JÜLICH
FORSCHUNGSZENTRUM
Institute of Complex Systems
Strukturbiochemie (ICS-6)

HEINRICH HEINE
UNIVERSITÄT DÜSSELDORF
Institut für Theoretische Chemie
und Computerchemie

Bachelorarbeit im Studiengang Biochemie der

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Simulationsstudie zur Interaktion von EGCG mit sich selbst und dem Amyloid-β-Peptid

vorgelegt von

Jennifer Loschwitz

Erstgutachterin: Jun.-Prof. Dr. Birgit Strodel

Zweitgutachterin: Prof. Dr. Christel Marian

Abgabetermin: 04.09.2014

Abstract

In dieser Arbeit soll gezeigt werden, inwieweit das Antioxidans Epigallocatechingallat (EGCG) aus dem Grüntee-Extrakt mit ausgewählten Amyloid-β (Aβ)-Peptiden interagiert. Das Aβ-Protein ist einer der Hauptverursacher der Alzheimer-Krankheit aufgrund seiner Oligomerbildung. Mithilfe von Molekulardynamik (MD)-Simulationen wird die Wechselwirkung zwischen EGCG und dem gesamten Protein Aβ(1-42) bzw. dessen Fragmenten untersucht. Des Weiteren wird die Interaktion von EGCG mit sich selbst bei Konzentrationen von 10 und 100 mM analysiert, um das Verhalten von EGCG in Lösung kennenzulernen.

Es wurde ersichtlich, dass die intermolekularen Interaktionen von EGCG-Molekülen im Wesentlichen auf π-Stapelwechselwirkungen und auf nicht so sehr Wasserstoffbrückenbindungen basieren. Das Aβ(16-23)-Fragment spielt bei der Aβ-Aggregation zu Oligomeren und Fibrillen eine große Rolle wegen der Interaktion der Phenylalanine und bildet keine β-Faltblätter in Anwesenheit von EGCG aus. In Fibrillen tritt verstärkt die β-Faltblatt-Struktur auf. Dagegen tauchen ohne EGCG β-Faltblätter in diesem Peptid auf. Das Fragment 11-15 besitzt zwei Histdine, die an der Herstellung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) beteiligt sind, und weist weniger Wechselwirkungen mit EGCG auf. Im gesamten Peptid Aβ(1-42) entsteht zeitweise ein β-Faltblatt in der Nähe des C-Terminus, das nach der vollständigen Anlagerung von EGCG-Molekülen verschwindet. Anhand von Transitionsnetzwerken wurde eine statistische Analyse von 500ns-Simulationen zur Aggregation von Aβ(16-23)-Fragmenten ohne und mit EGCG durchgeführt. Dadurch wurde gezeigt, dass ohne EGCG der Dimerzustand des Fragments bei der Aggregation wichtig ist. Während der Interaktion mit EGCG lagern an dem EGCG-Aβ-Komplex hauptsächlich sowohl heterogene als auch homogene Dimere sowie Monomere an.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis iv

Tabellenverzeichnis v

Abbildungsverzeichnis v

1. Einleitung 1

1.1 Motivation und Ziel der Arbeit 1

1.2 Entstehung und Aggregation des Amyloid-β-Peptids 2

1.3 Das Antioxidans EGCG 4

2. Theorie und Methoden 6

2.1 Molekulardynamik 6

2.1.1 Integration durch *Leapfrog*-Algorithmus 7

2.1.2 Das Kraftfeld und dessen Komponenten 9

2.1.3 Parametrisierung von EGCG 13

2.1.4 Explizites Solvens als Wassermodell 14

2.2 Methoden zur Auswertung 15

2.2.1 *Total Solvent Accessible Surface Area* 15

2.2.2 Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen 16

2.2.3 Abstand und Abstandsmatrizen 17

2.2.4 DSSP-Algorithmus für Sekundärstrukturen 17

2.2.5 Transitionsnetzwerke 19

3. Vorbereitung und Parameter der MD-Simulationen 20

3.1 EGCG 20

3.2 EGCG mit ausgewählten Aβ-Fragmenten 21

3.3 EGCG mit dem Aβ(1-42)-Peptid 22

3.4 Energieminimierung und Äquilibrierung 23

4. Analyse und Diskussion 24

4.1 EGCG-Partialladung 24

4.2 Simulationen von EGCG 26

4.3 Simulationen von EGCG mit Aβ-Fragmenten 31

4.3.1 Verhältnis 1:1 32

4.3.2 Verhältnis 4:4 35

4.4 Transitionsnetzwerke 47

4.4.1 Aggregation von EGCG 47

4.4.2 EGCG mit dem Aβ(16-23)-Fragment 49

4.5 Interaktion von Aβ(1-42) mit EGCG 52

4.6 Diskussion 58

5. Zusammenfassung und Ausblick 61

6. Literaturverzeichnis 62

7. Anhang 67

7.1 Input-Dateien 67

7.2 Abstandsdiagramme bestimmter Systeme 70

7.3 Transitionsnetzwerk von 100 mM EGCG mit RESP-Ladungen 75

Abkürzungsverzeichnis

Aβ	Amyloid-β
Aβ(1-42)	Amyloid-β-Protein mit angegebener Anzahl der Aminosäuren
ACE	N-Terminus mit angehängter Acetyl-Gruppe in Aβ-Fragmenten
ACPYPE	*Ante Chamber PYthonParser interfacE*
AD	Alzheimersche Demenz
APP	Amyloid-Vorläufer-Protein (engl.: *Amyloid Precursor Protein*)
AS	Aminosäure
AM1-BCC	*Austin Model 1-Bond Charge Corrections*
DCLM	*Double Cubic Lattice Method*
DSSP	*Define Secondary Structure of Proteins*
e	Elementarladung mit dem Wert $1{,}602 \cdot 10^{-19}$ C
EGCG	(-)-Epigallocatechingallat
ESP	elektrostatisches Potential (engl.: *Electrostatic Potential*)
GAFF	*general-amber-forcefield*
H-Brücken	Wasserstoffbrückenbindungen
HF/6-31G*	Eine quantenchemische Methode basierend auf Hartree-Fock (HF)
ID	Identität der Übergänge in der Transitionsmatrix
M	Molekül
MD	Molekulardynamik
MM	Molekularmechanik
NME	C-Terminus mit einer angehängten N-Methylgruppe in Aβ-Fragmenten

PDB	*Protein Data Base*
PSEN1/2	Presenilin-1/2
QM	Quantenmechanik
RESP	*Restrained Electrostatic Potential*
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (engl.: *reactive oxygen species*)
SASA	*Solvent Accessible Surface Area*
SD	*Steepest Descent*
TN	Transitionsnetzwerk
VdW	van-der-Waals
VMD	*Visual Molecular Dynamics*

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Simulationsdaten der Systeme 10 und 100 mM EGCG. 20
Tabelle 2: Daten der Simulationen mit den Aβ-Fragmenten und EGCG. 22
Tabelle 3: Simulationsdaten für das System 10mM EGCG und ein Aβ(1-42)-Peptid. 23
Tabelle 4: Partielle Ladungen der Hydroxylgruppe des Tyrosins. 26
Tabelle 5: Einstellungen der Energieminimierung. 67
Tabelle 6: Parameter für die Äquilibrierung. 68
Tabelle 7: Beispiel der Input-Datei für eine MD-Simulation. 69

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Entstehung des Aβ-Peptids und dessen Aggregation 3
Abbildung 2: Lebenszyklus der amyloiden Proteinen 3
Abbildung 3: Die Struktur von EGCG. 4
Abbildung 4: Schematische Übersicht der kovalenten Bindungstermen im Kraftfeld... 11
Abbildung 5: Definition von SASA und andere Oberflächen 16
Abbildung 6: Die RESP- und AM1-BCC-Partialladungen von EGCG. 24

Abbildung 7: Unterschiede in der Partialldung der Hydroxylgruppen 25
Abbildung 8: Totale SASA von 10 mM (links) und 100 mM (rechts) EGCG 26
Abbildung 9: Gesamtanzahl der H-Brückenbindungen bei 10 mM und 100 mM EGCG 27
Abbildung 10: Abstandsmatrix der EGCG-Moleküle ab 30 ns. 28
Abbildung 11: Atomare Abstandsmatrizen und die Struktur von EGCG 30
Abbildung 12: Der Verlauf der Simulation von EGCG mit den Aβ-Molekülen (1:1) 32
Abbildung 13: Die prozentuale Häufigkeit der absoluten und normierten Anzahl der H-Brücken zwischen EGCG und dem zugehörigen Peptid 33
Abbildung 14: Abstandsmatrizen zwischen Aβ-Fragmenten und EGCG (1:1) 34
Abbildung 15: Totale SASA der Aβ-Fragmente und die EGCG-Moleküle 37
Abbildung 16: Anzahl der H-Brücken zwischen EGCG und den Aβ-Fragmenten (4:4) ... 38
Abbildung 17: Abstandsmatrizen der Aβ-Fragmente mit EGCG (4:4) 40
Abbildung 18: Abstandsmatrizen der Aβ-Peptide und EGCG-Atome(4:4) 41
Abbildung 19: Totale SASA und Anzahl der H-Brücken von Aβ(16-23) ohne EGCG. 42
Abbildung 20: Abstandsmatrix zwischen Aβ(16-23) ohne EGCG. 43
Abbildung 21: DSSP-Auftragung von Aβ(16-23) mit und ohne EGCG 44
Abbildung 22: Auftragung der Sekundärstruktur von Aβ(16-23) ohne EGCG 45
Abbildung 23: Sekundärstruktur der Aβ(16-23)-Fragmente mit EGCG 46
Abbildung 24: Transitionsnetwerke des Systems mit 10 mM und 100 mM EGCG. 48
Abbildung 25: Transitionsnetzwerk der Aβ(16-23)-Fragmente ohne EGCG 49
Abbildung 26: Transitionsnetzwerk der Aβ(16-23)-Peptiden mit EGCG 50
Abbildung 27: Totale SASA der EGCG-Molekülen und des Aβ(1-42)-Peptids. 53
Abbildung 28: Abstand und Anzahl der H-Brückenbindungen von Aβ(1-42) zu EGCG. . 54
Abbildung 29: Abstandsmatrix zwischen den EGCG-Molekülen und dem Aβ(1-42) 54
Abbildung 30: Abstandsmatrix zwischen den EGCG-Atomen und Aβ(1-42) 57
Abbildung 31: Sekundärstruktur von Aβ(1-42) 58
Abbildung 32: Abstände in der 10 mM-EGCG-Simulation. 71
Abbildung 33: Abstände zwischen den acht Moleküle bei 100 mM EGCG. 72
Abbildung 34: Abstände zwischen EGCG und den Aβ(11-15)-Fragmente 73
Abbildung 35: Abstand von EGCG zu den Aβ(16-23)-Peptiden 74
Abbildung 36: Abstand von EGCG zu den Aβ(31-33)-Peptiden 74
Abbildung 37: Transitionsnetzwerk von 100 mM EGCG (60 ns und RESP) 75

1. Einleitung

1.1 Motivation und Ziel der Arbeit

Die weltweite Anzahl von dementen Menschen nimmt stetig zu und soll nach aktuellen Prognosen bis 2050 auf 115 Millionen Menschen steigen[1]. Ein großer Teil davon leidet unter der Alzheimerschen Demenz (AD). Trotz intensiver Forschung gibt es bislang keine Heilung für die AD. Es sind nur therapeutische Medikamente für eine Verzögerung der Symptome der Krankheit erhältlich. Diese steigern die Aktivität der gesunden Nervenzellen im Gehirn, können den Krankheitsfortschritt jedoch meistens nur für einige Monate hinausgezögert werden[2]. Ein Ziel einer effektiven Therapie besteht in einer früheren Erkennung von AD, bevor die Neurodegeneration und Hirnatrophie eintritt [3].

Ähnlich wie bei der Parkinson-Krankheit, Diabetes mellitus Typ 2 und Chorea Huntington wird die AD durch ein kleines, lösliches, fehlgefaltetes Protein mit dem Namen Amyloid-β (Aβ) ausgelöst, welches am häufigsten aus 40 oder 42 Aminosäuren besteht. Zusammengefasst werden diese als Protein-Fehlfaltungskrankheiten und die krankheitsverursachenden Proteine als amyloide Peptide bezeichnet. In einigen Stunden bilden sich daraus Oligomere, die sich wiederum zu unlöslichen Fibrillen umwandeln. Diese lagern sich innerhalb von Jahren im Gehirn als sogenannte Plaques an, jedoch ist der exakte Mechanismus der Fehlfaltung ungeklärt[4]. Es ist bekannt, dass die kleinen löslichen Oligomere neurotoxisch sind[5], da sie die Membranen der Neuronen zerstören und reaktive Sauerstoffspezies (ROS) in Verbindung mit Metallionen wie Kupfer[6][7] herstellen. Wenn sich zu viele ROS in den Zellen befinden, sterben die Neuronen. Aufgrund dessen verliert der Patient im höheren Alter immer mehr seiner kognitiven Leistungsfähigkeit und muss betreut werden.

Im Moment gibt es viele potentielle organische Inhibitoren mit niedrigem Molekulargewicht, die die Aggregation von Aβ und der anderen Proteine, die Umwandlung in Oligomere und Fibrillen und somit deren Zytotoxizität verhindern können. Weitere therapeutische Ziele sind die Reduzierung des Expressionslevels dieser Peptiden, die Steigerung ihrer Beseitigungsrate und der Anstieg der Stabilität der ordentlich gefalte-

ten Proteinen[4]. Eines der kleinen Moleküle mit potentieller Wirksamkeit gegen AD ist das Polyphenol (-)-Epigallocatechin-3-gallat (EGCG), welches hauptsächlich aus Grüntee-Extrakt stammt. Es gibt experimentelle Anzeichen, dass EGCG die Aβ-Assemblierung und somit die Fibrillenbildung vermeiden könnte[8].

Das Ziel der Arbeit besteht in der Analyse der Interaktionen von EGCG mit sich selbst und mit dem Aβ-Peptid mithilfe von Molekulardynamik (MD)-Simulationen. Des Weiteren soll die Inhibition der Aβ-Aggregation durch EGCG untersucht werden. Dazu werden die beiden Moleküle für ein besseres Verständnis in den nachfolgenden Abschnitten kurz vorgestellt.

1.2 Entstehung und Aggregation des Amyloid-β-Peptids

Das Aβ-Peptid ist Hauptverursacher der Alzheimer Krankheit und wird durch eine anormale Proteolyse des Amyloid-Vorläufer-Proteins (engl.: *Amyloid Precursor Protein*, APP) gebildet. Schematisch ist der Ablauf der Aβ-Aggregation in Abbildung 1 dargestellt. APP ist ein integrales Membranprotein und vermutlich an der Synapsenbildung beteiligt, allerdings ist die genaue Funktion unbekannt[9].

Die proteolytische Spaltung von APP kann durch α-, β-, und γ-Sekretasen erfolgen. Wenn APP über die α-Sekretase in der Mitte der Aβ-Domäne in der Membran gespalten wird, entsteht kein toxisches Abbauprodukt. Dies ist die normale Proteolyse im gesunden Gehirn. Aber mit zunehmendem Alter wird das APP zunächst durch die extrazellulären β- und später durch transmembrane γ-Sekretase-Spaltung zerteilt, wodurch sich das Aβ mit 38 bis 43 Aminosäuren bildet[10]. Von allen Varianten ist das Aβ(1-42) aufgrund seiner schnellen Oligomerbildung das toxischste Peptid[11]. Die neurotoxischen Aβ-Peptide werden außerhalb der Zelle freigesetzt und die Assemblierung von Oligomeren zu unlösliche Fibrillen beginnt (Abb. 2). Diese weisen hauptsächlich β-Faltblätter auf und können lokale Entzündungsreaktionen auslösen.

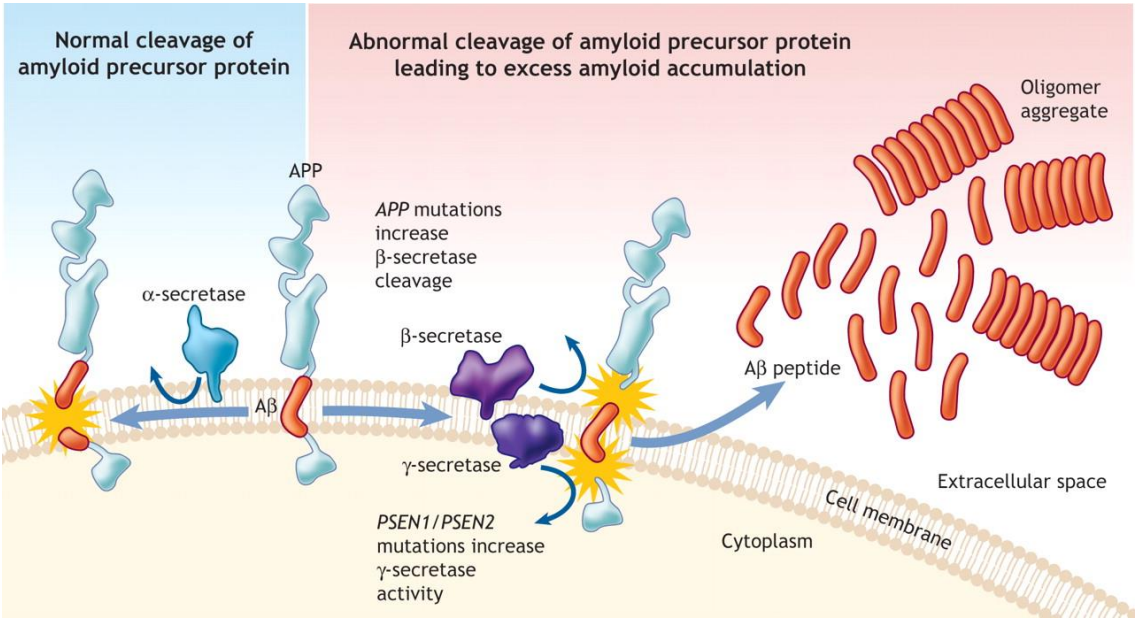


Abbildung 1: Entstehung des Aβ-Peptids und dessen Aggregation. Dieses Bild wurde aus dieser Referenz[12] entnommen.

