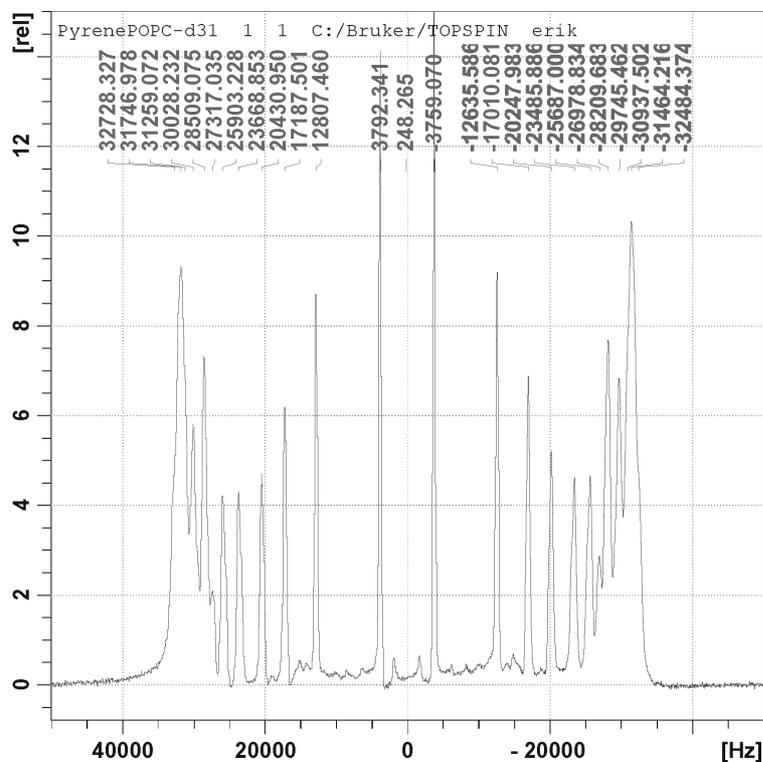


Bild A5.1:  $^2\text{H}$ -NMR Spektrum von POPC- $d_{31}$ , beladen mit 5mol% Pyren bei 285K

Tabelle A5.1: Aufsplittings der Peaks bei 285K und daraus berechnete Ordnungsparameter  $S_{\text{CD}}$  mit  $Q_{\text{CC}} = 168\text{kHz}$

Peak	Splitting / kHz	$S_{\text{CD}}$
1	7551	0,090
2	25453	0,101
3	34198	0,136
4	40679	0,161
5	47155	0,187
6	51590	0,205
7	54270	0,215
8	56719	0,225
9	56719	0,225
10	59773	0,237
11	59773	0,237
12	62197	0,247
13	63211	0,251
14	63211	0,251
15	65212	0,259

