

RESEARCH

Bernhard Reuter

Generalisierte Markov-Modellierung

Modellierung irreversibler
 β -Amyloid-Peptid-Dynamik unter
Mikrowelleneinfluss



Springer Spektrum

Generalisierte Markov-Modellierung

Bernhard Reuter

Generalisierte Markov-Modellierung

Modellierung irreversibler
 β -Amyloid-Peptid-Dynamik unter
Mikrowelleneinfluss

Mit einem Geleitwort von PD Dr. Marcus Weber

 Springer Spektrum

Bernhard Reuter
Numerical Mathematics
Zuse Institute Berlin
Berlin, Deutschland

Zugl.: Generalisierte Markov-Modellierung von Nichtgleichgewichtssystemen – Simulation und Modellierung der Amyloid- β -(1-40)-Konformationsdynamik unter Mikrowelleneinfluss.

Dissertation, Universität Kassel, Fachbereich Mathematik und Naturwissenschaften,
Datum der Disputation: 31.10.2018

ISBN 978-3-658-29711-4 ISBN 978-3-658-29712-1 (eBook)
<https://doi.org/10.1007/978-3-658-29712-1>

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

© Springer Fachmedien Wiesbaden GmbH, ein Teil von Springer Nature 2020

Das Werk einschließlich aller seiner Teile ist urheberrechtlich geschützt. Jede Verwertung, die nicht ausdrücklich vom Urheberrechtsgesetz zugelassen ist, bedarf der vorherigen Zustimmung des Verlags. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Bearbeitungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung und Verarbeitung in elektronischen Systemen.

Die Wiedergabe von allgemein beschreibenden Bezeichnungen, Marken, Unternehmensnamen etc. in diesem Werk bedeutet nicht, dass diese frei durch jedermann benutzt werden dürfen. Die Berechtigung zur Benutzung unterliegt, auch ohne gesonderten Hinweis hierzu, den Regeln des Markenrechts. Die Rechte des jeweiligen Zeicheninhabers sind zu beachten.

Der Verlag, die Autoren und die Herausgeber gehen davon aus, dass die Angaben und Informationen in diesem Werk zum Zeitpunkt der Veröffentlichung vollständig und korrekt sind. Weder der Verlag, noch die Autoren oder die Herausgeber übernehmen, ausdrücklich oder implizit, Gewähr für den Inhalt des Werkes, etwaige Fehler oder Äußerungen. Der Verlag bleibt im Hinblick auf geografische Zuordnungen und Gebietsbezeichnungen in veröffentlichten Karten und Institutionsadressen neutral.

Springer Spektrum ist ein Imprint der eingetragenen Gesellschaft Springer Fachmedien Wiesbaden GmbH und ist ein Teil von Springer Nature.

Die Anschrift der Gesellschaft ist: Abraham-Lincoln-Str. 46, 65189 Wiesbaden, Germany

Geleitwort

Markov-Modelle (englisch: *Markov State Models* (MSM)) sind sehr nützlich u.a. bei der Analyse von Zeitreihendaten, die aus Molekulardynamik-Simulationen stammen. Mit Hilfe von MSM können grundlegende Konformationsänderungen molekularer Systeme extrahiert werden, um die Gesamtprozesse biochemischer Systeme besser zu verstehen. MSM sind jedoch bisher nur für Gleichgewichtssysteme ausgereift.

Bernhard Reuter erzählte mir im Jahr 2015, dass er eine Dissertation über den Einfluss von Mikrowellenstrahlung auf Amyloide und deren Konformationsdynamik schreibt, d.h. über die Frage, ob Mikrowellenstrahlung die Alzheimer-Krankheit beeinflussen kann. Er untersuchte diese Frage, indem er molekulare Simulationen unter dem Einfluss äußerer elektromagnetischer Felder durchführte und die Simulationsergebnisse statistisch auswertete. Ich war sehr beeindruckt, denn allein die Durchführung der Simulationen selbst ist eine komplizierte Aufgabe im Falle der untersuchten hochkomplexen biomolekularen Nichtgleichgewichtsprozesse. Erschwerend kommt hinzu, dass ein äußeres Feld das Gleichgewicht des Systems stört, sodass Standard-MSM-Methoden den Einfluss des Feldes nicht erfassen können. Da Standard-MSM-Ansätze für die Konformationsdynamik-Modellierung, die in der mathematischen Literatur gefeiert werden, bei diesem konkreten Beispiel der Amyloid-Konformationsdynamik nicht anwendbar waren, wurde Bernhard nicht nur in der Physik – sondern auch in der Mathematik – angespornt einen entscheidenden Schritt nach vorne zu machen.