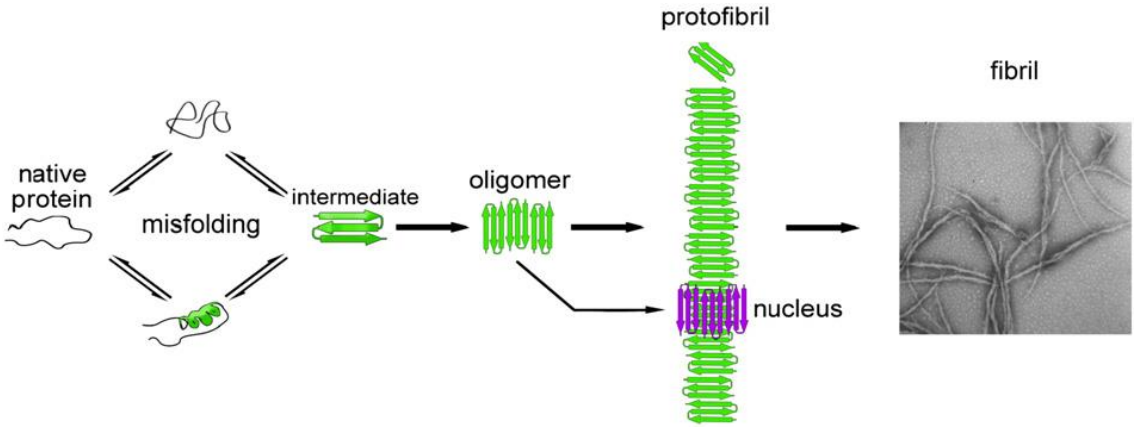


Abbildung 2: Lebenszyklus der amyloiden Proteine vom nativen Zustand zur endgültigen Fibrillenform, welche reich an β-Faltblättern ist. Ein Nucleus bezeichnet strukturierte Oligomere, aus denen sich die Protofibrillen bilden. Entnommen aus Quelle[4].

Des Weiteren können Mutationen in APP-Genen zur Verhinderung des α-Sekretase-Abbaus von APP führen, wodurch die Spaltung der β-Sekretase begünstig wird. Zudem können Mutationen der Gene Presenilin-1 und Presenilin-2 (PSEN1, PSEN2) zu einem

Anstieg der Spaltungsrate durch die γ-Sekretase führen. Diese Gene kodieren Komponenten der γ-Sekretase. In beiden Fällen steigt die Aβ-Produktion. In der Konsequenz entstehen oxidativer Stress und biochemische Veränderungen, die letztendlich zur neuronalen Apoptose und zur Entwicklung der die AD typischen Nerven-Plaques führen[12]. Dabei treten auch mitochondriale Fehlfunktionen aufgrund von Schäden durch ROS auf[13].

1.3 Das Antioxidans EGCG

Obgleich sich im Grüntee viele verschiedene Polyphenole befinden, macht das EGCG circa ein Drittel der Trockenmasse des Tees aus. Allgemein ist bekannt, dass EGCG antioxidantische Fähigkeiten besitzt. Es trägt zum Schutz der Zellen durch Modulation der Signaltransduktionswege, der Zelltod-Gene und der mitochondrialen Funktion bei[14]. Da EGCG die Blut-Gehirn-Schranke passieren kann, ist eine Wechselwirkung mit Aβ möglich. In Abbildung 3 ist die Struktur von EGCG zu sehen. Die in rot markierten Gruppen spielen wahrscheinlich eine besondere Rolle bei der Interaktion mit Aβ.

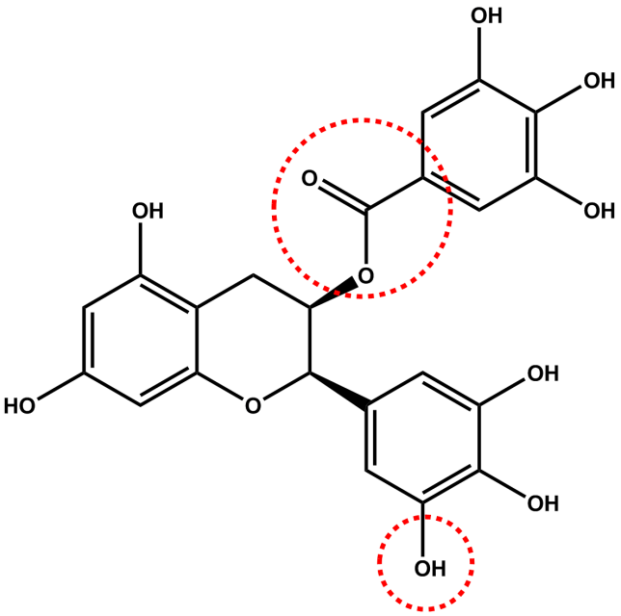


Abbildung 3: Die Struktur von EGCG. Die chemischen Gruppen, die mutmaßlich mit dem Aβ-Protein wechselwirken, sind rot eingekreist. Die Grafik wurde aus Referenz[4] entnommen.

Wenn diese und weitere Hydroxylgruppen entfernt werden, verliert es seine inhibitorische Eigenschaft auf die amyloide Proteinaggregation, was am Insel-Amyloid-Polypeptid gezeigt wurde[15]. Dieses fehlgefaltete Peptid spielt bei Diabetes mellitus Typ 2 eine Rolle.

Außerdem weist EGCG die Fähigkeit auf, ausgereifte Amyloid-Fibrillen in weniger toxische, amorphe Proteinaggregate umzuwandeln[16]. In einer *in vivo*-Studie wurde nachgewiesen, dass EGCG das beeinträchtige Lernen und das Gedächtnis von transgenen APP/PSEN1-AD-Modellmäusen verbessert und somit nach längerem Konsum die AD-relevanten kognitiven Defizite vermindern könnte[17]. Auch wenn der molekulare Mechanismus der Wirkungsweise von EGCG noch aufgeklärt werden muss, wird es aktuell einer klinischen Studie unterzogen und befindet sich in Phase II[18]. Das Verständnis des Inhibitionsmechanismus von EGCG ist nicht nur essentiell für die Medikamentenentwicklung, sondern auch zur Vermeidung von potentiellen Nebeneffekten.

2. Theorie und Methoden

Nachfolgend werden die Theorie der molekularen Dynamik (MD) und die Verfahren zur Analyse beschrieben. Für die Produktion und Analyse der MD-Simulationen wurde das MD-Programm *GROMACS*[19] verwendet.

2.1 Molekulardynamik

Die Dynamik eines Systems, welches zum Beispiel aus einem Peptid und zugehörigem Liganden bestehen kann, ist sehr wichtig, um die Abläufe bestimmter Prozesse wie die Aggregation, Wechselwirkung und Faltung von Proteinen zu verstehen. Dazu kann die Molekulardynamik genutzt werden, die in den letzten Jahren ein bedeutender Teil der Computersimulation geworden ist.

In MD-Simulationen werden die Newtonschen Bewegungsgleichungen für ein System aus N interagierenden Atomen für einen kleinen Zeitschritt gleichzeitig gelöst. Die Kraftberechnung basiert auf der klassischen Molekularmechanik (MM). Dabei werden die Atome als Punktteilchen mit einer Masse im klassischen Sinne berücksichtigt und elektronische Freiheitsgerade nicht betrachtet. Aufgrund dessen werden quantenchemische Effekte wie Elektronenbewegungen oder chemische Reaktionen in der MM-MD vollständig ignoriert [20]. Das zweite Newtonsche Gesetz ist die Grundlage der MD-Simulation und lautet folgendermaßen:

$$F_{i,n} = \frac{\partial p_{i,n}}{\partial t} = \frac{\partial (m_i v_{i,n})}{\partial t} = m\frac{\partial^2 r_{i,n}}{\partial t^2} = m_i \cdot a_{i,n} \quad i = 1, 2, 3, \dots, N \quad n = x, y, z \qquad (1)$$

Die Kraft F, welche auf ein Teilchen wirkt, beschreibt die zeitliche Veränderung von dessen Impuls p bzw. ist identisch zu seiner Masse m, auf die eine Beschleunigung a wirkt. Wiederum sind die Beschleunigungen durch die erste Ableitung der Geschwindigkeit $v_{i,n}$ der N Partikel in x-, y- und z- Richtung oder die zweite Ableitung der Atomposition r nach der Zeit definiert. Zudem ist die Kraft auch die Ableitung der potentiellen Energie U(R) nach den Ortskoordinaten der Teilchen definiert. Diese ist in Gleichung 2 dargestellt, wobei R der kartesische Vektor der Atomposition ist.

$$F_{i,n} = -\frac{\delta U(R)}{\delta r_{i,n}} = m_i \cdot \dot{v}_{i,n} \qquad (2)$$

Die Potentialfunktion U(R) beschreibt das Kraftfeld, welches aus den verschiedenen inter- und intramolekularen Wechselwirkungen der Atome besteht und somit bestimmte Parameter enthält. Dabei wird die Gleichung 2 numerisch integriert, wie im Abschnitt 2.1.1 beschrieben wird. Während der Integration wird das NPT-Ensemble angewendet, bei dem die Teilchenanzahl (N), Druck (P) und Temperatur (T) konstant gehalten werden. Nur das Volumen und die Energie sind veränderbar. Dazu wird der Nosé-Hoover-Thermostat und Parinello-Rahman-Barostat für die Simulationen benutzt.

2.1.1 Integration durch *Leapfrog*-Algorithmus

Für jeden Zeitschritt werden die Bewegungsgleichungen der Partikel gelöst, indem diese über gewisse Algorithmen integriert werden. In dieser Arbeit wird der *Leapfrog*-Integrator genutzt, der eine Variante des Verlet-Algorithmus darstellt. Es werden für jeden Zeitpunkt t die Positionen, Geschwindigkeiten und Beschleunigungen der Atome neu berechnet, welche aus der Kraft, die auf die Atome wirkt, resultieren. Der Verlet-Integrator basiert auf zwei Taylorreihen der Teilchenpositionen für den Vorwärts- und Rückwärtsschritt, um die neuen Positionen zum Zeitpunkt t + Δt aus dem aktuellen und vorherigen Schritt zu bestimmen. Dies ist in Gleichung 3 und 4 zusammengefasst:

$$\mathrm{r}(\mathrm{t}+\Delta\mathrm{t}) = \mathrm{r}(\mathrm{t}) + \mathrm{v}(\mathrm{t})\Delta\mathrm{t} + \frac{\mathrm{f}(\mathrm{t})}{2\mathrm{m}}\Delta\mathrm{t}^2 + \frac{\Delta\mathrm{t}^3}{3!}\dddot{\mathrm{r}} + \mathrm{O}(\Delta\mathrm{t}^4) \qquad (3)$$

$$\mathrm{r}(\mathrm{t}-\Delta\mathrm{t}) = \mathrm{r}(\mathrm{t}) - \mathrm{v}(\mathrm{t})\Delta\mathrm{t} + \frac{\mathrm{f}(\mathrm{t})}{2\mathrm{m}}\Delta\mathrm{t}^2 - \frac{\Delta\mathrm{t}^3}{3!}\dddot{\mathrm{r}} + \mathrm{O}(\Delta\mathrm{t}^4) \qquad (4)$$

Wenn die beiden Gleichungen addiert werden und nach r(t + Δt) umgestellt werden, wird die Berechnung der Position für den nächsten Schritt erhalten:

$$\mathrm{r}(\mathrm{t}+\Delta\mathrm{t}) = 2\mathrm{r}(\mathrm{t}) - \mathrm{r}(\mathrm{t}-\Delta\mathrm{t}) + \frac{\mathrm{f}(\mathrm{t})}{\mathrm{m}}\Delta\mathrm{t}^2 + \mathrm{O}(\Delta\mathrm{t}^4) \qquad (5)$$

Dabei beinhaltet der Parameter $O(\Delta t^4)$ den Fehler der Genauigkeit in der Position. Des Weiteren ist ersichtlich, dass die Berechnung der Geschwindigkeit $v(t)$ noch erforderlich ist, aus welcher sich dann die kinetischen Energie und die Temperatur ergeben. Aufgrund dessen muss diese separat berechnet werden, indem die vorherige Position $r(t - \Delta t)$ von der neuen Position $r(t + \Delta t)$ abgezogen wird, um den Abstand zu erhalten, der während des Zeitintervalls der Länge $2\Delta t$ zurückgelegt wurde. Damit kann die Geschwindigkeit der aktuellen Position ermittelt werden, wobei der Genauigkeitsfehler $O(\Delta t^2)$ beträgt, welcher mit der Zeitschrittlänge zum Quadrat skaliert:

$$v(t) = \frac{r(t + \Delta t) - r(t - \Delta t)}{2\Delta t} + O(\Delta t^2) \tag{6}$$

Es ist zu beachten, dass der Verlet-Algorithmus zwei initiale, nachfolgende Schritte für die Integration der Bewegungsgleichungen und für die Berechnung der Geschwindigkeiten benötigt.

Aus diesem Grund wurden weitere Integrator-Algorithmen entwickelt, wie zum Beispiel der *Leapfrog*-Algorithmus. Hierbei werden die Geschwindigkeiten bei einem halben Zeitschritt berechnet, um mit diesen die neuen Positionen der Teilchen zu bestimmen. Zuerst werden die Gleichungen 3 und 4 voneinander subtrahiert, ab dem dritten Term der Taylorreihe abgeschnitten und nach der aktuellen Geschwindigkeit umgestellt, wodurch in Gleichung 7 folgender Zusammenhang entsteht:

$$v(t) = \frac{r(t + \Delta t) - r(t - \Delta t)}{2\Delta t} + O(\Delta t^3) \tag{7}$$

Im Vergleich zu Gleichung 6 gewinnt man eine Ordnung der Genauigkeit in der Geschwindigkeit. Im Unterschied zum Verlet-Algorithmus beginnt der *Leapfrog*-Integrator ab diesem Punkt:

$$v(t - \Delta t/2) = \frac{r(t) - r(t - \Delta t)}{\Delta t} + O(\Delta t^3) \tag{8}$$

$$v(t + \Delta t/2) = \frac{r(t + \Delta t) - r(t)}{\Delta t} + O(\Delta t^3) \tag{9}$$

Bei der Umstellung von Gleichung 9 nach r(t + Δt) werden die aktualisierten Positionen der Partikel berechnet:

$$r(t + \Delta t) = r(t) + \Delta t v(t + \Delta t/2) + O(\Delta t^3) \quad (10)$$

Die Geschwindigkeiten werden durch die Subtraktion der Gleichungen 8 und 9 sowie durch die Kombination mit Gleichung 5 aktualisiert:

$$v(t + \Delta t/2) = v(t - \Delta t/2) + \Delta t \frac{f(t)}{m} + O(\Delta t^3) \quad (11)$$

Aus beiden Integrationen resultieren dieselben Trajektorien, wobei beim *Leapfrog*-Algorithmus eine höhere Genauigkeit der Geschwindigkeiten und folglich für die Temperatur und die kinetischen Energie vorhanden ist. Jedoch verringert sich die Exaktheit der Positionen um eine Ordnung. Der weitere Nachteil dieses *Leapfrog*-Integrators ist die zeitversetzte Berechnung der Positionen und Geschwindigkeiten von einem halben Zeitschritt. Dementsprechend können die potentielle und kinetische Energie nicht zur selben Zeit bestimmt werden, wodurch die Berechnung der totalen Energie nicht direkt erfolgen kann[21].

Dieses Problem kann durch den *Velocity*-Algorithmus gelöst werden, indem die Geschwindigkeiten und Positionen zum gleichen Zeitpunkt mit derselben Exaktheit wie beim *Leapfrog*-Integrator ermittelt werden[21]. Jedoch wird auf diesen nicht weiter eingegangen, da der *Leapfrog*-Integrator in den meisten Fällen genau genug ist[22].

2.1.2 Das Kraftfeld und dessen Komponenten

Das Kraftfeld setzt sich aus verschiedenen Potentialbeiträgen zusammen, welche sich den klassischen Ansätzen, wie zum Beispiel des harmonischen Potentials, bedient. Allgemein wurden die klassischen Kraftfelder über quantenchemische und spektroskopische Daten parametrisiert. Bei den Interaktionen wird zwischen nichtbindende und bindende unterschieden, die in diesem Abschnitt nacheinander vorgestellt werden.

Bindungspotentiale. Die intramolekularen Wechselwirkungen umfassen bis zu vier benachbarte, nacheinander folgende Atome, weswegen diese in 1,2-(Bindungslänge), 1,3-(Bindungswinkel) und 1,4-Interaktionen (Diederwinkeln und uneigentlichen Torsionswinkel (engl.: *improper*)) unterteilt sind.

Die Potentiale der Bindungslängen und -winkel (Gl. 12 und 13) basieren auf dem harmonischen Potential, welches generell durch das Hookesche Gesetz beschrieben wird. Die Bindungsausdehnung wird durch den Gleichgewichtsabstand $r_{0,ij}$ zwischen zwei Atomen und die Kraftkonstante k_r definiert, während die Energie $U(\theta)_{Winkel}$ über den Bindungswinkel zwischen drei Partikeln in Abhängigkeit der Hybridisierung des Zentralatoms mit den Gleichgewichtswinkel $\theta_{0,ijk}$ und der Kraftkonstante $\theta_{0,ijk}$ dargestellt wird.

$$U(r)_{Bindung} = \frac{k_r}{2}\left(r_{ij} - r_{0,ij}\right)^2 \tag{12}$$

$$U(\theta)_{Winkel} = \frac{k_\theta}{2}\left(\theta_{ijk} - \theta_{0,ijk}\right)^2 \tag{13}$$

Dabei werden die Atome, die um die Gleichgewichtslage schwingen, als Massepunkte durch eine Feder verbunden. Es ist zu beachten, dass sich die Atome nicht zu sehr vom Gleichgewichtsabstand $r_{0,ij}$ entfernen, da ansonsten die Energie des harmonischen Systems ins Unendliche steigen würde. In der Realität würden die Atome ab einem gewissen Abstand dissoziieren. Für diese Beschreibung eignet sich das Morse-Potential, welches die Dissoziation von Atomen berücksichtigt. Jedoch reicht das harmonische Modell für die meisten Simulation in der MD aus, da sich die Moleküle im Grundzustand befinden und die Bindungslänge nahe des Gleichgewichtsabstands bleibt.