## A5.2: 300K

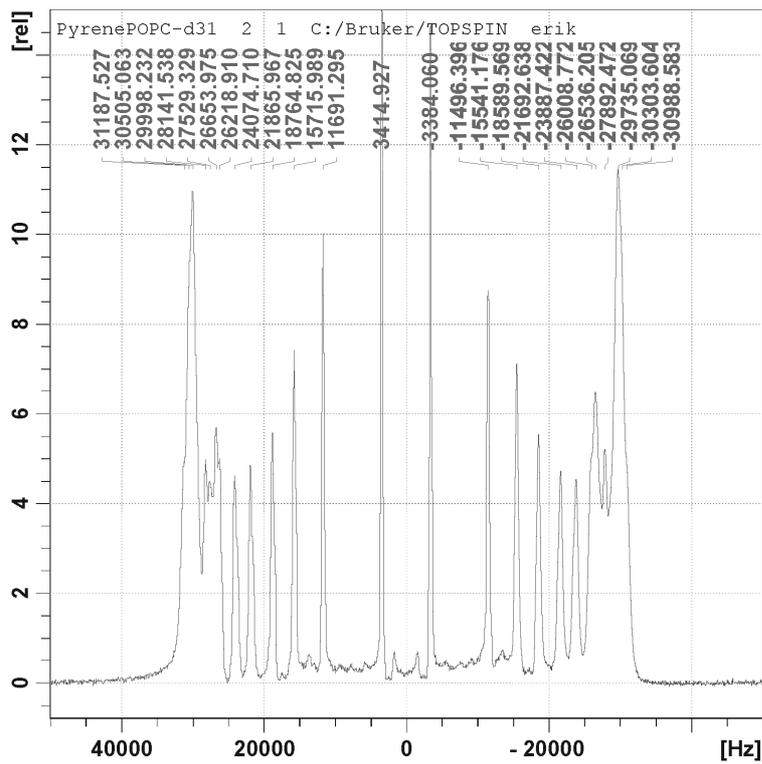
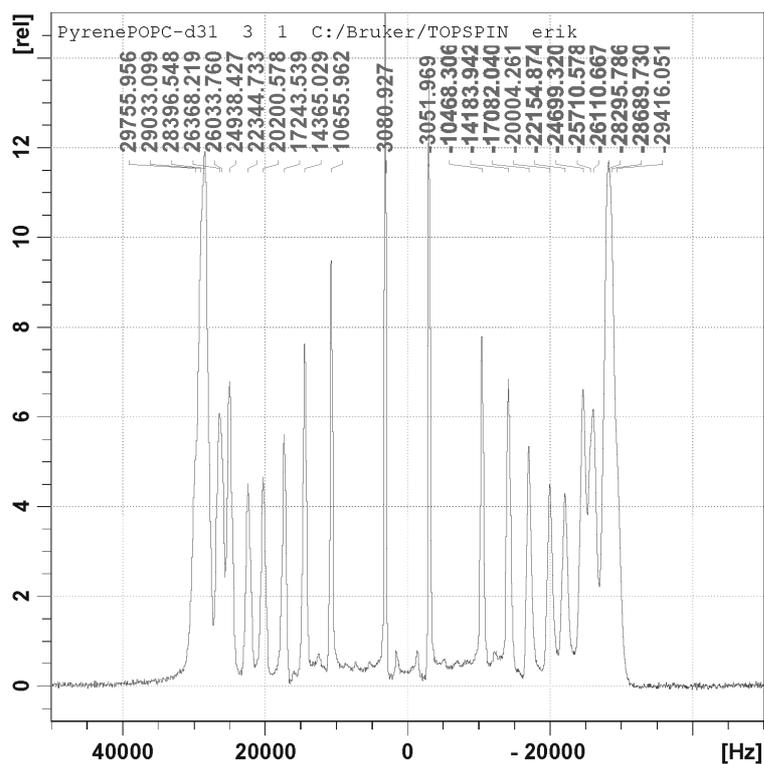
Bild A5.2:  $^2\text{H}$ -NMR Spektrum von POPC- $d_{31}$ , beladen mit 5mol% Pyren bei 300K

Tabelle A5.2: Aufsplittungen der Peaks bei 300K und daraus berechnete Ordnungsparameter  $S_{\text{CD}}$  mit  $Q_{\text{CC}} = 168\text{kHz}$

Peak	Splitting kHz	$S_{\text{CD}}$
1	6799	0,081
2	23187	0,092
3	31257	0,124
4	37355	0,148
5	43559	0,173
6	47962	0,190
7	52228	0,207
8	53190	0,211
9	55421	0,220
10	56034	0,222
11	59733	0,237
12	60809	0,241
13	60809	0,241
14	60809	0,241
15	62177	0,247