Der Beitrag dieser Dissertation zum wissenschaftlichen Fortschritt zeigt sich sicherlich vor allem in der Verallgemeinerung der bekannten robusten Perron Cluster Cluster Analyse (PCCA+), die grundsätzlich zur Erstellung von aussagekräftigen MSM verwendet wird. Bernhard Reuter entwickelte die Generalisierte Perron Cluster Cluster Analyse (G-PCCA), die auch die Modellierung von Nichtgleichgewichtsprozessen problemlos ermöglicht. Seine Doktorarbeit trug dabei auch insbesondere zur Beschleunigung und Stabilisierung der zugrunde liegenden Algorithmen bei. Die eingereichte Arbeit ist das Ergebnis sorgfältiger wissenschaftlicher Analyse, technischer Expertise in der Architektur und Verwendung von Computersystemen und einer herausragenden Ausdauer bei der Lösung zahlreicher Probleme, die

mit Bernhard Reuters Erfolg verbunden sind. Er musste neue mathematische Konzepte zur effizienten Diskretisierung hochdimensionaler dynamischer Prozesse entwickeln, was an sich ein noch ungelöstes mathematisches Problem darstellt.

Um es kurz zu machen: Seine Dissertation ist eine großartige Arbeit, die auf Begabung, Ausdauer und Fleiß beruht. Sogar die seit vielen Jahren unbeantwortete Frage, wie viele grundlegende Zustände in einem individuellen MSM berücksichtigt werden sollten, wurde von Bernhard Reuter gelöst. Er führte eine Kombination von Kriterien ein, um diese Anzahl zu bestimmen, was einen wichtigen Schritt bei der stabilen Automatisierung des Gesamtalgorithmus darstellt.

Auf dem Gebiet der Amyloidforschung hat Bernhard Reuter durch seine Simulationsexperimente meiner Auffassung nach gezeigt, dass Mikrowellen entgegen der landläufigen Meinung einen nicht-thermischen Effekt auf die Konformationsdynamik der entsprechenden Peptide haben. Dieser Effekt begünstigt Konformationen, die zu einer beschleunigten Aggregation von Amyloiden beitragen. Meiner Meinung nach sollten daher unbedingt Laborversuche durchgeführt werden, um diese Aussage weiter zu untersuchen.

Ich freue mich sehr, dass Bernhard Reuter seine Ergebnisse in Form dieses äußerst lesenswerten Buches veröffentlicht.

Berlin

PD Dr. Marcus Weber

Computational Molecular Design
Numerische Mathematik
Zuse Institut Berlin

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Einfluss von Mikrowellen auf Proteine	1
1.2	Zur Notwendigkeit der Generalisierung der Markovmodellierung	10
1.3	Aufbau der Dissertation	13
2	Grundlagen	15
2.1	Molekular-Dynamik-Methode	15
2.2	Aufbau und Struktur von Proteinen	17
2.3	Thermodynamik und Kinetik der Proteinfaltung	20
2.3.1	Thermodynamik: Die Anfinsen-Hypothese	20
2.3.2	Kinetik: Das Levinthal-Paradoxon	25
2.3.3	Die Trichterhypothese	25
2.3.4	Nach der Trichterhypothese: VES-Hypothese	29
3	Theorie	33
3.1	Maßtheorie	33
3.2	Markov-Prozesse	35
3.3	Transferoperatoren	38
3.4	Markov-Modellierung	41
3.4.1	Markov State Models (MSM)	41
3.4.2	Generalisierte Perron-Cluster-Cluster-Analyse	56
3.4.3	Bestimmung der Makrozustandsanzahl	66
3.4.4	Makrozustandszuordnung der Mesozustände	71
3.4.5	Metastabile Zustände und dominante Zyklen	71

4	Anwendung: Modellierung der $A\beta_{40}$-Konformationsdynamik	75
4.1	Markov-Modellierung unter Wechselfeldeinfluss	75
4.1.1	System-Setup und Simulation	75
4.1.2	Datenvorverarbeitung	82
4.1.3	MSM-Generierung	86
4.1.4	Optimale Makrozustandsanzahl	99
4.1.5	Metastabile Zustände und dominante Zyklen	106
4.2	Markov-Modellierung unter Gleichgewichtsbedingungen	121
4.2.1	System-Setup und Simulation	121
4.2.2	Datenvorverarbeitung	122
4.2.3	MSM-Generierung	123
4.2.4	Optimale Makrozustandsanzahl	127
4.2.5	Metastabile Zustände	129
4.3	Vergleich der MSM: Wechselfeldeffekte	135
5	Zusammenfassung	151
5.1	Generalisierung der Markov-Modellierung	151
5.2	Mikrowelleneinfluss auf die Proteinkonformationsdynamik	153
	Literaturverzeichnis	155



1 Einleitung

Das folgende einleitende Kapitel ist in drei Unterkapitel unterteilt. Im ersten Unterkapitel wird die Frage nach dem Einfluss elektromagnetischer Felder geringer Energie auf die Proteinkonformationsdynamik motiviert und ein Überblick über ausgewählte experimentelle und theoretische Studien gegeben. Dabei wird insbesondere der intrinsisch nichtreversible Charakter des Wechselwirkungsprozesses von elektromagnetischen Feldern mit Proteinen betont. Darauf aufbauend wird eine molekular-dynamische Hypothese bezüglich des Einflusses von Mikrowellenfeldern auf die Proteinkonformationsdynamik formuliert, die im Rahmen der hier dargelegten Studie untersucht wurde. Schließlich wird die Auswahl des untersuchten Testsystems begründet – des Amyloid- β -(1-40)-Peptids. Das zweite Unterkapitel legt die Bedeutung der Markov-Modellierung als Analyseinstrument für die Untersuchung von molekulardynamischen bzw. konformationsdynamischen Fragestellungen dar. Dabei wird besonders die Notwendigkeit und der Nutzen der Generalisierung von Markov-Modellierungsmethoden, die bisher auf reversible Prozesse in Gleichgewichtssystemen beschränkt sind, auf nichtreversible Prozesse betont. Ein Unterkapitel zum Aufbau der Dissertation schließt die Einleitung ab. Dort wird auch der Beitrag des Autors dieser Dissertation zum Forschungsfeld spezifiziert.