Die Potentiale für die Bindungsrotation (Gl. 14) und uneigentliche Torsion (Gl. 15) sind abhängig von einer Interaktionskontante und einem Gleichgewichtswinkel ($\Phi_{0,ijlk}$ und $\psi_{0,ijkl}$). Die Winkel Φ und ψ lassen sich durch das Aufspannen von zwei Ebenen, welche durch die Atome i,j,k und l definiert werden, beschreiben.

$$U(\Phi)_{Torsion} = \frac{V_n}{2}\left(1 + \cos\left(n\Phi_{ijkl} - \Phi_{0,ijlk}\right)\right) \tag{14}$$

$$U(\psi)_{Improper} = \frac{k_\psi}{2}\,(\psi_{ijkl} - \psi_{0,ijkl})^2 \qquad (15)$$

Dabei ist in Gleichung 14 n die Periodizität der Rotationsbewegung und V_n deren Energiebarriere. Der Ursprung der eigentlichen Torsion liegt in der Entlastung der sterischen Hinderung zwischen den Atomen, in der Resonanzstabilisierung und in der Elektronabstoßung, wodurch die Rotation um die Bindung eingeschränkt wird. Die uneigentliche Rotation sorgt für die Beibehaltung der Chiralität bestimmter Gruppen, wie für die C_α-Atom der Proteine sowie für die Planarität des C-Terminus, der aromatischen Ringe und der Carboxyl-Aminosäuren oder des Arginins. In Abbildung 4 sind die verschiedenen Bindungspotentiale gezeigt.

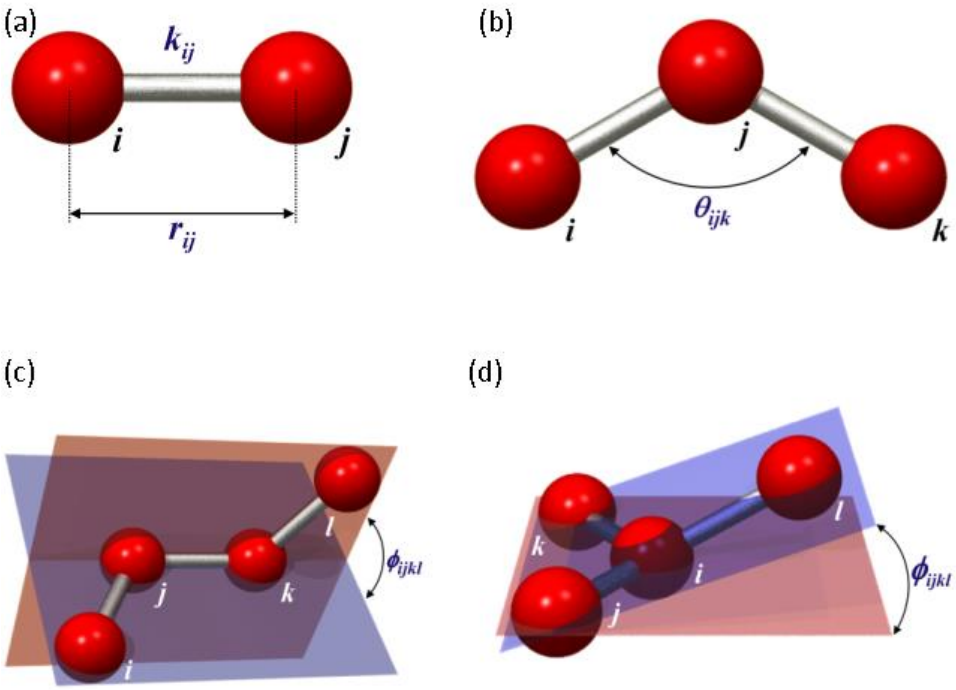


Abbildung 4: Schematische Übersicht der kovalenten Bindungsbeiträge im Kraftfeld. (a) zeigt die Bindungslänge zwischen zwei Atomen und (b) den Bindungswinkel von drei Teilchen. Die Darstellung des Torsionswinkels (c) und des uneigentlichen Winkels (d) über zwei Ebenen zwischen vier Atomen. Diese Abbildungen wurden aus Referenz[23] entnommen.

Nicht-kovalente Potentiale. Hierbei spielen die Van-der-Waals (VdW)- und elektrischen Wechselwirkungen eine wichtige Rolle. Über das Lennard-Jones-Potential werden die VdW-Interaktionen zwischen zwei Atomen i und j beschrieben, was mathematisch in Gleichung 16 dargestellt ist.

$$U_{LJ}^{ij} = U_m^{ij}\left[\left(\frac{r_{ij}^{VdW}}{r_{ij}}\right)^{12} - 2\left(\frac{r_{ij}^{VdW}}{r_{ij}}\right)^{6}\right] \qquad (16)$$

Die Energie setzt sich aus attraktiven und repulsiven Kräften in Abhängigkeit des Abstands beider Teilchen i und j zusammen. Wenn sich zwei Atome voneinander entfernen, strebt das Potential U_{LJ}^{ij} gegen 0. Dagegen erfahren die Atome ein Energieminimum U_m^{ij} bei gegenseitiger Annäherung bis zum Gleichgewichtsabstand r_{ij}^{VdW}. Dieser setzt sich zur Vereinfachung aus der Summe der beiden VdW-Radien r_i^{VdW} und r_j^{VdW} zusammen. Der attraktive Teil des Lennard-Jones-Potentials skaliert mit r^{-6} und wird durch London-Wechselwirkungen verursacht. Dieser Term stammt aus quantenchemischen Berechnungen der Elektronenkorrelation. Falls dieser Abstand r_{ij}^{VdW} unterschritten wird, steigt die Energie ins Unendliche, da die abstoßenden Interaktionen einsetzen, die durch den empirischen r^{-12}-Term beschrieben werden. Dieser ist vom Pauli-Verbot bedingt und zudem treten internukleare Abstoßungen auf.

Die Ladungsinteraktionen werden durch das Coulombsche Gesetz (Gl. 17) definiert, welches das elektrostatische Potential zwischen zwei Atomen mit Punktladungen q_i und q_j in einem bestimmten Abstand r_{ij} darstellt.

$$U_c(r_{ij}) = K_c\frac{q_i\, q_j}{\varepsilon_r r_{ij}} \quad mit \quad K_c = \frac{1}{4\pi\varepsilon_0} \qquad (17)$$

Dabei ist K_c eine Konstante, die sich aus der elektrischen Feldkonstante von $8{,}854 \cdot 10^{-12}$ As/Vm und 4π zusammensetzt. Zudem hat das Medium, in dem sich die Partikel befinden, einen gewissen Einfluss auf die elektrischen Wechselwirkungen. Die Durchlässigkeit des Mediums für die Coulomb-Interaktionen wird über Dielektrizitätskonstante ε_r beschrieben, welche im Fall von Wasser 80 beträgt. Meistens werden

die Partialladungen über quantenchemische Methoden berechnet, vor allem bei Molekülen, die nicht im Kraftfeld parametrisiert sind.

Es gibt viele verschiedene Kraftfelder, welche je nach Zielstellung Vor- und Nachteile besitzen[24]. In dieser Arbeit wird das Kraftfeld *amber99sb-nmr1-ildn* für die Aβ-Peptide benutzt, da es sich für Proteininteraktionen im expliziten Solvens am besten eignet[25][26].

2.1.3 Parametrisierung von EGCG

Im verwendeten Kraftfeld *amber99sb-nmr1-ildn* werden nur Aminosäuren, Nukleinsäuren, biologisch relevante Ionen und ein kleiner Teil anderer Moleküle parametrisiert. Dies betrifft nicht EGCG, wodurch die Parameter durch externe Programme ermittelt werden müssen. Hierbei wird die Struktur von EGCG aus PDB-Struktur 2KDH[27] entnommen, in der das EGCG als Proteinligand auftaucht. Für die Parametrisierung von EGCG wird das Programm *ACPYPE* (engl.: ***A**nte**C**hamber **PY**thon **P**arser interfac**E***)[28] verwendet, welches auf dem *Antechamber*-Programm aus dem *Ambertool*-Paket[29] basiert. *ACPYPE* kann die Topologien und Parameter für kleine Moleküle für *GROMACS* und andere Molekulardynamikprogramme generieren. Dafür wird meistens das Kraftfeld *general-amber-forcefield* (GAFF)[30] verwendet, das speziell für organische Substanzen geeignet ist. Hierbei werden die VdW-Parameter von den *amber99*-Kraftfeldern direkt übernommen. Zudem werden die Parameter für die Bindungsinteraktionen durch *ab intio*-Berechnungen bestimmt, während Gleichgewichtsbindungslängen sowie -winkel aus experimentellen Studien entnommen werden. Beim Generieren der Topologien mit GAFF ist die Bestimmung der partiellen Ladungen kritisch und äußert wichtig für die intermolekularen Wechselwirkungen. Im idealen Fall sollte dies durch komplizierte quantenchemische Kalkulationen erfolgen, kann jedoch auch über empirische Rechnung mit Partialladungsermittlung erfolgen

Für EGCG werden zunächst die partiellen Ladungen von EGCG über das AM1-BCC-Modell (engl.: *Austin Model 1-bond charge corrections*)[31][32] berechnet, welches die

Standardmethode von *ACPYPE* ist. Das Ziel dieses Verfahrens ist die Produktion von Atomladungen, die das elektrostatische Potential (engl.: *electrostatic potential*, ESP) eines Moleküls mit dem HF/6-31G*-Basissatz nachahmt. Danach werden die BC-Korrekturen (engl.: *bond charge corrections*) zu den AM1-Atomladungen hinzugefügt, sodass der AM1-BCC-Ladungsatz für das EGCG erhalten wird.

Alternativ wird die Methode RESP (engl.: *Restrained Electrostatic Potential*)[33][34] für die partielle Ladungsbestimmung von EGCG angewendet. Durch eine *restrained*-Funktion werden die quantenchemisch berechneten ESP-Ladungen auf der Molekül-oberfläche angepasst, da ansonsten die Coulomb-Interaktionen überschätzt werden. Dabei wurde erst eine B3LYP/HF-6-31G*-Optimierung und anschließend HF-6-31G*-Berechnungen für die Orbitale durchgeführt, aus denen dann über das Programm *Antechamber* die RESP-Ladungen bestimmt werden konnten. Die beiden Ladungssätze werden miteinander verglichen und es wird entschieden, welches von beiden besser für die Simulationen geeignet ist.

2.1.4 Explizites Solvens als Wassermodell

Um so nah wie möglich an der Realität zu bleiben, wird ein explizites Wassermodell verwendet, bei dem die Wassermoleküle atomistisch dargestellt werden. Die intermolekularen Wechselwirkungen zwischen den Wassermolekülen sind aufgrund der komplizierten Netzwerkbildung hochkomplex, besonders in der Flüssigkeitsphase. Es gibt eine große Variation von Modellen, wobei alle Vor- und Nachteile besitzen und keines davon perfekt ist, trotz realistischen Annäherungen der Eigenschaften von Wasser wie Dichte oder Dipolmoment.

Auf der Webseite http://www1.lsbu.ac.uk/water/models.html gibt es eine detaillierte Beschreibung verschiedenster Wassermodelle, welche anhand der Geometrie von Wasser in vier Kategorien eingeteilt werden. Bei den drei planaren Modellen (TIP3P, SPC/E oder TIP4P) werden die Partialladungen entweder direkt auf den Atomen platziert, wie zum Beispiel bei SPC/E, oder es wird ein zusätzliches virtuelles Teilchen ein-

geführt, das eine partielle Ladung trägt (TIP4P-Modell). Des Weiteren gibt es noch tetraedische Modelle wie das TIP5P-Modell, in dem das freie Elektronenpaar des Sauerstoffs miteinbezogen wird. Es ist allerdings nicht unbedingt gegeben, dass dieses komplexere Modell bessere Resultate in MD-Simulationen erzielt. In dieser Arbeit wird das SPC/E-Wassermodell verwendet.

2.2 Methoden zur Auswertung

Hauptsächlich werden die Analyseverfahren von *GROMACS* verwendet, welche auf dessen Website (http://manual.gromacs.org/current/programs/bytopic.html) aufgelistet sind. In den nachfolgenden Abschnitten werden die einzelnen Programme zur Auswertung dieser Arbeit vorgestellt.

2.2.1 *Total Solvent Accessible Surface Area*

Hierbei handelt es sich um die totale Oberfläche eines Biomoleküls, welche dem Solvens zugänglich ist (engl.: *Solvent Accessible Surface Area*, SASA). Damit kann die Aggregation von EGCG mit sich selbst oder die Wechselwirkung von EGCG mit dem Aβ-Peptid beschrieben und quantifizieren werden.

In der Theorie wird diese Fläche über das Zentrum eines sphärischen Körpers mit dem VdW-Radius des entsprechenden Lösungsmittels definiert, welcher über die VdW-Oberfläche eines bestimmten Moleküls rollt. Es zeigt direkt die Fläche an, die den Solvent-Atomen zugänglich ist[35] und in Abbildung 5 in blau dargestellt ist. Außerdem wird zwischen hydrophilen und hydrophoben Atomen des Moleküls unterschieden, wodurch es verschiedenen Arten von SASA gibt: hydrophobe, hydrophile und totale. In dieser Arbeit ist nur totale SASA interessant, da es um die Aggregation im Allgemeinen geht. Für die Berechnung von SASA wird das Analysetool *g_sas* verwendet, das auf dem DCLM-Algorithmus (engl.: *double cubic lattice method*) basiert[36].

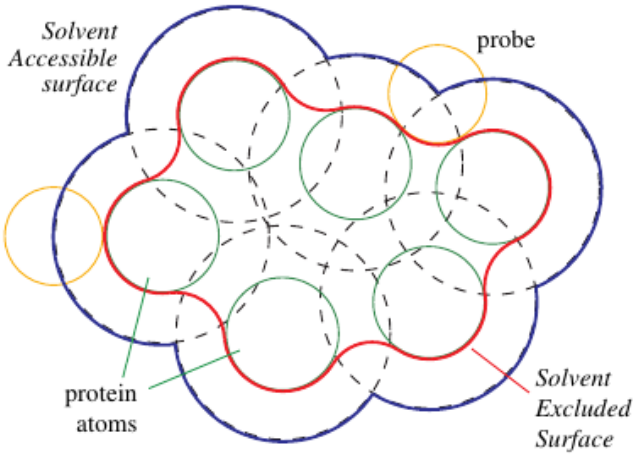


Abbildung 5: Definition von SASA und andere Oberflächen. In grün sind die Atome des Moleküls und als gestrichelte Linie die zugehörigen VdW-Radien dargestellt. Die gelbe Kugel beschreibt das Solvens-Molekül und die blau markierte Fläche ist SASA. In rot ist die Fläche gekennzeichnet, in die das Lösungsmittel nicht eindringen kann (engl.: *Solvent Excluded Surface*). Das Bild wurde aus Quelle[35] entnommen.

2.2.2 Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen

Um die Wechselwirkungen zwischen EGCG und dem Aβ-Peptid einordnen zu können, kann die Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen über das *GROMACS*-Tool *g_hbond* berechnet werden. Dabei werden die Gruppen NH und OH als Donatoren und die Atome N und das O als Akzeptoren definiert. Diese müssen einen bestimmten Abstand und Winkel zueinander besitzen, um als Wasserstoffbrückenbindung zu gelten. In der Standardeinstellung sind der Cutoff-Abstand der N-O-Bindung auf 3,5 Å und -Winkel (Wasserstoff-Donor-Akzeptor) auf 30° festgelegt, wobei dies vom Benutzer noch individuell eingestellt werden kann[37]. Es werden die Standardwerte verwendet.

2.2.3 Abstand und Abstandsmatrizen

In *GROMACS* wird der minimale Abstand zwischen zwei Atomgruppen über *g_mindist* berechnet. Damit lässt sich zum einen die Aggregation der Moleküle und zum anderen die Interaktion zwischen den Molekülen im System quantitativ beschreiben. In diesem Zusammenhang können sogenannte Abstandsmatrizen (engl.: *Distance-Maps*) erstellt werden, um die Wechselwirkung zwischen den EGCG Molekülen bzw. EGCG und den Aβ-Peptiden atomar und gruppenspezifisch zu untersuchen. Hierbei wird der Abstand zwischen den bestimmten Gruppen berechnet und anschließend der zeitliche Durchschnitt für jede Struktur aus der Trajektorie ermittelt. Die Abstandsmatrix wird über das Programm *Gnuplot* mit bestimmten Einstellungen der Gestaltung des Diagramms graphisch dargestellt.

2.2.4 DSSP-Algorithmus für Sekundärstrukturen

Mithilfe des DSSP-Algorithmus[38] (engl.: *Define Secondary Structure of Proteins*) werden basierend auf Wasserstoffbrückenbindungen des Peptidrückgrats Sekundärstrukturen von Proteinen ermittelt. Hierbei werden nicht die Diederwinkel oder die C_α-Positionen verwendet, da es aufgrund der Anpassung vieler Parameter für jede Sekundärstruktur zu aufwendig wäre. Dagegen muss bei einer H-Brücke nur über An- oder Abwesenheit zwischen den Bindungen C=O und N-H im Peptidrückgrat entschieden werden. Es beruht auf einem elektrostatischen Modell, bei dem die Bindungsenergie E zwischen den vier Atomen berechnet und ein Cut-off von E < - 0,5 kcal/mol festgelegt wird. Hier spielen die partiellen Ladungen und der Abstand der beiden Gruppen eine große Rolle und besitzen folgenden Zusammenhang als grobe Annäherung für die Bindungsenergie einer physikalischen Wasserstoffbrückenbindung:

$$E\left[\frac{kcal}{mol}\right] = q_1 q_2 \left(\frac{1}{r\,(ON)} + \frac{1}{r\,(CH)} - \frac{1}{r\,(OH)} - \frac{1}{r\,(NC)}\right) \cdot f \qquad (18)$$

Dabei betragen die Partialladungen q_1 = ± 0,42 e für C=O, q_2 = ± 0,2 e für N-H. Die Einheit e steht für die Elementarladung von 1,602 · 10^{-19} C. Der Parameter r beschreibt

den Abstand in Å zwischen zwei Atomen der jeweiligen Gruppe und f ist ein Dimensionsfaktor mit dem Wert von 332 kcal/mol. Zusätzlich gibt es noch den Ausrichtungswinkel θ (engl.: *alignment angle*) der Wasserstoffbrückenbindung, welcher durch die Distanz bestimmt wird und ausschlaggebend für die Interaktionsenergie ist. Laut dem Algorithmus besitzt die ideale Wasserstoffbrückenbindung die Werte E = -3 kcal/mol, r = 2,9 Å und θ = 0° der N-O-Bindung. In der Realität befindet sich ein Protein selten im idealen Zustand, weswegen Abweichungen von den Parametern für Wasserstoffbrückenbindungen definiert wurden. Diese liegen bei E < -0,5 kcal/mol, r = 5,1 Å und θ = 60°.