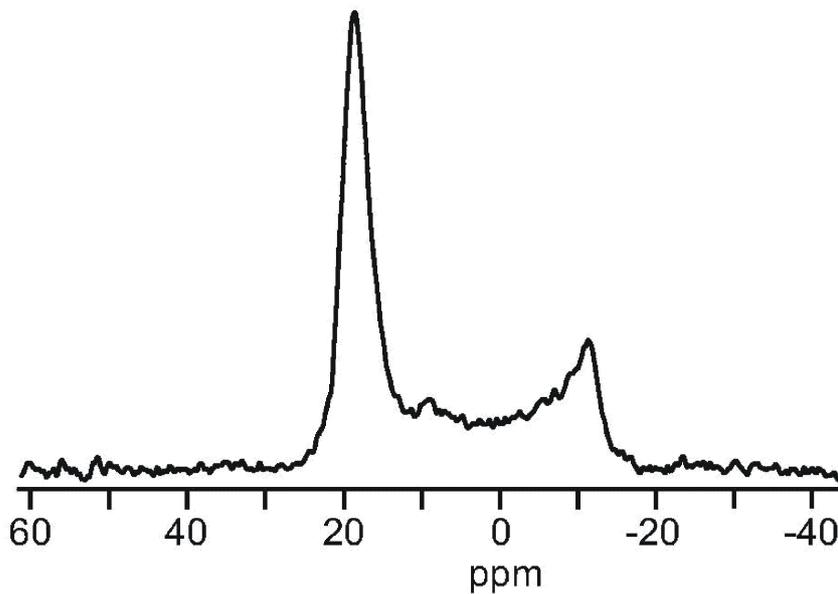
## A5.3: 315K

Bild A5.3:  $^2\text{H}$ -NMR Spektrum von POPC- $d_{31}$ , beladen mit 5mol% Pyren bei 315KTabelle A5.3: Aufsplittungen der Peaks bei 315K und daraus berechnete Ordnungsparameter  $S_{\text{CD}}$  mit  $Q_{\text{CC}} = 168\text{kHz}$ 

Peak	Splitting kHz	$S_{\text{CD}}$
1	6133	0,073
2	21124	0,084
3	28549	0,113
4	34326	0,136
5	40205	0,160
6	44500	0,177
7	49637	0,197
8	49637	0,197
9	51745	0,205
10	52479	0,208
11	56693	0,225
12	56693	0,225
13	57723	0,229
14	57723	0,229
15	59172	0,235

**Anhang A6:  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren zur Überprüfung der orientierten Doppelschicht**

Um die Qualität der makroskopisch orientierten lamellaren Doppelschichten zu prüfen wurde ein  $^{31}\text{P}$ -Spektrum aufgenommen (Bild 4.9). Sind die Normalen zu den auf den Glasplatten ausgerichteten Doppelschichten parallel zum angelegten äußeren Magnetfeld, entspricht der Peak bei 20ppm dem der orientierten Doppelschichten, der Peak bei -12ppm dem unorientierten Anteil. Integriert man die Flächen unter den Peaks erhält man einen orientierten Anteil der Probe von 60%.