1.1 Einfluss von Mikrowellen auf Proteine

Eine der wichtigsten Fragestellungen in der Biologie und Medizin des vergangenen 20. und beginnenden 21. Jahrhunderts lautet: Aus welchem Grunde und auf welche Weise liegt eine gegebene Aminosäuresequenz unter physiologischen Bedingungen zumeist in einer ganz bestimmten funktionellen räumlichen Struktur – dem sogenannten **nativen Zustand** – vor [Anf73, Lev68]? In diesem Zusammenhang kommt auch die Frage nach den Einflüssen verschiedener externer Faktoren auf die Stabilität des nativen Zustands auf, der für die Aufrechterhaltung und den korrekten Ablauf der Prozesse des Lebens entscheidend ist. Erfolgt nämlich die Fehlfaltung bestimmter Proteine in größerem Ausmaß, so kommt es zu schwerwiegenden Beeinträchtigungen des

Organismus, wie zum Beispiel neurodegenerativen Erkrankungen (Alzheimer, Prion-Erkrankungen).

Da in heutiger Zeit die Präsenz elektromagnetischer Strahlung im Kilohertz (kHz) bis Gigahertz (GHz) Frequenzbereich aufgrund weitreichender technischer Anwendungen in unserer Umgebung enorm zugenommen hat, ist die Untersuchung des Einflusses elektromagnetischer Strahlung als externem Einflussfaktor auf Proteine von großer Bedeutung. Wechselwirkungen elektrischer und chemischer Natur innerhalb und zwischen Zellen sind umfangreich dokumentiert und allgemein akzeptiert. Im Gegensatz dazu sind intra- und interzelluläre Interaktionen auf der Basis von elektromagnetischen Feldern ebenso wie der Einfluss elektromagnetischer Felder auf Zellen und Zellbestandteile – wie Proteine – Gegenstand andauernder kontroverser Diskussionen. Besonders das Vorhandensein nichtthermischer Effekte von elektromagnetischer Strahlung im Mikrowellenbereich ist stark umstritten.

Hinweise für die zelluläre Interaktion mittels elektromagnetischer Strahlung im Frequenzbereich des sichtbaren und UV-Lichtes wurden zuerst 1916 von Scheminsky [Sch16] und Ludwig [Lud18] sowie unabhängig in den 1920/1930er Jahren insbesondere von Gurwitsch [Gur23, Gur24a, Gur24b, Gur59] gefunden und in späteren Untersuchungen durch andere Wissenschaftler bestätigt, aber auch abgelehnt (eine Übersicht hierzu findet sich bei [Cif11]). Währenddessen sind photochemische bzw. photooxidative Effekte von energiereicher elektromagnetischer Strahlung – wie UV-Licht – wohlbekannt und unbestritten [McL64].

Hingegen stellt die experimentelle Untersuchung des nichtthermischen Einflusses von elektromagnetischer Strahlung mit Frequenzen unterhalb einiger Terahertz (THz) aus messtechnischen Gründen weiterhin ein schwieriges Problem dar. Dies liegt vor allem darin begründet, dass bereits die Energie eines Photons mit einer Frequenz von etwa 6.2 THz (26 meV, Wellenlänge etwa $48 \mu\text{m}$ im Vakuum) der mittleren Energie des thermischen Rauschens bei Raumtemperatur (ca. 293 K) entspricht, d.h. **EMF (elektromagnetische Felder)** dieser und unterhalb dieser Frequenz sind vom thermischen Rauschen im Allgemeinen nicht zu unterscheiden [Cif11]. Dies wird auch häufig als Begründung angeführt, warum EMF mit Frequenzen unterhalb einiger THz keinen über thermische Effekte hinausgehenden Einfluss auf biologische Systeme haben könnten [Cif11, Ada03].

Dem muss entgegengehalten werden, dass diese Argumentation – basierend auf einer kT -Beschränkung – nur für Systeme nahe dem oder im thermischen Gleichgewicht aufrecht erhalten werden kann [Cif11]. Hingegen befinden sich biologische Systeme im Allgemeinen abseits des thermodynamischen Gleichgewichtes. Daher können in biologischen Systemen Freiheitsgrade auftreten,

die nur schwach an andere Freiheitsgrade (an das umgebende Wärmebad) gekoppelt sind (im Gegensatz zum thermischen Gleichgewicht). Absorbiert ein solcher Freiheitsgrad (eine bestimmte Vibration bzw. Rotation eines Moleküls) Energie, so kann aufgrund der schwachen Kopplung an das Wärmebad die Dissipation der Energie auf die anderen Freiheitsgrade deutlich verzögert sein. Hierdurch wird eine Akkumulation von Energie, die z.B. aus einem EMF geringer Intensität und Frequenz (also geringer Energie im Vergleich zum thermischen Rauschen) absorbiert wird, in bestimmten Freiheitsgraden möglich [Cif11]. Auf diese Weise könnten auch EMF geringer Energie einen signifikanten – von thermischen Effekten unterschiedlichen – Einfluss auf die Energie bestimmter Freiheitsgrade haben, z.B. auf ausgezeichnete Freiheitsgrade eines Proteins innerhalb der Zelle [Cif11].