Im Folgenden werden die acht Sekundärstrukturen vorgestellt, welche durch den DSSP- Algorithmus definiert werden. Der Buchstabe in den Klammern ist eine Abkürzung für die jeweilige[39].

- *Turn* (T) beschreibt die Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb von höchstens sechs benachbarten Aminosäuren im Peptidrückgrat, worauf die verschiedenen Helices basieren, je nachdem, ob es sich um einen 3-, 4- oder 5-*Turn* handelt.
- 3-Helix (G) ist die 3_{10}-Helix, welche mindestens drei Aminosäuren und zwei 3-*Turns* beinhaltet.
- α -Helix (H) beinhaltet mindestens vier Aminosäuren, die sich aus 4-*Turns* bilden.
- 5-Helix (I) mit 5-*Turns* ist die π-Helix, welche aus mindestens fünf Aminosäuren besteht.
- β-*Bridge* (B) ist eine einzelne Wasserstoffbrückenbindung zwischen zwei nicht benachbarten Aminosäuren in der β-Faltblatt-Konformation.
- β-Faltblatt (engl.: β-*sheet*) beschreibt die anti- oder parallelen β-Faltblätter im Protein, welche aus mindestens zwei Aminosäuren pro β-Strang bestehen müssen.
- *Bend* (S) ist die Ketten-Krümmung im Peptid, welche keine H-Brücken besitzt. Diese wird durch einen Winkel an einer zentralen Stelle von fünf Aminosäuren von mindestens 70° zwischen der Peptidrückgrat-Richtung von den ersten und letzten drei Aminosäuren bestimmt.

- *Coil* (C) bezeichnet die Regionen des Peptids, die keine der oben genannten Strukturen enthalten.

2.2.5 Transitionsnetzwerke

Um eine statistische Auswertung der Trajektorien zu erhalten, werden sogenannte Transitionsnetzwerke (TN) erstellt, bei denen die Übergänge einzelner Zustände berechnet und über das Java-Programm *visone*[40] dargestellt werden.

Hierbei wird die Aggregation von EGCG alleine und mit den Aβ(16-23)-Fragmenten über den Oligomerzustand ohne Berücksichtigung der Wassermoleküle untersucht. Diesbezüglich wird eine Transitionsmatrix für jedes Oligomer und eine Eigenschaftstabelle erstellt, welche aus Zustandsnummer ID, Oligomergröße und Population des Zustands besteht. Für die Definition des Zustands wird ein Cutoff-Wert in Å festgelegt, ab welchem Abstand ein Übergang zwischen den Oligomeren als erfolgt gilt. Die ID (engl.: *identity*) ordnet die Eigenschaften zum richtigen Wert der Übergangsmatrix zu. Wenn es sich um ein homogenes System handelt, entspricht der Zustand der Oligomergröße. Beim heterogenen Aβ-EGCG-System beschreibt der Zustand, aus welchen Spezies das jeweilige Oligomer besteht. Die Population gibt darüber Auskunft, wie oft diese Zustände in der Trajektorie vorkommen. Mithilfe des Programms *visone* können die TN visuell in Form von Knoten (engl.: *node*) für den Oligomerzustand und Pfeilen (engl.: *edge*) für die Anzahl der Übergänge zwischen den Oligomeren dargestellt werden[41].

3. Vorbereitung und Parameter der MD-Simulationen

Bevor eine Simulation gestartet wird, muss diese zuerst vorbereitet werden. Dazu gehören der Aufbau des Systems, die Energieminimierung, die Äquilibrierung und letztendlich die Parameter für den Start. Nachfolgend werden die einzelnen Systeme beschrieben.

3.1 EGCG

Um die Aggregation von insgesamt acht EGCG-Molekülen beobachten zu können, wird die Boxlänge so eingestellt, dass das System eine Konzentration von 10 oder 100 mM EGCG aufweist (Tab. 1).

Tabelle 1: Simulationsdaten der Systeme 10 und 100 mM EGCG.

	10 mM EGCG	**100 mM EGCG**
Kraftfeld	amber99sb	amber99sb
Wasser-Modell	SPC/E	SPC/E
Simulationslänge (RESP/AM1-BCC) [ns]	jeweils 50	60/100 (abgebrochen)
Anzahl der Moleküle	8	8
Boxlänge [nm]	5,5	2,5
Temperatur und Druck	300 K und 1 atm	300 K und 1 atm
Thermostat	Nosé-Hoover	Nosé-Hoover
Barostat	Parrinello-Rahman	Parrinello-Rahman
Anzahl der Atome	130.000	13.000
Äquilibrierung [ps]	500	500

In einem Rattengehirn wurde eine EGCG-Konzentration von 0,5 nmol/g nach einem EGCG-Konsum von 500 mg/kg nachgewiesen[4]. Dies entspricht umgerechnet einer

molaren Konzentration von 230 nmol/ml bei einer Dichte von 1 g/ml. Diese Konzentration ergäbe ein System mit einer zu großen Atomanzahl, als das man es von Rechenaufwand her simulieren könnte. Dazu reichen die Kapazitäten derzeitigen Computerclusters nicht aus. Des Weiteren würde keine Wechselwirkung zwischen den EGCG-Molekülen innerhalb von Nanosekunden beobachten werden können, da einzelnen Moleküle einen zu großen anfänglichen Abstand voneinander hätten und in der simulierten Zeitspanne nicht zusammentreffen würden. Von daher müssen Simulationen mit EGCG-Konzentrationen im mM-Beriech durchgeführt werden.

Es wird jeweils eine Simulation für beide Ladungssätze, die aus der Parametrisierung der partiellen Ladungen resultieren, ausgeführt. Dies gibt die Möglichkeit für die Entscheidung, welches Verfahren die elektrostatischen Kräfte besser repräsentiert und für die Analyse und die Simulationen mit Aβ nachfolgend verwendet wird. Dabei werden zusätzlich die Partialladungen miteinander und mit dem Kraftfeld verglichen und Transitionsnetzwerke erstellt, um weitere Unterschiede festzustellen.

3.2 EGCG mit ausgewählten Aβ-Fragmenten

Die Aβ-Fragmente 11-15, 16-23 und 31-33 sollen nach experimentellen Daten[8] an der Aggregation von Aβ und an einer Interaktion mit EGCG beteiligt sein, weswegen diese für die Simulationen ausgewählt wurden. Hierbei werden zwei Systemgrößen verwendet (Tab. 2). Beim 1:1-Verhältnis wird die Interaktion zwischen einem EGCG-Molekül und einem Aβ-Fragment betrachtet, während bei der 4:4-Simulation die Aggregation von Aβ im Vordergrund steht, indem sich im System vier EGCG-Moleküle und vier gleichartige Aβ-Peptide befinden. Dort wird die Frage geklärt, inwiefern EGCG die Assemblierung der Peptide beeinflusst bzw. verhindert. Zum Schluss werden beide Systeme miteinander verglichen.

Zudem wird eine Simulation mit vier Aβ(16-23)-Fragmenten ohne EGCG durchgeführt, um zu beobachten, ob und wie dieses Peptid unter ansonsten gleichen Bedingungen aggregiert. Die Zusammenlagerung von Aβ(16-22)-Fragmenten findet innerhalb von

100 ns unter der Benutzung des Kraftfelds *GROMOS96 43a1* statt[41]. Es stellt sich Frage, ob das Peptid mit zusätzlichem Asp23 am C-Terminus ebenfalls aggregiert, da sich dieses und Glu22 aufgrund der weiteren negativen Ladung eventuell zu sehr abstoßen könnten. Um eine statistische Analyse in Form von Transitionsnetzwerken durchführen zu können, werden insgesamt drei 500 ns-Simulationen mit vier Aβ(16-23)-Fragmenten alleine und fünf mit Aβ(16-23) plus EGCG im 4:4-Verhältnis produziert.

Tabelle 2: Daten der Simulationen mit den Aβ-Fragmenten und EGCG.

	1:1 Ratio	**4:4 Ratio**
Kraftfeld	amber99sb-nmr1-ildn	amber99sb-nmr1-ildn
Wasser-Modell	SPC/E	SPC/E
Simulationslänge [ns]	50	100
Anzahl der Moleküle	1 EGCG-Molekül 1 Aβ-Peptid	4 EGCG-Moleküle 4 Aβ-Peptide
Temperatur und Druck	300 K und 1 atm	300 K und 1 atm
Thermostat	Nosé-Hoover	Nosé-Hoover
Barostat	Parrinello-Rahman	Parrinello-Rahman
Äquilibrierung [ps]	500	500

3.3 EGCG mit dem Aβ(1-42)-Peptid

Im Vergleich zu den Fragmenten wird eine Simulation mit dem vollständigen Aβ(1-42)-Peptid durchgeführt. Für den Start wird die PDB-Struktur 2LFM[42] verwendet, welche ein stark gelöstes Aβ(1-40) mit wenigen α-Helices darstellt. Mithilfe von PyMOL wurden die zwei Aminosäuren Ile41 und Ala42 hinzugefügt. Anschließend wird dieses Protein in das System aus acht EGCG-Molekülen mit einer Konzentration von 10 mM zugegeben. In Tabelle 3 sind die Parameter der Simulation zusammengefasst.

Tabelle 3: Simulationsdaten für das System 10mM EGCG und ein Aβ(1-42)-Peptid.

Kraftfeld	amber99sb-nmr1-ildn
Wasser-Modell	SPE/C
Simulationslänge [ns]	200
Anzahl der EGCG-Moleküle	8
Temperatur und Druck	300 K und 1 atm
Thermostat	Nosé-Hoover
Barostat	Parrinello-Rahman
Äquilibrierung [ps]	500

3.4 Energieminimierung und Äquilibrierung

Nachdem die Systeme präpariert, solvatisiert und gegebenenfalls neutralisiert wurden, erfolgt eine Energieminimierung und Äquilibrierung, welche bei allen Simulationen mit dem gleichen Skript durchgeführt wurden (Anhang 6.1). Vor allem bei Systemen mit Aβ und EGCG im 4:4-Verhältnis musste vor der der Solvatisierung eine Energie-Optimierung im Vakuum stattfinden, damit bei der Minimierung mit Solvens der eingestellte Wert für die Kraft von 100 kJ mol^{-1} nm^{-1} erreicht bzw. unterschritten wird.

Bei der Energieminimierung bzw. -optimierung wird die maximal wirkende Kraft auf einen festgelegten Wert reduziert, damit die anschließende MD-Simulation stabil läuft. Für die Minimierung wird der Algorithmus *steepest descent* (SD) verwendet, welcher einfach zu implementieren ist und garantiert, eine energetisch günstigere Struktur liefert [43]. Bei der Äquilibrierung wird eine kurze MD-Simulation mit bestimmten Parameter durchgeführt, die denen der folgenden Produktionssimulation ähneln bzw. identisch sind, wie zum Beispiel die Temperatur von 300 K und der Druck von 1 bar. Außerdem werden sogenannte Zwangsbedienungen (engl.: *position-restraints*) definiert, wodurch die Atome der Peptide und von EGCG in ihrer Bewegung beeinträchtigt werden, während das Solvent freibeweglich ist. Das führt dazu, dass die Wassermoleküle um die Proteine und EGCG herum äquilibrieren[44]. Anschließend kann die eigentliche MD-Simulation gestartet werden.

4. Analyse und Diskussion

In diesem Abschnitt werden die Simulationen analysiert und anschließend in der Diskussion miteinander verglichen. Die graphischen Darstellungen der Moleküle wurden mit VMD[45] erstellt.

4.1 EGCG-Partialladung

Zunächst wird die Auswahl der Methode für die Berechnung der Partialladungen von EGCG erläutert. Bevor die Simulationen mit dem Aβ erfolgten, musste entschieden werden, welche Partialladungen verwendet werden. Zwischen den Simulationen mit den verschiedenen Ladungsmodellen (Kapitel 2.1.3) besteht kein großer Unterschied, außer dass bei der 10 mM-EGCG-Simulation mit AM1-BCC-Ladungen EGCG weniger aggregiert als mit RESP-Ladungen. Deswegen werden die AM1-BCC- und RESP-Ladungen quantitativ miteinander verglichen. In Abbildung 6 sind die partiellen Ladungen beider Methoden in einem Balkendiagramm dargestellt, wobei die orangen Balken die RESP- und die gelben die AM1-BCC-Ladungen für alle EGCG-Atome beschreiben.

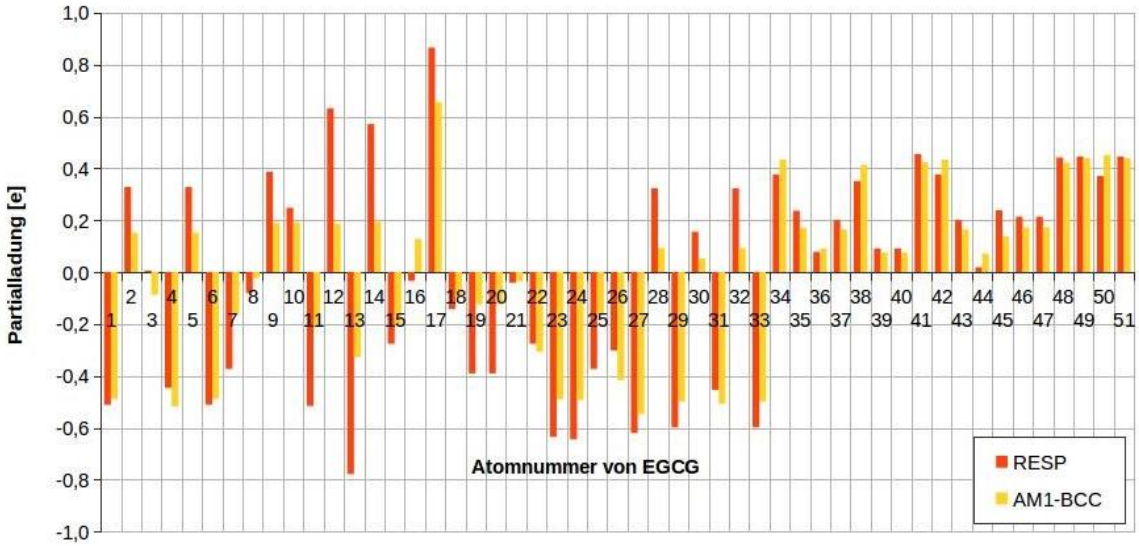


Abbildung 6: Partialladungen der EGCG-Atome, die aus der Bestimmung mittels RESP und AM1-BCC resultieren.

Anhand des Diagramms ist erkennbar, dass das RESP-Verfahren vom Betrag her höhere partielle Ladungen vorhersagt als AM1-BCC. Die elektrostatischen Wechselwirkungen werden hauptsächlich über die polaren Hydroxyl-Gruppen von EGCG bestimmt, weswegen diese in Abbildung 7 näher betrachtet werden. Es ist offentsichtlich, dass sich die partiellen Ladungen deutlich unterscheiden. Die Differenz von circa 0,15 e ist am Doppelring am größten.

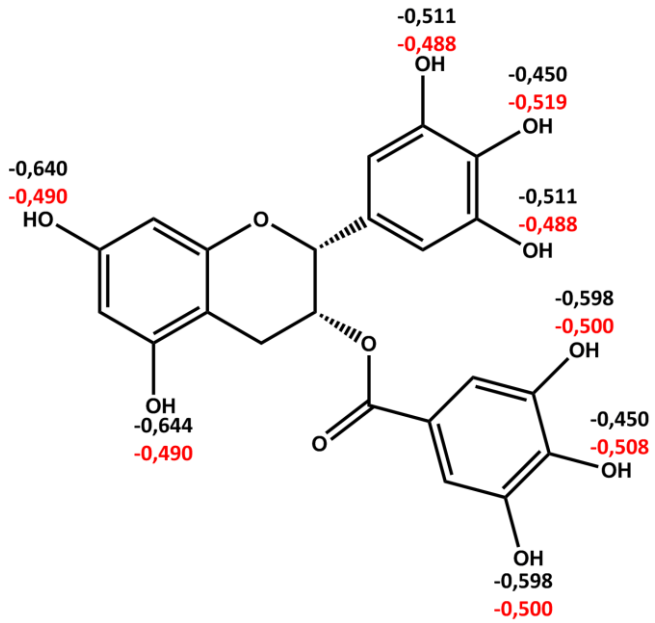


Abbildung 7: Unterschiede in der Partialladungen der Hydroxylgruppen zwischen den beiden ESP-Methoden. Die in rot dargestellten Zahlen sind die AM1-BCC-Ladungen, während die schwarzen Zahlen die RESP-Ladungen sind. Die Einheit der Ladung ist e.

Um einen besseren Vergleich zu erhalten, wird zusätzlich das Kraftfeld *amber99sb-nmr1-ildn* hinzugezogen. Dafür wird die Partialladung des Sauerstoffatoms der Hydroxylgruppen von EGCG der des Tyrosins aus dem Kraftfeld gegenübergestellt. Außerdem werden die partiellen Ladungen von Tyrosin mit den beiden Verfahren zur Bestimmung der Partialladung berechnet, wobei nur die OH-Gruppe in Betracht gezogen wird. Die Werte für Tyrosin sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Letztendlich werden für die Simulationen mit EGCG die RESP-Ladungen benutzt, da sie für die OH-Gruppen näher am Kraftfeld liegen und deshalb konsistent sind. Zudem ist

RESP ein *ab intio*-Verfahren, wodurch es auf einer physikalischeren Grundlage basiert als AM1-BCC als empirische Methode.