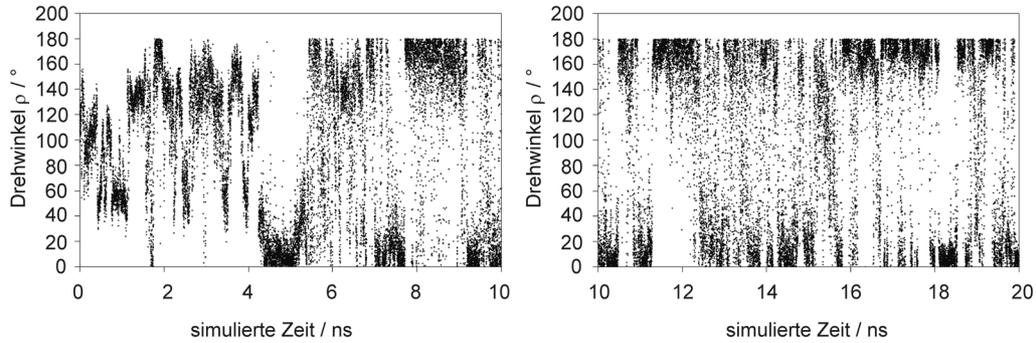


**Bild A6:**  $^{31}\text{P}$ -NMR Spektrum von POPC, beladen mit 5mol% Pyren- $d_{10}$  bei 300K

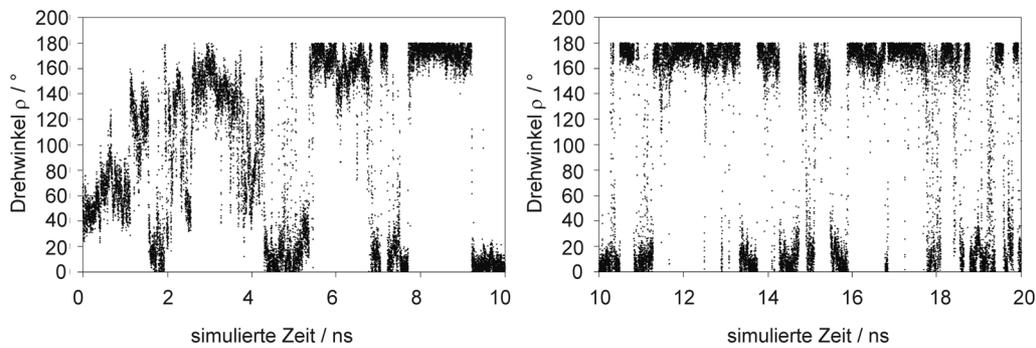
**Anhang A7: Drehwinkel um die interne x- und y-Achse über die simulierte Zeit**