Dementsprechend gibt es stetige experimentelle Bemühungen nichtthermische Effekte von EMF geringer Intensität und Frequenz (unterhalb des THz-Bereichs) nachzuweisen [Cif11, Hoe94, Hoe95, Hoe01, Jaf83, Jel05, Jel07, Poh86, Pol88] bzw. zu widerlegen, die jedoch aufgrund der genannten Gründe und der daraus resultierenden messtechnischen Schwierigkeiten Gegenstand einer kontrovers geführten Diskussion sind. Eine vertiefte und wesentlich umfassendere Diskussion der besagten Effekte findet sich im Übersichtsartikel von Cifra [Cif11], der den Großteil aller in diesem Feld vorhandenen experimentellen Studien und Theorien zusammenfasst. Dabei wird auf die umfangreiche (russische) Literatur aus den Ländern des ehemaligen Sowjetblocks Bezug genommen, die sonst für den westlichen Leser nur schwer zugänglich ist.

An dieser Stelle ist es angemessen anzumerken, dass ein guter Teil der vermuteten nichtthermischen Effekte von EMF geringer Intensität quantenmechanischer Natur ist und daher durch eine klassische Näherung kaum zu beschreiben sein wird. Allerdings sind auch klassisch beschreibbare Effekte nicht von der Hand zu weisen, wie die Kopplung des Feldes an atomare Ladungen bzw. Dipole und die dadurch verursachte Störung und Anpassung der Molekülkonformation. Da Simulationsstudien großer molekularer Systeme auf biologisch relevanten Zeitskalen (Nanosekunden bis Millisekunden) aufgrund der Komplexität quantenmechanischer Bewegungsgleichungen i.A. auf die Anwendung klassischer Näherungen beschränkt sind, konzentrieren sich Simulationsstudien bzgl. der Beeinflussung von Proteinen durch Subterahertz-EMF auf mögliche klassische Effekte.

Aufgrund der in den letzten Jahrzehnten omnipräsent gewordenen Mobiltechnologie (Mobilfunk, WLAN) sind die Menschen und ihre Umwelt heute mit einer signifikanten Exposition gegenüber elektromagnetischer Strahlung im Mikrowellen-Frequenzbereich (300 MHz bis 300 GHz) konfrontiert. Infol-

gedessen stellt sich zunehmend die Frage nach den Effekten, die aus dieser verstärkten Exposition resultieren. Gleichzeitig rückt auch das therapeutische Potential elektromagnetischer Felder für neue medizinische Anwendungen ins Blickfeld.

Der Einfluss von EMF bzw. **elektrischen Wechselfeldern (EWF)** mit Frequenzen unterhalb des THz-Bereiches auf die Konformation von Proteinen, insbesondere in Bezug auf nichtthermische Effekte, war in jüngerer Zeit bereits Gegenstand einiger theoretischer Studien verschiedener Autoren u.a. [Ast12, Bud05, Bud07, Bud08, Eng07, Eng09, Eng15, Sol10, Sol12, Tod16]. In diesen Studien wurde der Effekt von EMF bzw. EWF, vor allem im Mikrowellen- und fernen Infrarot-Frequenzbereich, auf die Konformation von in Wasser gelösten Proteinen mithilfe von klassischen atomaren Molekular-Dynamik-(MD-)Simulationen (siehe Unterkapitel 2.1) untersucht. Dabei wurden insbesondere EMF-Effekte mit thermischen Effekten verglichen, wie sie durch die vom EMF bedingte Aufheizung des Mediums (Wasser) und des Proteins verursacht werden. Dabei ergab sich generell, dass nichtthermische Effekte elektrischer oder elektromagnetischer Felder auf Proteine (insbesondere nichtthermisch induzierte Störungen der Konformation) vorhanden sind, jedoch meist erst bei sehr hohen Effektivwerten der elektrischen Feldstärke von 10^8 V/m bis 10^9 V/m signifikant auftreten [Ast12, Bud05, Bud07, Bud08, Eng07, Eng09, Eng15, Sol10, Sol12, Oje10]. Die Effekte in Form von Störungen der Konformation bzw. Konformationsdynamik wurden dabei i.A. durch einfach zu bestimmende Größen quantifiziert, wie z.B. die mittlere quadratische Abweichung (RMSD; siehe Abschnitt 4.1.5, Gleichung (4.10)) der Proteinstruktur von der Ausgangsstruktur, die Entwicklung der Anteile bestimmter reduzierter struktureller Motive (DSSP; siehe [Kab83]) oder die Veränderung der Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen des Proteins.