Tabelle 4: Partielle Ladungen der Hydroxylgruppe des Tyrosins.

Methode	**Ladung [e]**
amber99sb-nmr1-ildn	-0,5578
AM1-BCC	-0,4960
RESP	-0,5408

4.2 Simulationen von EGCG

Es werden die Simulationen von 10 und 100 mM EGCG mit den RESP-Ladungen betrachtet und miteinander verglichen. Dazu wird zunächst SASA berechnet und in Abbildung 8 dargestellt, um den Verlauf der Trajektorie quantitativ zu beobachten. Um die Vergleichbarkeit zu erhalten, werden nur die ersten 50 ns beider Simulationen in Betracht gezogen.

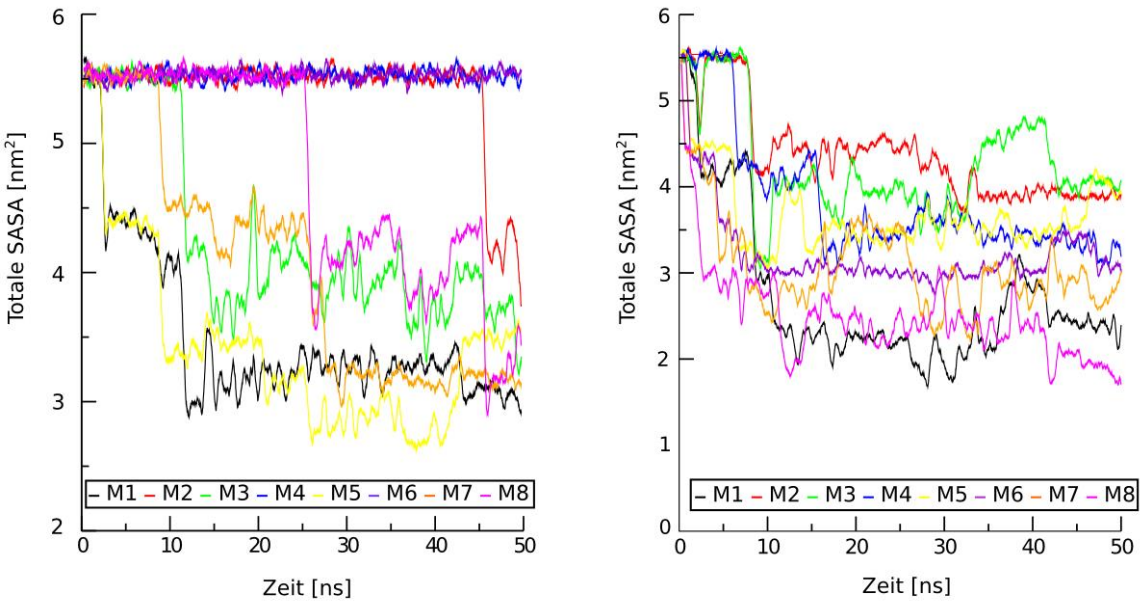


Abbildung 8: SASA der acht EGCG-Moleküle während der Simulation mit den Konzentrationen von 10 mM (links) und 100 mM (rechts) EGCG. Es ist deutlich, dass bei 10 mM nicht alle Moleküle aggregieren im Gegensatz zu 100 mM.

Die Aggregation bei 100 mM erfolgt innerhalb von 10 ns sehr schnell, während sich bei 10 mM nur sechs von acht EGCGs nach 50 ns zusammenlagern, was an der unveränderten Fläche von Molekülen M6 und M8 erkennbar ist. Die Abkürzung M bezeichnet das Molekül und wird in der ganzen Arbeit fortlaufend verwendet. Außerdem bilden sich in der 100 mM-Simulation erst kleine EGCG-Oligomere, die sich zum Schluss zu einem großen Aggregat zusammenlagern. Im Gegensatz dazu erfolgt in der Trajektorie mit 10 mM EGCG keine Gruppenbildung. Stattdessen lagern sich nach und nach Monomere an das wachsende Oligomer an. Um dies genauer zu erkennen, ohne sich die Simulationen direkt anzuschauen, wird der Abstand zwischen den verschiedenen EGCGs berechnet. Da es sich um 28 Graphen handelt, sind die zugehörigen Diagramme im Anhang 6.2 zu sehen.

Anschließend werden die verschiedenen Interaktionen charakterisiert, welche hauptsächlich aus elektrostatischen und π-π-Stapel-Wechselwirkungen bestehen. Die Wasserstoffbrückenbindungen gehören zur elektrostatischen Interaktion. Die Gesamtanzahl der H-Brücken ist in Abbildung 9 für beide Simulationen aufgeführt. Im Durchschnitt ist die Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen bei 100 mM um zwei bis drei größer als bei 10 mM EGCG. Das liegt daran, dass in der Simulation von 100 mM EGCG alle Moleküle vollständig aggregiert sind.

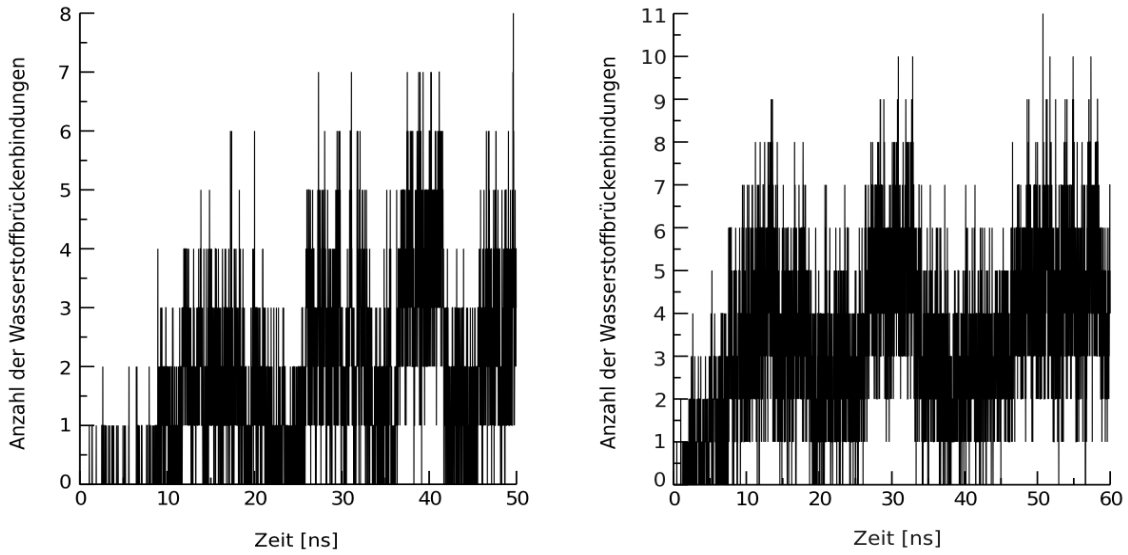


Abbildung 9: Gesamtanzahl der Wasserstoffbrückenbindungen aller acht Moleküle bei 10 mM (links) und 100 mM EGCG (rechts).

Um die atomaren Wechselwirkungen zwischen zwei Molekülen interpretieren zu können, wird eine Abstandsmatrix zwischen den EGCG-Molekülen erstellt (Abb. 10). Dabei werden nur die letzten 30 ns der Simulation mit 100 mM EGCG verwendet, da dort eine vollständige Aggregation erfolgt ist.

(a) (b)

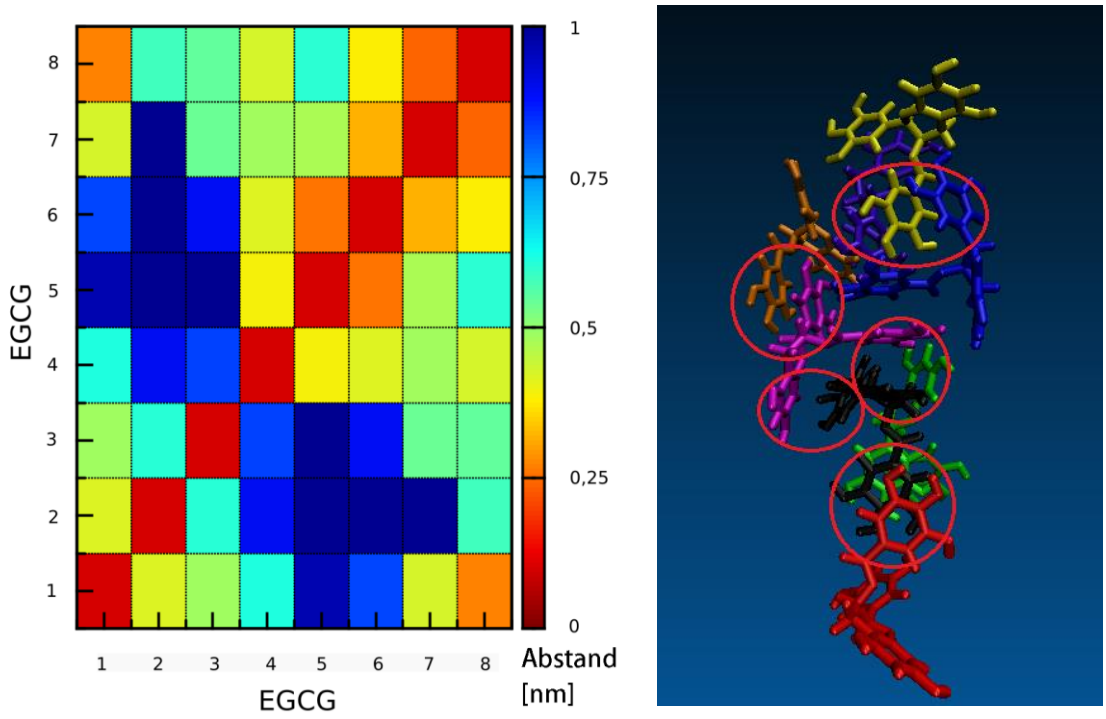
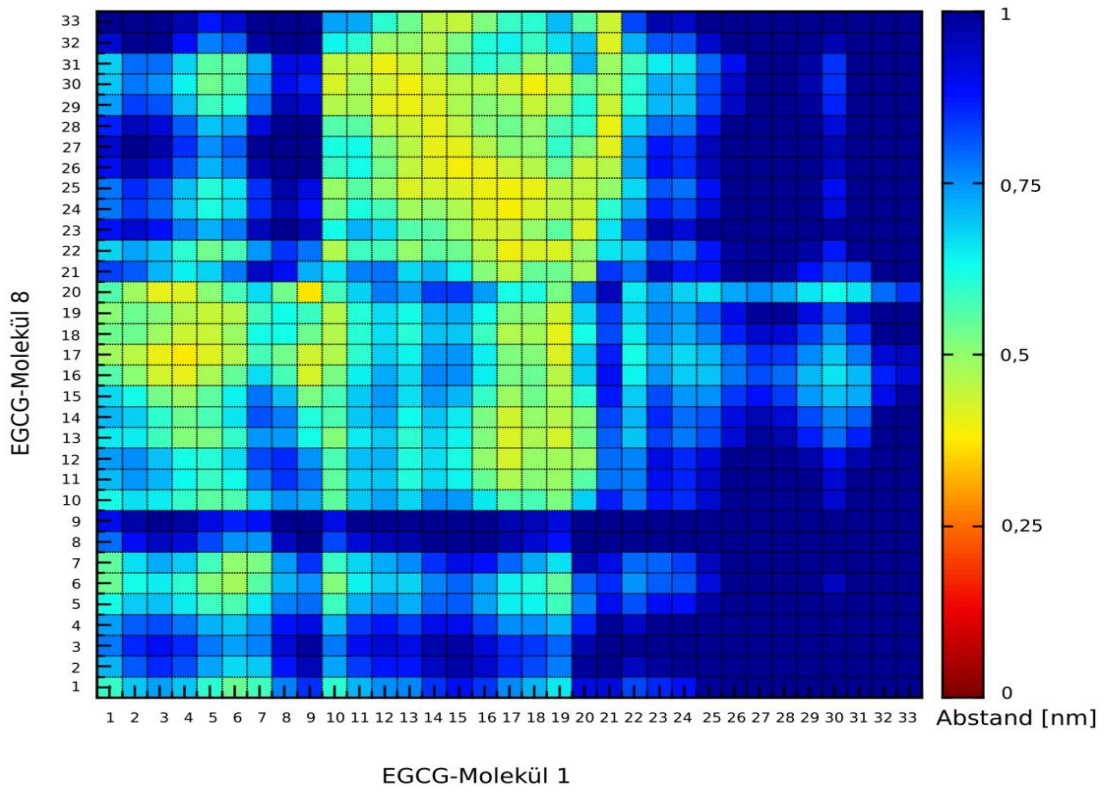


Abbildung 10: (a) Abstandsmatrix der EGCG-Moleküle ab 30 ns bei einer Konzentration von 100 mM. Der zeitlich gemittelte Abstand wird bis zu 10 Å dargestellt. (b) Intermolekulare π-Stapel-Wechselwirkungen sind durch rote Kreise gekennzeichnet und es werden einige nachfolgend analysiert. Die Färbung der Moleküle stimmt mit den Farben des SASA-Diagramms (Abb. 8) überein.

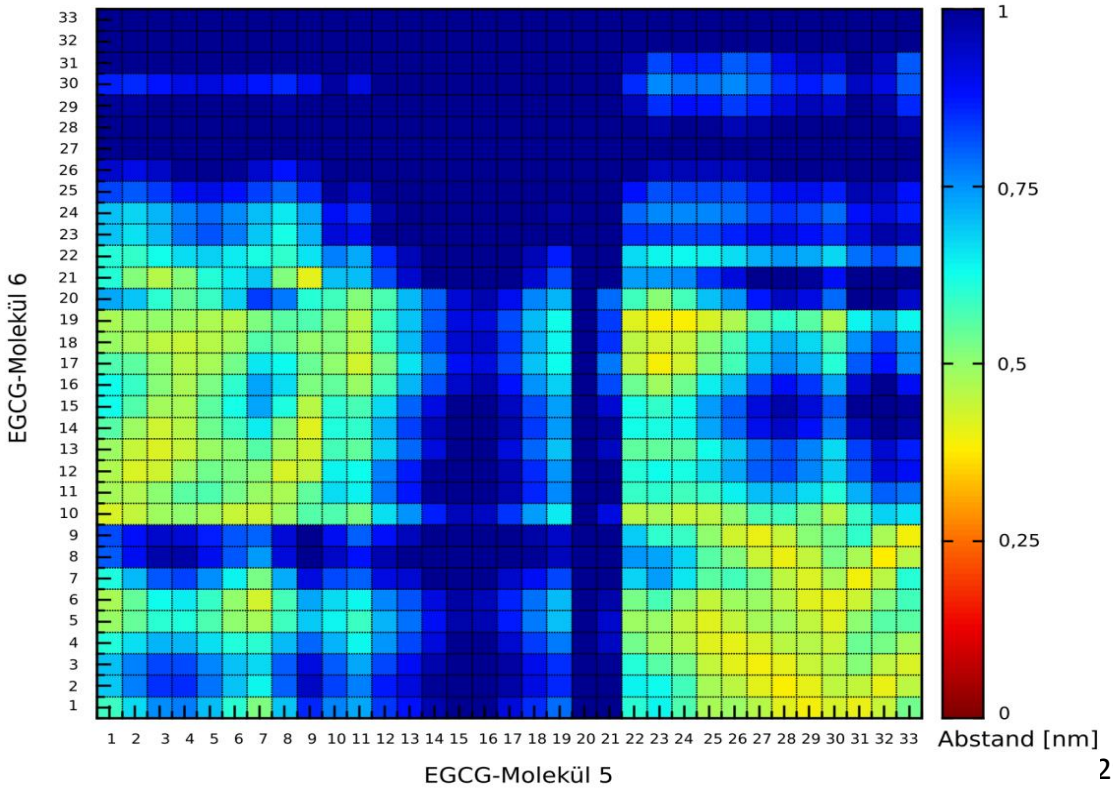
Laut dieser Matrix ist erkennbar, dass M1 und M8, M5 und M6 sowie M7 und M8 am stärksten miteinander interagieren. Für diese Molekülpaare wurde die Abstandsmatrix in atomaren Wechselwirkungen aufgespalten. Diese sind in Abbildung 11 mit zusätzlicher EGCG-Struktur und Atomnummern gezeigt. Dabei wurde jedoch auf die Darstel-

lung der Wasserstoffatome verzichtet, da der Abstand zwischen Donor und Akzeptor einer Wasserstoffbrückenbindung mit circa 0,3 nm bzw. 3 Å erfasst werden.