**A7.1: Pyren**

**Bild A7.1a:** PYR1 – Drehwinkel um die x-Achse bei 300K über die simulierte Zeit

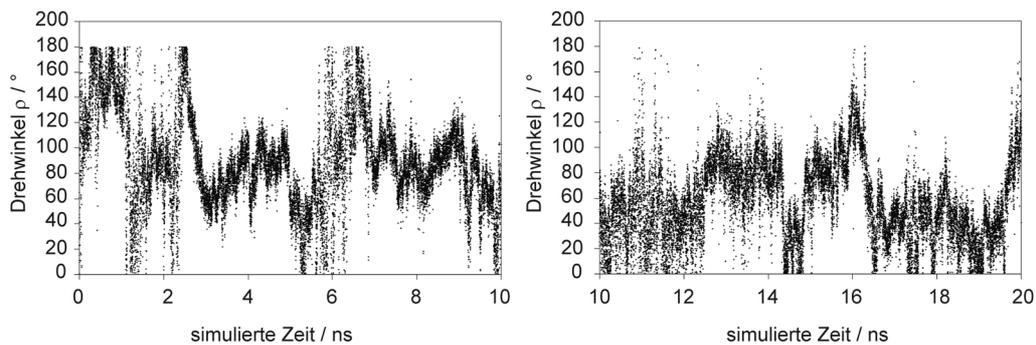


**Bild A7.1b:** PYR1-Drehwinkel um die y-Achse bei 300K über die simulierte Zeit

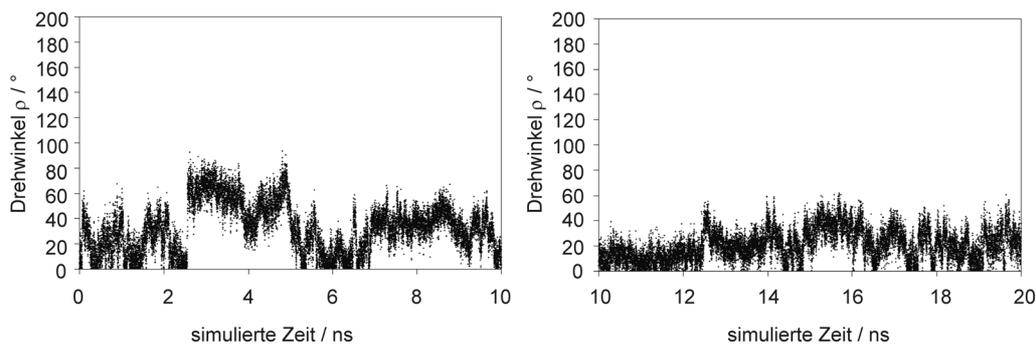


**A7.2 TFB**

**Bild A7.2a:** TFB1 – Drehwinkel um die x-Achse bei 300K über die simulierte Zeit

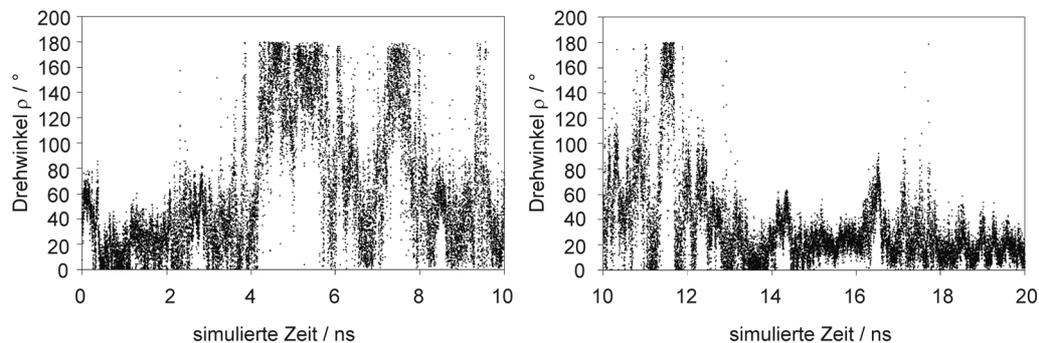


**Bild A7.2b:** TFB1 – Drehwinkel um die y-Achse bei 300K über die simulierte Zeit

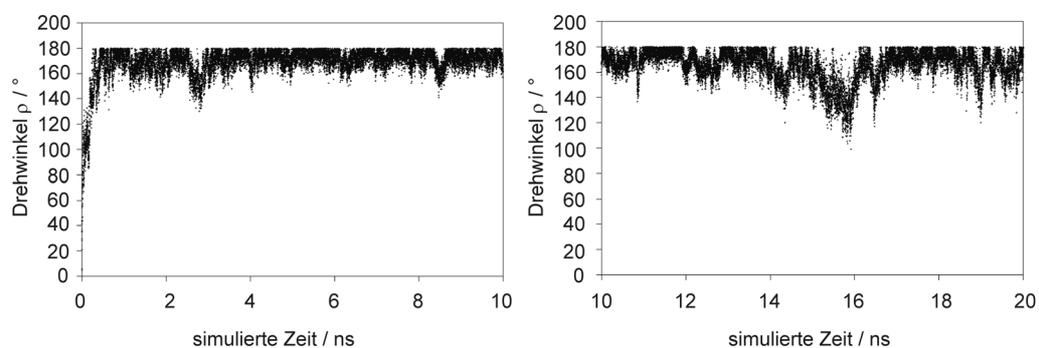


### A7.3 TFB<sup>-</sup>

**Bild A7.3a:** TFB6 – Drehwinkel um die x-Achse bei 300K über die simulierte Zeit

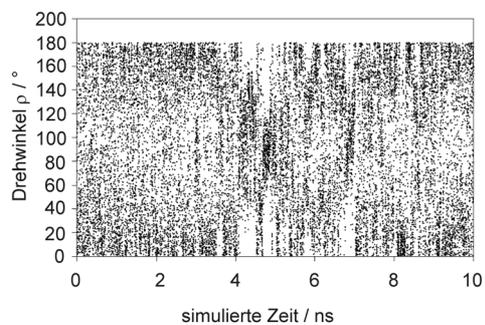


**Bild A7.3b:** TFB6 – Drehwinkel um die y-Achse bei 300K über die simulierte Zeit

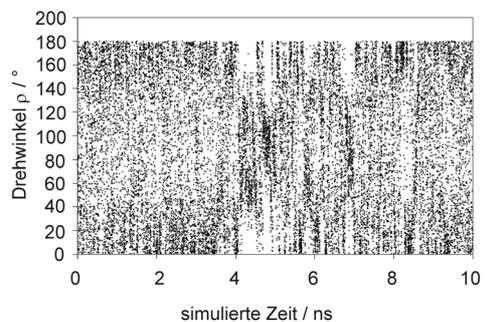


### A7.4 Benzol

**Bild A7.4a:** BEN2 – Drehwinkel um die x-Achse bei 300K über die simulierte Zeit



**Bild A7.4b:** BEN2 – Drehwinkel um die y-Achse bei 300K über die simulierte Zeit



---

## Formelzeichen und Abkürzungen

---

### Kapitel 2

POPC	Palmitoyl-Oleoyl-Phosphatidylcholin
DMPC	Dimyristoyl-Phosphatidylcholin
DPPC	Dipalmitoyl-Phosphatidylcholin
CMC	kritische Micellenkonzentration
$T_m$	Phasenübergangstemperatur
$L_\alpha$	lamellare fluide Phase bei Lipid-Doppelschichten
$L_\beta$	lamellare Gel-Phase bei Lipid-Doppelschichten
H	Hexagonalphase bei Lipid-Doppelschichten
Q	kubische Phase bei Lipid-Doppelschichten
SPC	single pont charge

### Kapitel 3

PAK	polyzyklischer aromatische Kohlenwasserstoff
IARC	International Agency for Research on Cancer
PYR	Pyren
BEN	Benzol
TFB	3,5-Bis-Trifluoromethyl-Benzoessäure
$TFB^-$	deprotonierte Form der 3,5-Bis-Trifluoromethyl-Benzoessäure
Smp	Schmelzpunkt
Sdp	Siedepunkt

### Kapitel 4

MD	Molekulardynamisch