Feldstärken des elektrischen Feldes oberhalb von 10^7 V/m kommen in der Zelle jedoch natürlicherweise nicht vor. Das stärkste bioelektrische Feld fällt über der Zellmembran ab und liegt in dieser Größenordnung [Tyn07]. Es darf gemutmaßt werden, dass höhere Feldstärken in der Zelle schon deshalb nicht auftreten, da bei elektrischen Feldstärken von 10^8 V/m bereits der dielektrische Zusammenbruch von Wasser erfolgt [Jos02]. Daher erscheinen Simulationsstudien bei derart hohen Feldstärken auch wenig angemessen [Swi07], insbesondere da chemische Bindungen bei Feldstärken der Größenordnung 10^9 V/m gebrochen werden können [Swi07]. Lediglich eine neuere Studie von Todorova [Tod16] bemüht sich um eine detailliertere Untersuchung bei realistischen Feldstärken.

In dieser Studie wurde ein kleines Peptid unter dem Einfluss von EMF und EWF mit Effektivwerten der elektrischen Feldstärke von 7×10^3 V/m bis 7×10^8 V/m mit der MD-Methode simuliert. Unterhalb von 7×10^6 V/m zeigten sich nach Aussage von Todorova keine signifikanten feldspezifischen Effekte. Oberhalb dieser Grenze vermerkt Todorova Veränderungen der Peptidkonformation, die jedoch nach Auffassung des Autors dieser Dissertation erst ab 7×10^7 V/m beginnen signifikant in Erscheinung zu treten. Insgesamt leidet diese Studie – jedoch in geringerem Ausmaß als die zuvor genannten Studien – unter einem aus Sicht des Autors zu geringen Simulations- bzw. Stichprobenumfang, um eine signifikante Aussage zu treffen: Lediglich 0.6 bis $4.8 \mu\text{s}$ an Simulationsdauer pro Feldstärke [Tod16, Supplementary Material].

Beachtenswert ist also insgesamt, dass all diese Studien auf relativ wenigen und kurzen Simulationen aufbauen und sich relativ simpler Analysetechniken bedienen, die für die Identifikation von komplexen und gering ausgeprägten Effekten ungenügend sind. Daher kann zum Einen bezweifelt werden, dass die Teststärke der Studien ausreicht, um einen vermutlich sehr geringen Effekt nachzuweisen. Zum Anderen kann infrage gestellt werden, ob die verwendeten Analysemethoden selbst bei ausreichender Teststärke genügt hätten, um einen sehr kleinen Effekt aufzuzeigen.

Im Rahmen der in dieser Dissertation präsentierten Studien wird insbesondere der Einfluss von elektromagnetischen Feldern im Mikrowellen-Frequenzbereich auf die Konformation von Proteinen – am Beispiel des **Amyloid- β -(1-40)-Peptids ($A\beta_{40}$)** mit 40 Aminosäuren – *in silico* untersucht.

Die Frequenz des elektrischen Wechselfeldes wurde zu 1 GHz festgelegt, da dieser Wert innerhalb des sogenannten δ -Dispersionsbandes (hunderte MHz bis zu einigen GHz) bei der dielektrischen Spektroskopie (eine experimentelle Methode zur Untersuchung der dielektrischen Eigenschaften eines Mediums) liegt [Pad07, 1.4, S. 28–31]. Das δ -Dispersionsband liegt zwischen dem β -Dispersionsband (ca. 100 kHz bis 100 MHz), das mit Taumelbewegungen von ganzen Proteinen im EWF korrespondiert, und dem γ -Dispersionsband (ca. 10 GHz bis 100 GHz), das mit der Relaxation von Wassermolekülen im EWF assoziiert ist [Pad07, 1.4, S. 28–31]. Die genauen Prozesse, die das δ -Dispersionsbandes verursachen, sind Gegenstand andauernder Untersuchungen und Diskussionen. Zum Einen wird es durch Protein-Wasser-Interaktionen verursacht. Zum Anderen werden jedoch auch gewisse Bewegungen innerhalb der Proteinstruktur, wie Strukturdynamik in ungeordneten Bereichen (mit keiner oder kaum Sekundärstruktur), Helixverformungen oder -beugungen und das „Atmen“ (wechselndes Ausdehnen und Zusammenziehen) von Strukturen wie β -Faltblättern mit EWF im MHz- und GHz-Bereich assoziiert

[Pad07, 4.4.3, S. 83]. Weiterhin werden auch Bewegungen wasserexponierter geladener Peptidseitengruppen im EWF auf einer Zeitskala von Nano- und Pikosekunden mit MHz/GHz-Frequenzen assoziiert [Pad07, 4.4.3, S. 83].