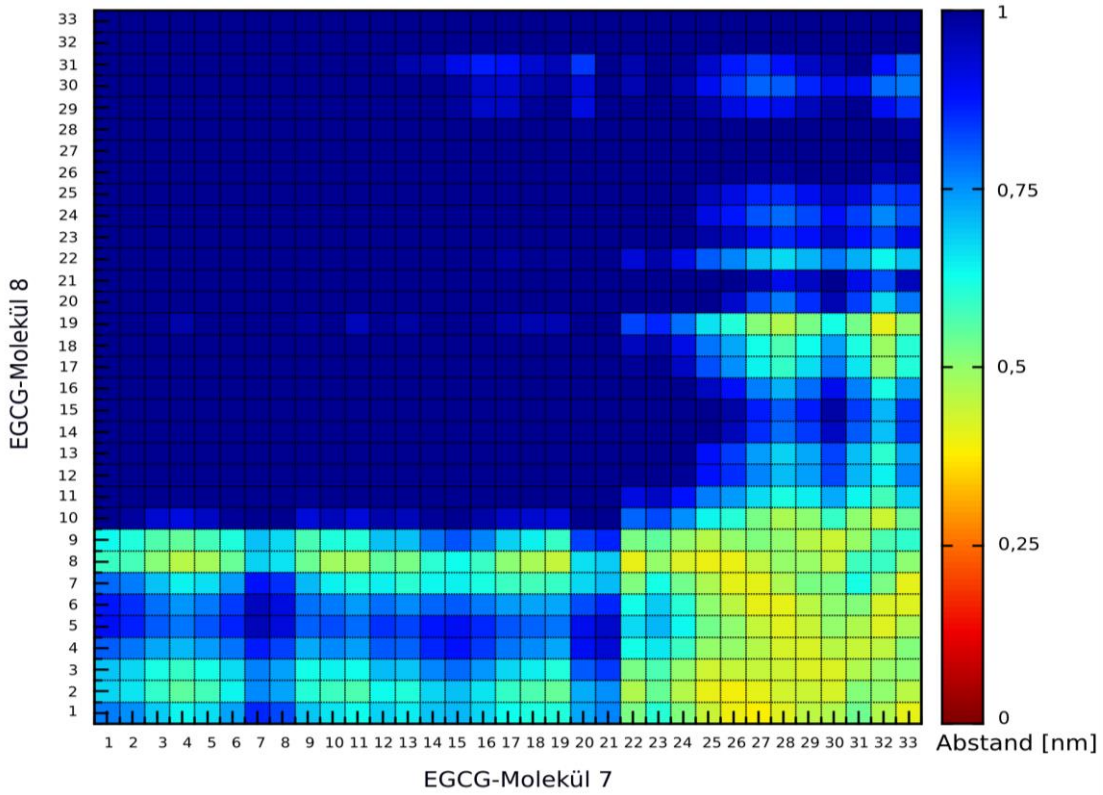
(a)



(b)



(c)



(d)

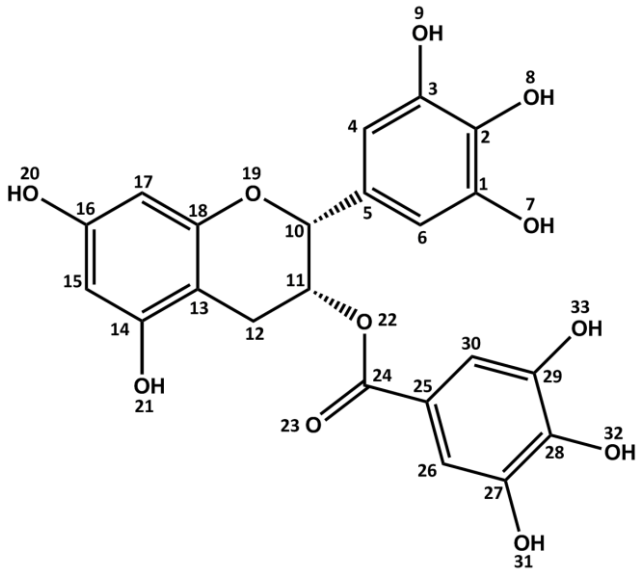


Abbildung 11: (a-c) Atomare Abstandsmatrizen zwischen M1 und M8, M5 und M6 sowie M7 und M8. (d) Zudem ist die Struktur von EGCG mit Atomnummerierung dargestellt, um die Atome zuordnen zu können.

Dabei stellen Atom 1-9 den Ring ohne Ester-Verknüpfung (1), 10-21 den Doppelring (2), 22-24 die Ester-Gruppe und 25-33 den Ring mit Ester-Verknüpfung (3) dar. Außerdem befinden sich die Sauerstoffe der Hydroxyl-Gruppen jeweils an den letzten Stellen bei der Nummerierung der drei Ringe.

Bei den drei Abstandsmatrizen ist ersichtlich, dass die Interaktion an verschiedenen Stellen des EGCGs stattfindet. Allgemein liegen die Abstände im Bereich von 4 bis 6 Å, auf π-π-Stapel-Interaktionen und keine festen, sondern wechselhafte Wasserstoffbrückenbindungen hinweist. Hier spielen vor allem die sogenannte "Sandwich"-π-Interaktion oder π-Stapel-Interaktion eine Rolle, aber es gibt bei organischen Molekülen noch weiteren π-π-Wechselwirkungen, die auch stark von den Substituenten abhängig sind und zu den VdW-Wechselwirkungen gehören[46].

Des Weiteren fällt auf, dass kaum intermolekulare Wechselwirkungen zwischen gleichartigen Ringen erfolgen. Wenn die Abstandsmatrizen zwischen M1 und M8 und M7 und M8 betrachtet werden, ist es erkenntlich, dass diese sich ergänzen. Der Ring 1 interagiert mit dem dritten Ring nur zwischen M7 und M8, aber die Abstandsmatrix von M1 zu M8 weist dort eine Lücke auf. Bei der Wechselwirkung zwischen M5 und M6 gibt es zwei größere π-Stapel-Interaktionen: Ring 1 von M5 mit dem Doppelring des Moleküls 6 sowie Ring 1 von M6 mit dem Ring 3 mit Ester-Verknüpfung des Moleküls 5. Der Doppelring von M6 interagiert nicht mit M5, sondern mit Molekül 4, wie in Abbildung 10.b zu sehen ist.

4.3 Simulationen von EGCG mit Aβ-Fragmenten

Im diesem Abschnitt wird die EGCG-Interaktion mit den ausgewählten Aβ-Fragmenten untersucht und interpretiert. Zuerst werden die Simulationen mit 1:1- und anschließend mit 4:4-Verhältnis besprochen.

4.3.1 Verhältnis 1:1

Hierbei sollte die Wechselwirkung zwischen EGCG und den Aβ-Fragmenten im Allgemeinen analysiert werden. In Abbildung 12 sind der Abstand zwischen den Aβ-Peptide und EGCG sowie SASA der Fragmente gezeigt, um die Simulation nachvollziehen zu können. Es ist zu erkennen, dass die Aβ-Peptide anfangs relativ weit vom EGCG entfernt sind, sich jedoch in weniger als 10 ns annähern. Nur Aβ(31-33) löst sich einige Male von EGCG, wie am Anstieg des Abstands und von SASA ersichtlich ist. Im Gegensatz dazu bleiben die anderen beiden Fragmente über die gesamte Simulationszeit in Kontakt mit EGCG.

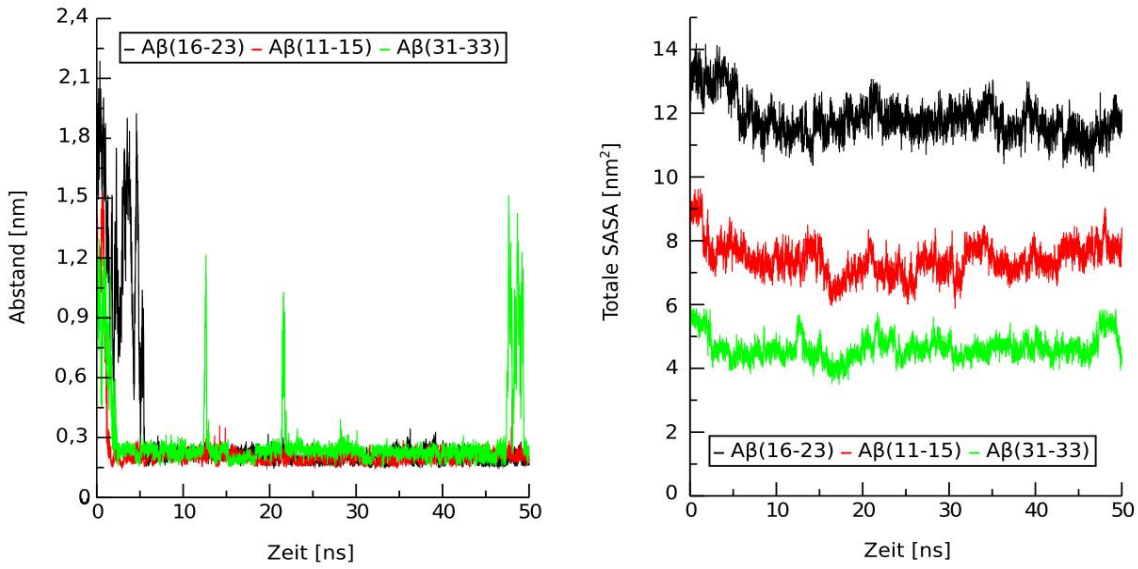
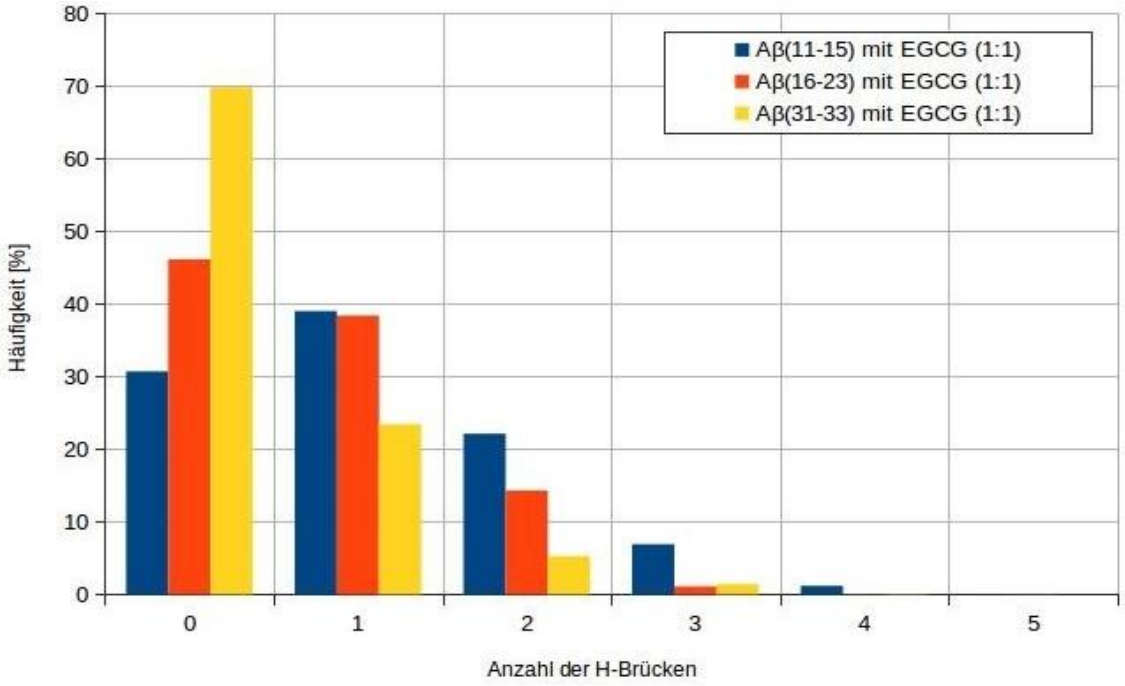


Abbildung 12: Der Verlauf der Simulationen von EGCG mit den Aβ-Molekülen im Verhältnis 1:1. Dazu ist links der Abstand zwischen EGCG und dem jeweiligen Aβ-Peptid sowie rechts SASA der Peptide in Abhängigkeit der Zeit dargestellt.

Als nächstes werden die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Aβ-Peptiden und EGCG angeschaut (Abb. 14). Dazu wird die relative Häufigkeit der Anzahl der H-Brücken in Abhängigkeit der absoluten und normierten Anzahl aufgetragen. Die normierte Anzahl der Wasserstoffbrückenbindung gibt an, wie viele der möglichen H-Brücken sich wirklich zwischen den jeweiligen Molekülen innerhalb der Simulation ausgebildet haben.

(a)



(b)

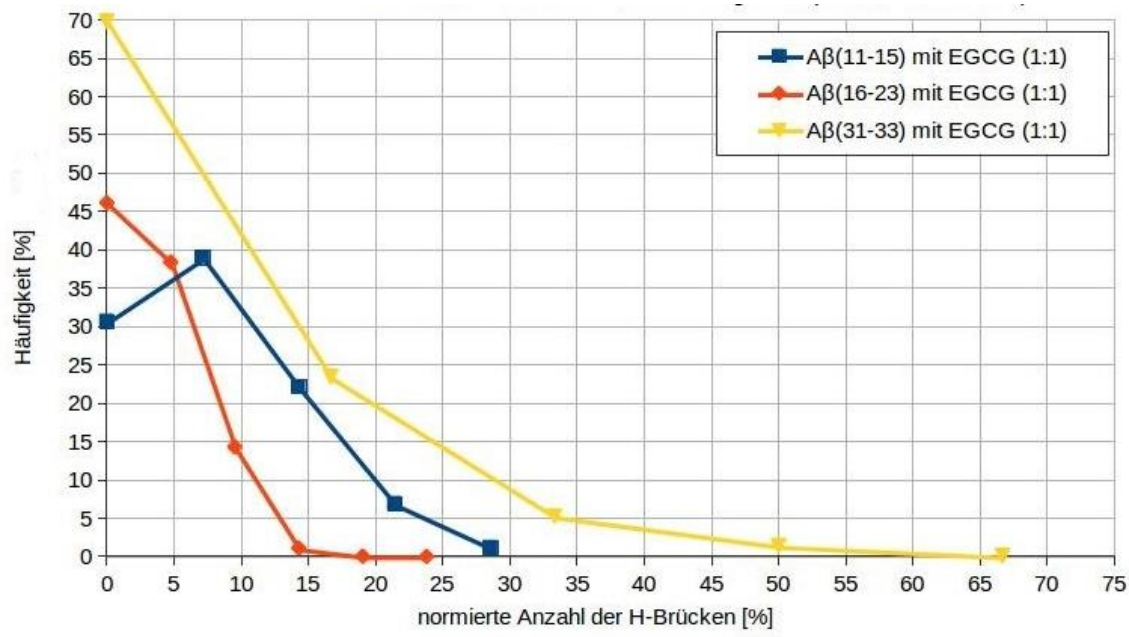


Abbildung 13: Die prozentuale Häufigkeit der absoluten (a) und normierten (b) Anzahl der H-Brücken zwischen EGCG und dem zugehörigen Peptid. Bei der normierten Anzahl wurden die jeweiligen Kontakte, die möglicherweise eine Wasserstoffbrückenbindung ausbilden können, gezählt und die tatsächliche Anzahl durch diese Zahl geteilt, welche bei Aβ(31-33) 6, bei Aβ(11-15) 14 und bei Aβ(16-23) 21 beträgt.

Die beiden Diagrammen zeigen, dass Aβ(31-33) zu 70% keine H-Brücken mit EGCG ausbildet, während bei den anderen Fragmenten bevorzugt ein bis zwei H-Brücken mit EGCG entstehen (> 60%). Allerdings macht das nicht einmal die Hälfte der möglichen H-Brücken im Peptid aus (5-15%). Einzig bei Aβ(31-33) sind temporär 50% der möglichen H-Brücken geformt, was aber in der Trajektorie nur zu 3% auftritt. Dagegen bilden Aβ(16-23) und Aβ(11-15) bis zu fünf H-Brücken mit EGCG aus, die lediglich 24 bzw. 28% darstellen. Hierbei spielt Wasser auch eine Rolle, da die Moleküle auch mit dem Solvens in dieser Form in Wechselwirkungen treten. Diese Wasserstoffbrückenbindungen werden schnell gebildet, jedoch durch die Bewegung des Wassers auch wieder gebrochen. Ebenfalls passiert dies auch mit den intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen des EGCG mit den Fragmenten und weshalb diese nicht stabil sind.

Zum Schluss werden die Abstandsmatrizen zwischen den EGCG-Atomen und den Aminosäuren (AS) der Aβ-Peptide für die Analyse der intermolekularen Interaktionen betrachtet, die in Abbildung 14 zu sehen sind.

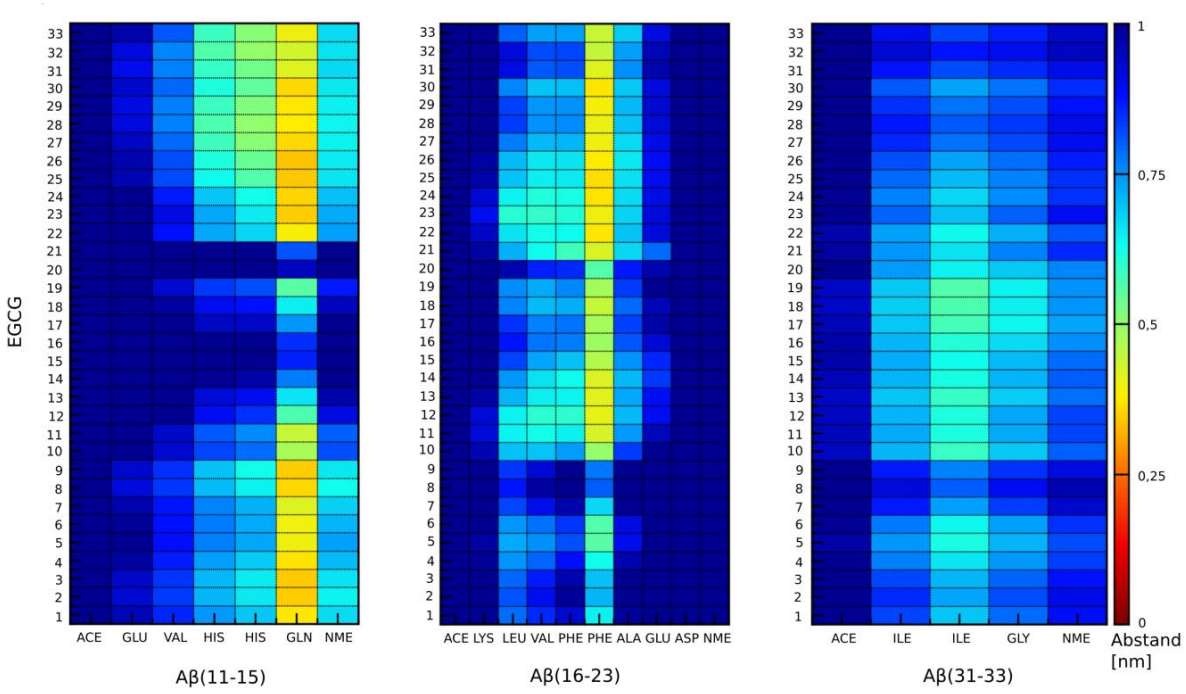


Abbildung 14: Abstandsmatrizen zwischen den Aminosäuren der Aβ-Fragmente und den Atomen des EGCG. Hierbei wurde der Abstand bis 10 Å und ab 30 ns gemessen. Die EGCG-Atome 1-9 gehören zum Ring ohne Ester-Verknüpfung (1), 10-21 zum Doppelring (2), 22-24 zur Ester-Gruppe und 25-33 zum Ring mit Ester-Verknüpfung (3).