MC	Monte Carlo
IR	Infrarot
F	Kraft
N	Anzahl der Teilchen/Atome

V	Energie, Potential
k	Federkonstante
r	Länge (Abstand, Radius)
b	Referenzbindungslänge
$\theta$	Winkel
$\theta^0$	Referenzwinkel
pd	proper dihedral, echte Torsion
id	improper dihedral, unechte Torsion
C	Torsionskonstante
$\omega$	Torsionwinkel
$\xi$	Winkel zwischen zwei Ebenen
$\epsilon, \sigma$	spezifische Lennard-Jones Parameter
q	Punktladungen
$\epsilon_0$	Dielektrizitätskonstante des Vakuums ( $8,854 \cdot 10^{-12} \text{ C}^2/(\text{J}\cdot\text{m})$ )
$\epsilon_r$	relative Dielektrizitätskonstante
PBC	Periodic boundary conditions
PME	Particle Mesh Ewald
$\beta$	Gewichtungparameter in Ewald Summen
V	Volumen
FFT	Fast Fourier Transformation
m	Masse
a	Beschleunigung
v	Geschwindigkeit
t	Zeit
k	Boltzmann-Konstante ( $1,38 \cdot 10^{-23} \text{ J/K}$ )
T	absolute Temperatur in K
R	allgemeine Gaskonstante ( $8,314 \text{ J}/(\text{mol}\cdot\text{K})$ )
$\lambda$	Skalierungsfaktor zur Temperaturkontrolle
$\tau$	Kopplungskonstante bei Druck- und Temperaturkontrolle
p	Druck
$\beta$	Kompressibilität bei der Druckkorrektur
$K_S$	Federkonstante des harmonischen Potentials bei Umbrella Sampling Simulationen

$\rho$	Wahrscheinlichkeitsverteilung
$\Delta G$	freie Enthalpie
K	Verteilungskoeffizient
S	Ordnungsparameter

### **Kapitel 5**

NMR	Nuclear Magnetic Resonance
h	Plancksches Wirkungsquantum
p	Drehimpuls
$\mu$	magnetisches Dipolmoment
$\gamma$	gyromagnetisches Verhältnis
m	magnetische Quantenzahl
B	Magnetfeld
$\nu_0$	Lamorfrequenz
CW	continous wave
FID	Freier Induktionsabfall
$\tau$	Pulsdauer
T	Dauer zwischen zwei Pulsen
$\sigma$	Abschirmungskonstante
MAS	magic angle spinning
EFG	elektrischer Feldgradient
$Q_{cc}$	Quadrupol-Kopplungskonstante
$\eta$	Asymetrieparameter