Demgegenüber fällt die Dynamik auf der Ebene ausgedehnter Sekundärstrukturen – d.h. ganzer Helizes und Faltblätter – in den Bereich geringerer Frequenzen unterhalb des MHz-Bandes [Pad07, 4.4.3, S. 83]. Um Effekte innerhalb einer realisierbaren Simulationsdauer von Nano- und Mikrosekunden signifikant verzeichnen zu können, kann jedoch der MHz- besser GHz-Frequenzbereich nicht sinnvoll unterschritten werden, da bei Periodendauern von mehr als wenigen 10 ns nicht mehr genügend Periodendurchläufe innerhalb der Simulationsdauer realisiert werden können. Daher fiel die Wahl des Autors auf eine niedrige GHz-Frequenz des EWF von $f = 1$ GHz, einhergehend mit einer noch kurzen Periodendauer $T_{\text{Periode}} = 1$ ns. Der Effektivwert der Feldstärke des elektrischen Wechselfeldes wurde zu 1×10^7 V/m festgelegt. Dieser Wert liegt im Größenordnungsbereich der maximalen in der Zelle natürlich auftretenden elektrischen Feldstärken. Geringere Feldstärken müssen gemäß der Vergleichsliteratur [Tod16] auf den mittels MD-Simulationen gut zugänglichen Zeitskalen von Nano- bis Mikrosekunden als unwirksam (im Sinne des Fehlens eines signifikanten Effekts des Feldes auf die Konformationsdynamik) angesehen werden. Tatsächlich unterschreitet die gewählte Feldstärke sogar den gemäß des allergrößten Teils der Vergleichsliteratur wirksamen Größenordnungsbereich von 10^8 V/m bis 10^9 V/m.

Gemäß Kabsch und Sanders hat eine stabile Wasserstoffbrückenbindung (kurz: H-Brücke) in Proteinen eine elektrostatische Energie von 3 kcal/mol \approx 12.552 kJ/mol und unterhalb von 0.5 kcal/mol \approx 2.092 kJ/mol gehen Kabsch und Sanders davon aus, dass keine H-Brücke mehr vorliegt [Kab83]. Das Dipolmoment $\boldsymbol{\mu}$ eines Moleküls koppelt mit dem elektrischen Feld \boldsymbol{E} und besitzt dadurch die potentielle Energie

$$V_{\mu} = -\boldsymbol{\mu} \cdot \boldsymbol{E}. \quad (1.1)$$

Um nun eine Abschätzung für die Energie zu erhalten, welche durch die Kopplung des $A\beta_{40}$ -Peptids an das externe elektrische Feld frei wird, kann eine Publikation von Toschi [Tos09] herangezogen werden. Dort wurde der Einfluss eines statischen elektrischen Feldes mit Werten der Feldstärke von 10^8 , 2.5×10^8 , 5×10^8 und 10^9 V/m auf die Konformation von $A\beta_{40}$ in wenigen kurzen Simulationen von je 10 ns Dauer untersucht. Diese Feldstärken liegen um eine bis zwei Größenordnungen oberhalb des vom Autor noch als physiologisch sinnvoll erachteten Effektivwertes der Feldstärke von 10^7 V/m. Das Dipolmoment des Moleküls in [Tos09, Figure 4] überschreitet in der

Simulationsdauer selbst für eine Feldstärke von 10^9 V/m einen Wert von etwa $\mu = 130$ Debye nicht.

Bei Betrachtung eines EWF folgt der Dipol in seiner Ausrichtung dem Wechselfeld, solange dieses nicht zu schnell schwingt. Vereinfacht kann dies für ein EWF mit einem Effektivwert der Feldstärke von $E_{\text{eff}} = 10^7$ V/m als Umklappen des Moleküldipols zwischen zwei extremalen Ausrichtungen im Feld beschrieben werden, das zwischen seinen Extremwerten $E_{\text{max}} = \sqrt{2} \cdot E_{\text{eff}} \approx 1.414 \times 10^7$ V/m und $E_{\text{min}} \approx -1.414 \times 10^7$ V/m wechselt. Nimmt man sehr großzügig obigen Wert des Dipolmoments auch für einen Effektivwert der elektrischen Feldstärke von 10^7 V/m an, so wird gemäß Gleichung (1.1) – bei paralleler Ausrichtung von Dipol und Feld – pro Umklappvorgang die Energie

$$\begin{aligned}
 V_{\mu} &= N_A \cdot \mu \cdot E \\
 &= 6.022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1} \cdot 130 \text{ Debye} \cdot 1.414 \times 10^7 \text{ V/m} \\
 &\approx 6.022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1} \cdot 130 \cdot 3.33564 \times 10^{-30} \text{ Cm} \cdot 1.414 \times 10^7 \text{ V/m} \\
 &\approx 3.692 \text{ kJ mol}^{-1}
 \end{aligned}
 \tag{1.2}$$

frei. Demgemäß sollte selbst die gesamte pro Umklappvorgang vom elektrischen Feld auf das Peptid übertragene Energie kaum genügen, um eine einzelne selbst schwache Wasserstoffbindung zu brechen. Innerhalb einer Periode von 1 ns treten zwei solche Umklappprozesse auf. Somit ist der unmittelbare Bruch von H-Brücken innerhalb von Nano- oder gar Pikosekunden durch das externe Feld nicht sehr wahrscheinlich. Es darf von eher kleinen Konformationsänderungen durch geringe Verschiebung der einzelnen geladenen Proteinatome im externen Feld ausgegangen werden, die dann eine Tendenz zu bestimmten Konformationen im längeren Zeitverlauf (hunderte Nanosekunden und Mikrosekunden) induzieren könnten.