Dabei beschreibt die Abkürzung ACE die Acetylierung des N-Terminus und NME die Amidierung des C-Terminus, da es sich um ungeladene Fragmente handelt und diese im vollständigen Aβ noch nicht enden. Um die natürlichen Interaktionen nicht durch geladene Termini zu stören und die angrenzenden Peptidbindungen zu modellieren, wurde an den Enden entweder eine Acetyl- oder N-Methyl-Gruppe angehängt.

Es findet kaum eine Wechselwirkung zwischen dem kleinen Aβ(31-33)-Fragment und EGCG statt, wohingegen in Aβ(11-15) das Gln15 und in Aβ(16-23) das Phe20 mit EGCG über 20 ns stark interagiert. Es fällt auf, dass das Phe20 des Aβ(16-23)-Peptids mit dem zweiten und dritten Ring in Kontakt tritt und zur Ester-Gruppe vermutlich eine Wasserstoffbrückenbindung ausbildet. Ebenfalls interagiert Gln15 von Aβ(11-15) mit zwei Ringen und dem Carbonylsauerstoff des Esters (Atom 23) über mögliche H-Brücken. Des Weiteren wechselwirken die Histidine leicht mit dem dritten Ring, was auf π-Interaktionen hindeutet.

4.3.2 Verhältnis 4:4

Anhand der 4:4-Systeme kann die Inhibition der Aβ-Aggregation durch EGCG beobachtet und analysiert werden. Wie schon beim 1:1-Verhältnis, ist der Simulationsablauf über SASA (Abb. 15) und den Abstand zwischen den Substanzen erkennbar, wobei sich die Diagramme für den Abstand zwischen den EGCG- und Aβ-Molekülen im Anhang 6.2 befinden. Außer bei Aβ(31-33) besitzen die EGCG-Moleküle eine kleinere SASA als die Fragmente und sinkt teilweise auf bis zu 1 nm^2 ab.

In der Simulation mit den Aβ(11-15)-Fragmenten bilden sich zunächst ein EGCG-Dimer und ein EGCG-Aβ-Komplex, wobei sich dieser ungefähr nach 20 ns wieder löst, während sich am EGCG-Dimer ein Aβ-Molekül anlagert. Des Weiteren interagieren zwei Aβ-Peptide kurzzeitig miteinander, allerdings entfernen sie sich wieder und eines bindet am EGCG-Dimer-Aβ-Aggregat. Danach assemblieren ein weiteres Aβ(11-15) und EGCG, wodurch ein Trimer-Trimer-Heterokomplex innerhalb von 30 ns entsteht. Erst, nachdem 90 ns vergangen sind, schließt sich das 1-EGCG-1-Aβ-Aggregat, welches sich am Anfang gelöst und nach 40 ns wieder gebildet hat, dem großen Komplex an. Ein

EGCG befindet sich direkt in der Mitte des Aggregats, was am starken Abfall von SASA in Abbildung 15 ersichtlich ist. Im Gegensatz dazu verändert sich SASA des vierten EGCG-Moleküls kaum, was daran liegt, dass es sich erst zum Schluss am Komplex anlagert. Dies gilt auch für das vierte Aβ-Fragment, dessen SASA nach circa 90 ns am stärksten abfällt.

Bei den Aβ(16-23)-Peptiden gibt es keine vollständige Aggregation nach 100 ns, da sich das dritte Peptid zwar nähert, aber nicht komplett am Komplex bindet. Dies ist der Zufälligkeit von MD-Simulationen geschuldet, da bei den 500 ns-Simulationen zwischen 35 und 120 ns ein großes Aggregat entsteht. Hierbei bilden sich schnell zwei Dimere aus EGCG, wobei eines davon an einem Aβ-Fragment bindet. Nach wenigen Nanosekunden lagert sich das andere Dimer am Komplex an, welcher ein Peptid und zwei EGCG umfasst. Innerhalb von circa 45 ns nähert sich das vierte Aβ(16-23) an, was sich durch den kurzzeitigen Abfall von SASA für dieses Fragment erkennen lässt, allerdings entfernt es sich dann wieder. In dieser Zeit bindet dann das zweite Peptid und anschließend das vierte vollständig. Während dieses Vorgangs sinkt SASA des vierten Aβ(16-23)-Fragments am stärksten ab. EGCG befindet sich die ganze Zeit über als Tetramer im Kern des Aggregats, sodass die Peptide nur leicht miteinander interagieren können. SASA der EGCG-Moleküle nimmt stetig ab, mit Ausnahme der Anlagerung von Aβ(16-23) an, was sich durch einen stärkeren Abfall von SASA auszeichnet.

In der Simulation des kleinsten Aβ-Fragments erfolgt die vollständige Aggregation der acht Moleküle mit 25 ns am schnellsten. Zunächst bildet sich ein Trimer aus EGCG, an das sich erst das vierte Aβ(31-33) und dann ein EGCG-Peptid-Komplex anlagert. Danach binden dann die zwei letzten Peptide an den Komplex. Meistens befinden sie sich zwischen den Aβ-Fragmenten EGCG, allerdings gibt es auch direkte Interaktionen zwischen den Peptiden. Dabei treten alle drei Aminosäuren des einen mit denen des anderen Peptids in Kontakt, was ansonsten nicht der Fall ist. An der Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen in Abbildung 16 lässt sich eine stetige Aggregation von Aβ und EGCG erkennen, was am Anstieg der Anzahl der H-Brücken zu sehen ist. Hierbei weist EGCG mit Aβ(16-23) die größte Anzahl mit einem Wert von 19 und Aβ(31-33) am wenigsten mit 14 H-Brücken auf.

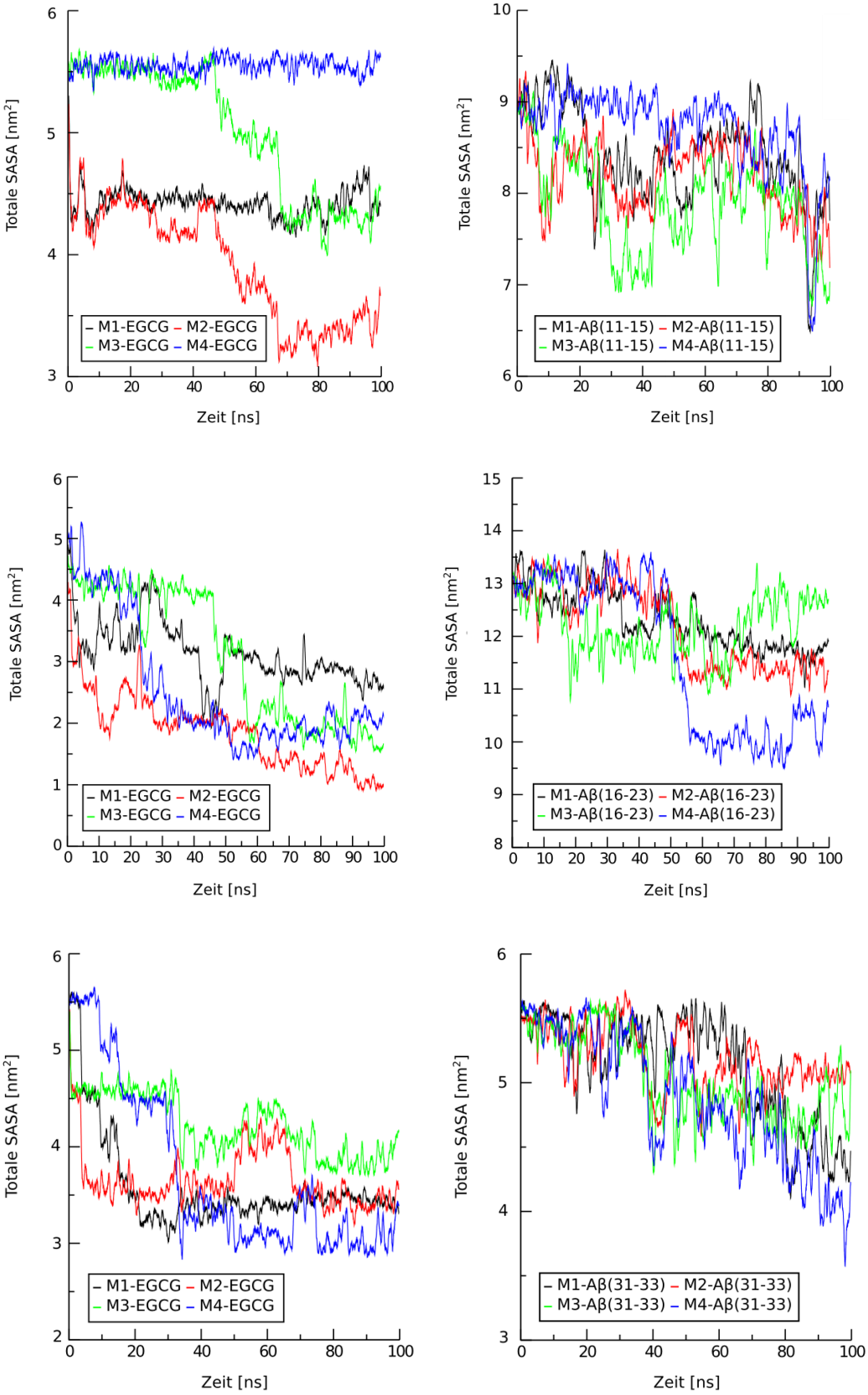
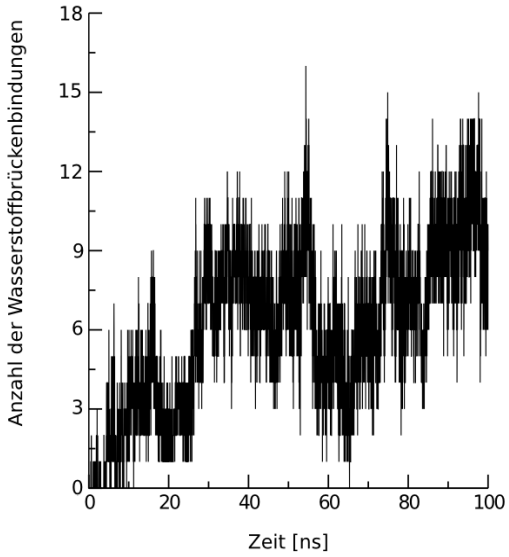
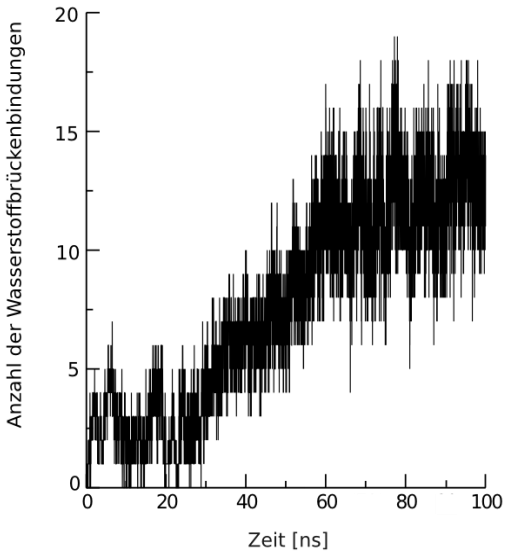


Abbildung 15: SASA der Aβ-Fragmente (rechts) und die der zugehörigen EGCG-Moleküle (links).

(a)



(b)



(c)

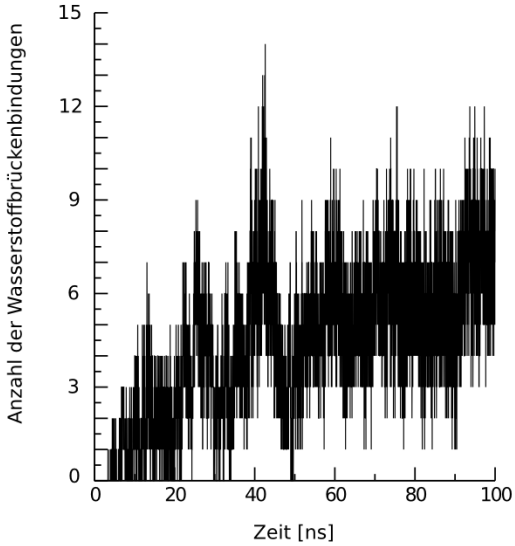
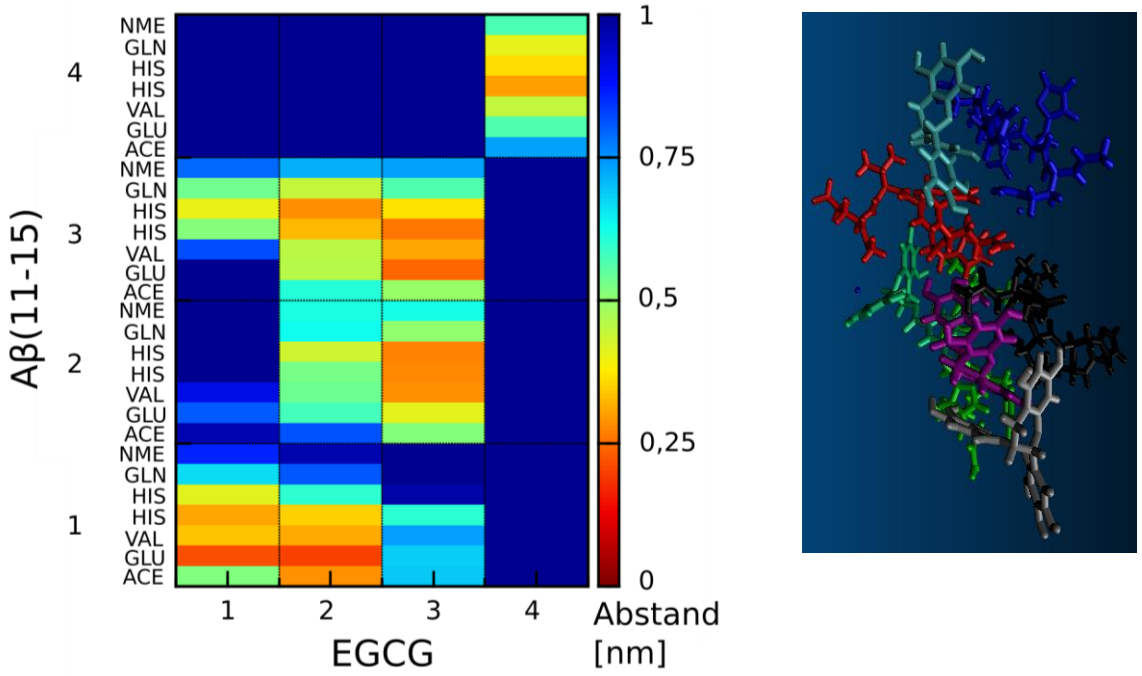


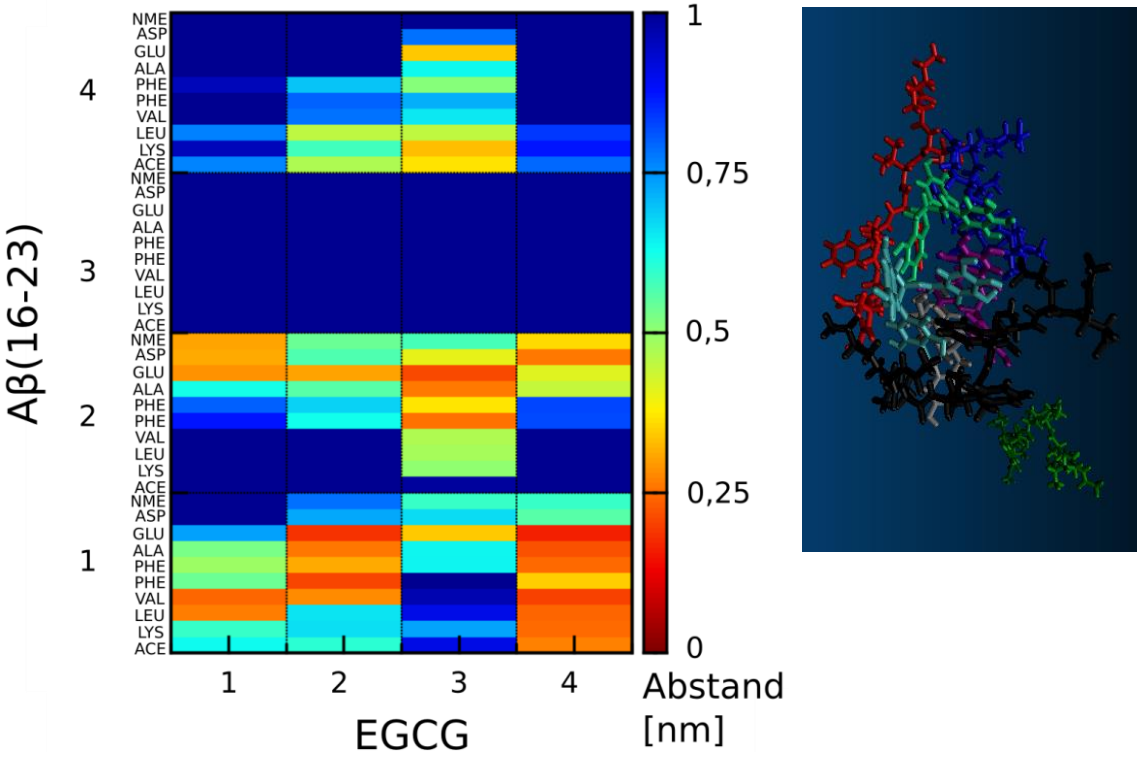
Abbildung 16: Gesamtanzahl der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen EGCG und den (a) Aβ(11-15)-, (b) Aβ(16-23)- sowie (c) Aβ(31-33)-Fragmenten während der 4:4-Simulationen.

Im Folgenden werden die intermolekularen Wechselwirkungen zwischen den EGCG- und Aβ-Molekülen untersucht. Die jeweiligen Abstandsmatrizen sind in Abbildung 17 dargestellt. Dabei werden die Peptide in Aminosäuren aufgespalten, um die stärkste Interaktion besser zu verdeutlichen. Für die stärkste Wechselwirkungen werden die Abstandsmatrizen für ausgewählte Aβ- und EGCG-Moleküle in Abbildung 18 gezeigt, wobei EGCG in seine Atome ohne Wasserstoffatome (Abb. 11.d) aufgelistet ist.