Elektronische und ionische Polarisierungseffekte werden hier – wie auch in anderen Studien [Ast12, Bud05, Bud07, Bud08, Eng07, Eng09, Eng15, Sol10, Sol12, Tod16] zum Einfluss von EMF bzw. EF auf die Proteinkonformation – vernachlässigt, obwohl sie nichtverschwindend sind. Dies begründet sich darin, dass sie im betrachteten Feldstärken- und Frequenzbereich gering ausgeprägt sind und ihre Berücksichtigung zu einem dramatischen Effizienzverlust der MD-Methode führt. Illustrativ lässt sich die Größe des induzierten Dipolmoments von Wasser bei einer Feldstärke von 10^7 V/m berechnen gemäß

$$\mu_{\text{ind}} = \alpha \mathbf{E} \tag{1.3}$$

zu $1.64 \times 10^{-33} \text{ Cm} \approx 4.92 \times 10^{-4} \text{ Debye}$ mit der Polarisierbarkeit $\alpha = 1.64 \times 10^{-40} \text{ Cm}^2 \text{ V}^{-1}$. Somit ist das induzierte Dipolmoment von Wasser bei dieser recht hohen Feldstärke mehr als drei Größenordnung kleiner als das permanente Dipolmoment $\mu \approx 1.8 \text{ Debye}$ [Fre05, S. 4]. Der prozentuale Anteil der Verschiebungs- und Ionenpolarisation an der Polarisierbarkeit α eines Mediums ist im Mikrowellenfrequenzbereich gering, dort macht die Orientierungspolarisation den Hauptteil aus [Fre05, S. 5],[Pad07, Chapter 2, insb. Figure 2.2].

Die Orientierungspolarisation wird durch die Kopplung der atomaren Ladungen bzw. Dipole mit dem Feld gemäß $\mathbf{F}_{i,\text{el}} = q_i \mathbf{E}$ bzw. $V_\mu = -\boldsymbol{\mu} \cdot \mathbf{E}$ beschrieben. Dieser Effekt kann einfach bei der “nichtpolarisierbaren” MD-Methode inkorporiert werden [Eng15]. Hingegen erfordert die Berücksichtigung der Ionen- und Verschiebungspolarisation selbst in klassischer Näherung spezifische Modifikationen der Standard-MD-Methodik, welche die Effizienz der MD-Methode signifikant reduzieren und darüber hinaus noch Gegenstand intensiver Entwicklung und daher unausgereift sind [Lop13, Ner18]. Daher wird im Rahmen dieser Dissertation die Standard-MD-Methode verwendet, lediglich ergänzt um einen einfachen additiven Kraftfeldterm zur Berücksichtigung der Kopplung des EWF mit den atomaren Ladungen.

Da nun – wie oben erläutert – bei einer Frequenz von 1 GHz des EWF mit noch physiologischer Feldstärke von 10^7 V/m eher diffizile Dynamiken dipolarer Peptidsubstrukturen zu erwarten sind und unmittelbar feldinduzierte Brüche von H-Brücken nicht wahrscheinlich sind, ist die Auswahl eines geeigneten Testpeptids besonders wichtig. Dieses sollte ein hohes Maß an struktureller Flexibilität und ungeordneten Strukturanteilen aufweisen und sich nicht in einem stabilen Zustand befinden. Daher wurde das humane Amyloid- β -(1-40)-Peptid $A\beta_{40}$ [Col98] als Testsystem ausgewählt.

$A\beta_{40}$ wird von den β -Sekretase- und γ -Sekretase-Enzymen aus dem Amyloid-Prekursor-Protein (APP) – einem in den neuronalen Synapsen konzentrierten Membranprotein – geschnitten. Das $A\beta_{40}$ -Peptid ist besonders interessant, da es unter physiologischen Bedingungen in einer Vielzahl von teilweise strukturierten Zuständen vorkommt, die vorzugsweise sowohl β -Faltblatt- und α -Helix-Strukturen als auch α/β -Mischstrukturen aufweisen [Sgo11, Yan08]. Während $A\beta_{40}$ in apolaren und micellaren Umgebungen – wie der Zellmembran – vorzugsweise in α -Helix-Struktur vorliegt [Col98], weist es in wässriger Umgebung auch stabile Strukturen mit einem hohen β -Faltblatt-Anteil auf [Nas15]. Hierbei ist $A\beta_{40}$ in der β -Faltblattstruktur und in α/β -Mischstrukturen toxisch oder neigt dazu toxische Oligomere zu bilden [Nas15]. Diese treten in Alzheimer-assoziierten Gehirnläsionen – sogenannten senilen Plaques – häufig auf. Aus diesem Grunde werden β -

Strukturen und α/β -Mischstrukturen allgemein als Alzheimer-assoziierte Pathogene interpretiert, wohingegen die vornehmlich α -helikalen Strukturen als unbedenklich gewertet werden [Nas15]. An diesem System kann sehr gut untersucht werden, ob die Einwirkung eines elektromagnetischen Feldes eine Tendenz zu einer der Strukturen induziert, bzw. die Destabilisierung der Helixstruktur und den Übergang zu β -Faltblatt- und α/β -Strukturen in wässriger Umgebung begünstigt.

$A\beta_{40}$ ist mit einer Länge von 40 Aminosäureresten nicht so groß, dass die Erzeugung eines Datensatzes unpraktikabel wäre, der umfangreich genug ist, um statistisch signifikante Ergebnisse zu erzielen. Gleichzeitig weist es für seine geringe Größe eine außergewöhnliche Mannigfaltigkeit an Konformationszuständen auf. Dies erleichtert den Nachweis eines eventuellen Mikrowelleneinflusses im Vergleich zu einem Protein, das nur wenige Übergänge zwischen einer geringen Anzahl von Zuständen oder gar einen fast ausschließlich frequentierten, ausgezeichneten und stabilen Zustand aufweist. Gerade dieser Punkt kann an vielen Vergleichsstudien besonders bemängelt werden: Es wurden oft sehr stabile Systeme wie HEWL (*Hen Egg White Lysozyme*; deutsch: Lysozym des Hühnereiklars) [Eng07, Eng09, Sol10] oder Insulin [Bud05, Bud07, Bud08] untersucht, die durch geringe Störungen kaum zu destabilisieren sind.

Zusammenfassend wird in dieser Dissertation die Hypothese zur Disposition gestellt, dass externe EWF und EMF im Mikrowellenbereich mit noch physiologischen Intensitäten einen nichtthermischen Effekt auf die Konformationsdynamik von Proteinen – wie oben präzisiert – ausüben.

Zur Untersuchung des nichtthermischen EWF/EMF-Effektes auf Proteine wird die etablierte klassische MD-Methodik verwendet, die den Stand der Technik darstellt, jedoch unter der Prämisse die oben genannten Schwachpunkte bzgl. Testsystem, Teststärke und Analyse der meisten Simulationsstudien zu dieser Fragestellung zu beseitigen. Dazu wurden sowohl sehr viel umfangreichere Simulationen als in der Vergleichsliteratur durchgeführt als auch insbesondere eine sehr hochentwickelte geeignete Analysemethodik – die Markov-Modellierung – angewandt.

1.2 Zur Notwendigkeit der Generalisierung der Markovmodellierung¹

Eine der größten Herausforderungen bei der Durchführung und Analyse biomolekularer Simulationen besteht darin, die relevanten Konformationsänderungen zu bestimmen ohne auf übermäßig vereinfachte – räumlich und zeitlich grobgekörnte – Simulationsmodelle zurückgreifen zu müssen, welche die Prozessdynamik verfälschen würden. Stattdessen ist es erstrebenswert die Genauigkeit atomistischer Simulationsmodelle auszunutzen und gleichzeitig dennoch relativ einfach und möglichst automatisiert während der Analyse eine klare Identifikation und Selektion der relevanten Konformationen und ihrer Dynamik zu erhalten.

Da atomistische Simulationsmodelle neben den Atomen des Biomoleküls (der Biomoleküle) auch sämtliche zehner- oder gar hunderttausende Atome der umgebenden Wassermoleküle beinhalten, ist eine dramatische Reduktion der Freiheitsgrade des untersuchten Systems während der Analyse erforderlich. Diese systematische Komplexitätsreduktion stellt ein schwieriges aber zwingend notwendiges Unterfangen dar, um der immensen Datenmengen Herr zu werden, die bei den beschriebenen hochdimensionalen Simulationen über Milliarden von Zeitschritten anfallen.

Eine in jüngster Zeit äußerst beliebte und erfolgreiche Methode zu diesem Zwecke ist die Markov-Modellierung (englisch: *Markov state modeling*). Es handelt sich dabei um eine mathematisch rigorose Methode, die von Schütte [Sch99] für MD-Simulationen adaptiert und in jüngsten Jahren von ihm und Anderen verfeinert wurde [Swo04, Sin05, Noé07, Cho07, Buc08].

Durch Markov-Modellierung konstruierte Markov-Modelle (englisch: *Markov State Models* (MSM); siehe Abschnitt 3.4.1) [Cho14] haben in den jüngsten Jahren einen starken Popularitätswachstum erlebt, der sich weiterhin ungebremst fortsetzt. Dies liegt insbesondere darin begründet, dass MSM die einfache Zusammenführung von Datensätzen aus Simulationen verschiedener Länge ermöglichen und die relevanten Metastabilitäten sowie die Kinetik des modellierten Molekülsystems abbilden. Desweiteren hat sich die Markov-Modellierung als hervorragende Methode zur Ableitung der Langzeitdynamik von Molekülsystemen aus vielen kurzen MD-Simulationsdatensätzen ergeben. Dies ist von größtem Vorteil, da die Stichprobenentnahme aus der Gesamtheit der möglichen Konformationen eines Moleküls durch wenige lange Simulationen meist eine deutlich eingeschränktere Abtastung (englisch:

¹ Das Unterkapitel folgt (ergänzt und überarbeitet) der Darstellung der Einleitung der Publikation [Reu18] des Autors.