(a)


Aβ(11-15)
4
3
2
1
NME GLN HIS HIS VAL GLU ACE
1
2
3
4
EGCG
1
0,75
0,5
0,25
0
Abstand
[nm]

(b)


Aβ(16-23)
4
3
2
1
NME ASP GLU ALA PHE PHE VAL LEU LYS ACE
1
2
3
4
EGCG
1
0,75
0,5
0,25
0
Abstand
[nm]

(c)

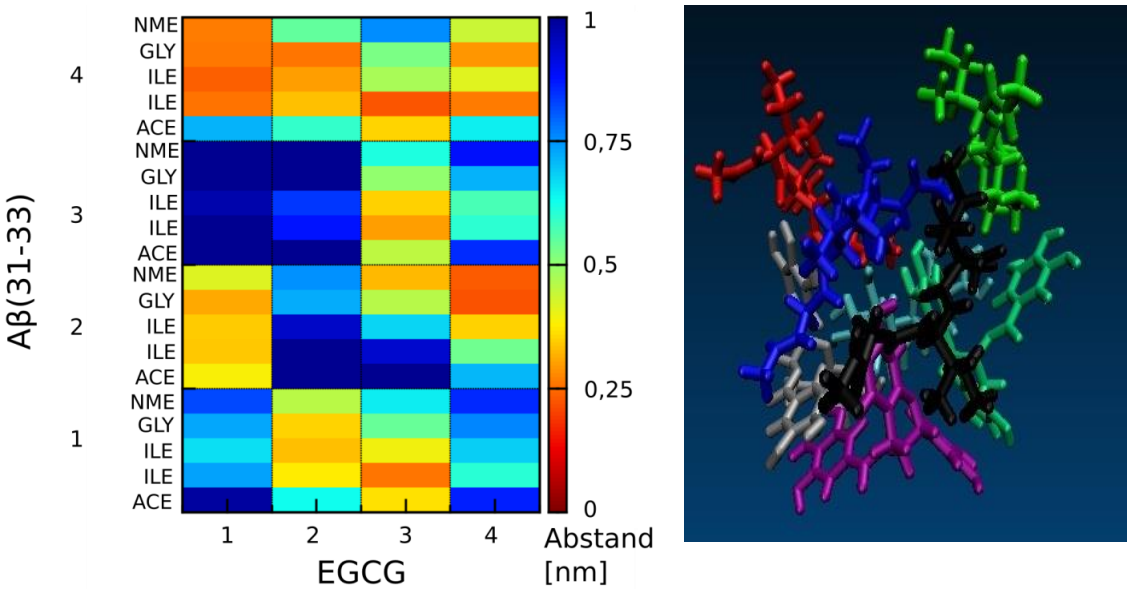
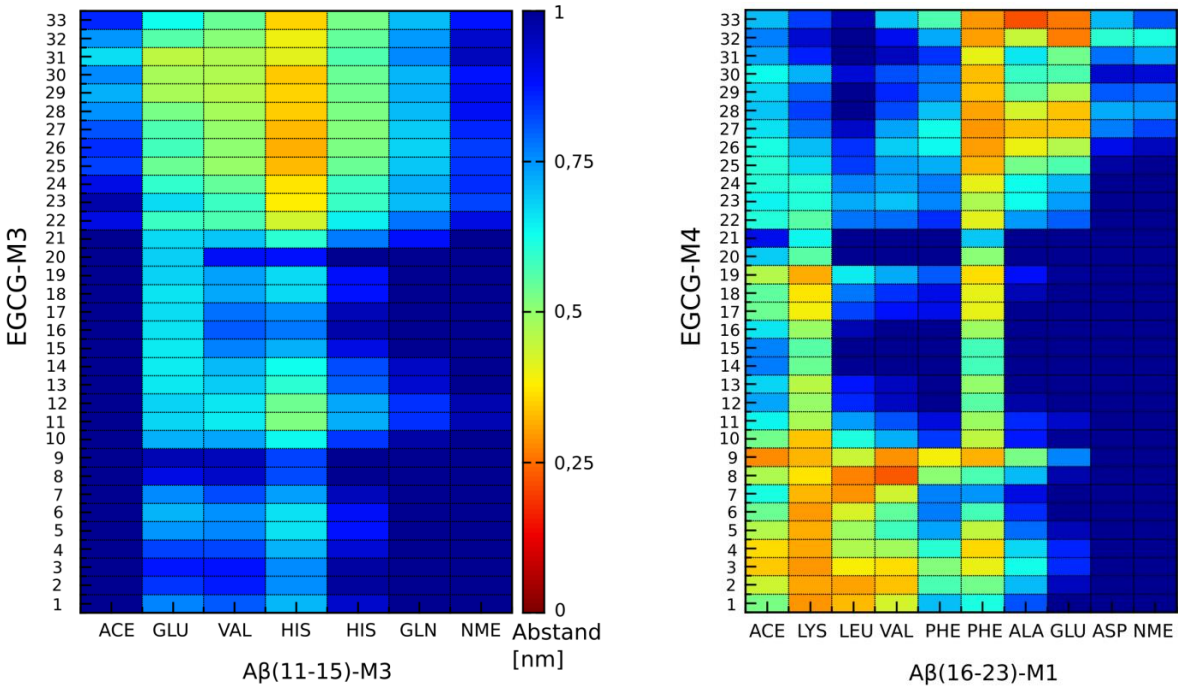


Abbildung 17: (a-c) Abstandsmatrizen der Aβ-Fragmente mit EGCG im 4:4-Verhältnis und zusätzlich mit einer Aufnahme eines für die Simulation typischen EGCG-Aβ-Aggregats. Die Peptide sind in ihre Aminosäuren aufgespalten, wohingegen EGCG als Molekül dargestellt ist. Der Abstand wurde bis 10 Å und ab 50 ns berechnet.

Es ist deutlich, dass die Interaktionen zwischen den Molekülen stärker sind als beim 1:1-Verhältnis außer bei Aβ(11-15). Das Gln15 des Aβ(11-15)-Fragments bildet dieses Mal kaum eine Wechselwirkung mit diesem EGCG-Molekül aus. Stattdessen interagiert das His13 mit dem dritten Ring und der Ester-Gruppe des EGCG stärker. Da es sich um den zeitlichen Durchschnitt von 50 ns handelt, sind die ersichtlichen Wasserstoffbrückenbindungen fest ausgebildet, zum Beispiel zwischen dem protonierten Stickstoff des Histidin-Seitenrests bzw. des Peptidrückgrats und dem Carbonylsauerstoff von EGCG (Atom 23). Des Weiteren können durch die aromatischen Histidine auch π-Wechselwirkungen auftreten. Bei den anderen beiden Peptiden gibt es mehrere Interaktionen zwischen den EGCG-Gruppen und den jeweiligen Aminosäuren. Der Ring 1 des EGCG wechselwirkt mit dem N-Terminus des Aβ(16-23)-Fragments und bei Aβ(31-33) mit dem C-Ende.



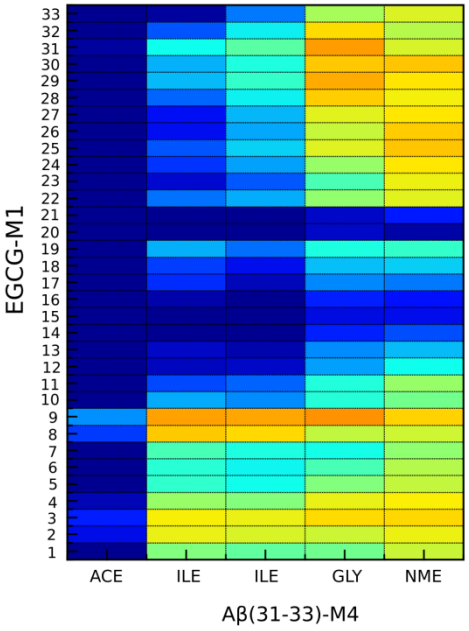


Abbildung 18: Interaktionen zwischen den Aminosäuren der Peptide und den Atomen von EGCG für ausgewählte Moleküle ab 50 ns. Hierbei gehören die EGCG-Atome 1-9 zum Ring ohne Ester-Verknüpfung (1), 10-21 zum Doppelring (2), 22-24 zur Ester-Gruppe und 25-33 zum Ring mit der Ester-Verknüpfung (3).

Das Alanin und Valin von Aβ(16-23) treten stark mit einer OH-Gruppe von EGCG in Kontakt, was vermuten lässt, dass dort eine dauerhafte H-Brückenbindung im Peptidrückgrat entstanden ist. Ebenfalls ist dies auch bei Lysin und Glutamat der Fall. Zudem gibt es Hinweise, dass Phe20 mit den EGCG-Ringen eine π-Wechselwirkung eingeht. Der Abstand liegt im Bereich von 2,5 bis 3 Å. Die intermolekularen Interaktionen von Aβ(31-33) mit EGCG sind allgemein wesentlich stärker im Vergleich zum 1:1-

Verhältnis, insbesondere mit den Ringen 1 und 3. Da Aβ(31-33) nur hydrophobe Aminosäuren besitzt, werden mit dem Peptidrückgrat Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet. Dies ist an den OH-Gruppen von EGCG erkennbar, welche durch die Atome 9, 31 und 32 repräsentiert werden. Des Weiteren treten noch VdW-Wechselwirkungen zwischen den hydrophoben Teilen des Fragments und den C-Atomen von EGCG auf, die auch zum Teil aromatisch sind. Dafür interagiert EGCG nicht mit dem N-Terminus von Aβ(31-33), welcher entweder mit einem anderen Peptid wechselwirkt oder frei aus dem Komplex heraustritt.

Bei der Simulation mit vier Aβ(16-23)-Fragmenten ohne EGCG findet die Assemblierung innerhalb von 55 ns statt, wobei sich erst ein Dimer bildet und sich die beiden anderen Peptide nacheinander innerhalb von 45 ns anlagern. An SASA in Abbildung 19 ist zu erkennen, dass die Fläche nach circa 55 ns bei allen Peptiden stark abfällt und bei 80 ns wieder steigt. Das liegt daran, dass das zweite Peptid sich für etwa 10 ns wieder vom Komplex löst, was auch an der Abnahme der Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen ersichtlich ist. Bei den drei langen Simulationen erfolgt die Aggregation zwischen 45 und 70 ns.

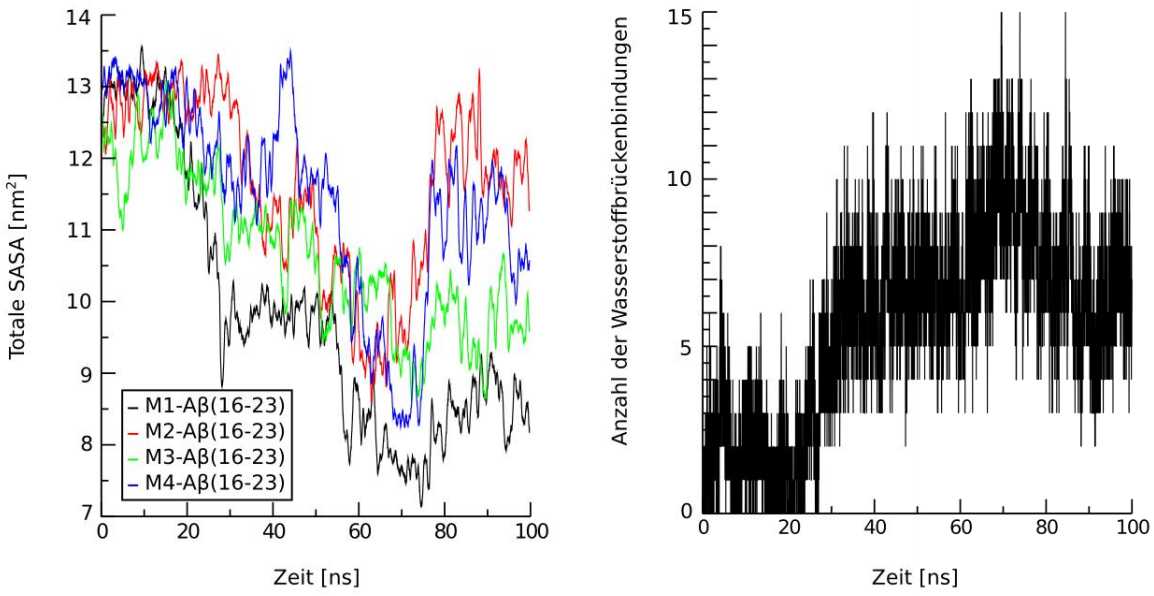
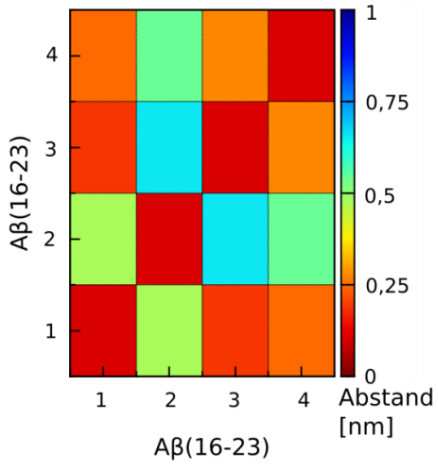


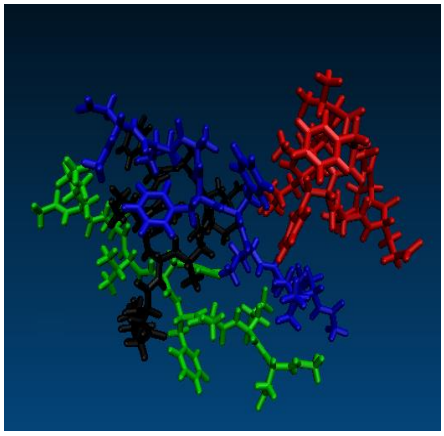
Abbildung 19: SASA und die Gesamtanzahl der Wasserstoffbrückenbindungen der Aβ(16-23)-Peptide während der Simulation ohne EGCG.

Es werden auch intermolekulare Wechselwirkungen zwischen den Aβ(16-23)-Fragmenten mithilfe von Abstandsmatrizen analysiert (Abb. 20). Die Matrix für die Interaktion zwischen den einzelnen Molekülen zeigt, dass Molekül 1 mit M3 und M4 am stärksten interagieren. Die Beiträge zu diesen Wechselwirkungen der einzelnen Aminosäuren werden näher untersucht, um festzustellen, welche Aminosäuren miteinander in Kontakt treten.

(a)



(b)



(c)

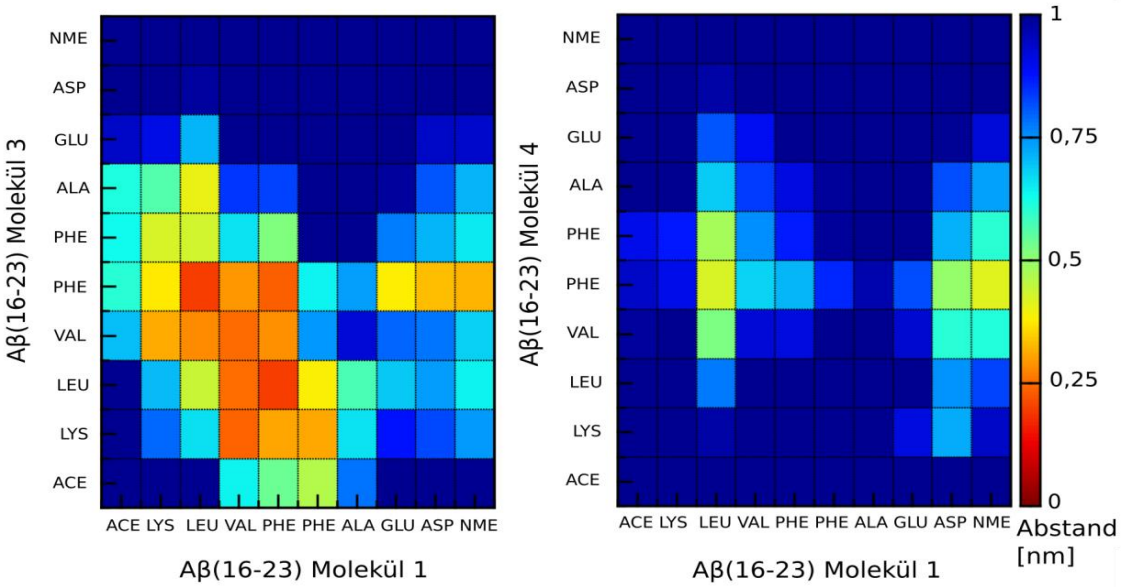


Abbildung 20: (a) Abstandsmatrix zwischen der Peptiden während der Simulation von Aβ(16-23) und (b) eine Momentaufnahme der Moleküle. (c) Intermolekulare Interaktion zwischen zwei ausgewählten Aβ(16-23)-Fragmenten, welche in ihre Aminosäuren aufgespalten sind. Die Abstandsmatrix wurde ab 50 ns gemittelt.

In Abbildung 20.c zeigt sich, dass nur M1 und M3 über 50 ns eine starke Interaktion aufweisen. Dabei ist ersichtlich, dass sich zwei Phenylalanine nahe kommen. Diese wechselwirken auch sowohl mit den hydrophoben Aminosäuren Valin und Leucin als auch mit polaren Aminosäuren wie Lysin, Aspartat und Glutamat. Damit spielen die polaren Wasserstoffbrückenbindungen sowie VdW-Interaktionen eine große Rolle.

Zum Schluss der Analyse der Simulationen im 4:4-Verhältnis wird die Sekundärstruktur des Aβ(16-23)-Peptids mit EGCG und ohne EGCG untersucht, wobei sowohl die kurze 100-ns-Trajektorie als auch die langen Simulationen von 500 ns in Betracht gezogen werden. Die beiden anderen Aβ-Fragmente 11-15 und 31-33 besaßen keine Sekundärstruktur. Zuerst werden die kurzen Trajektorien von Aβ(16-23) interpretiert, welche für beide Systeme in Abbildung 21 dargestellt sind.

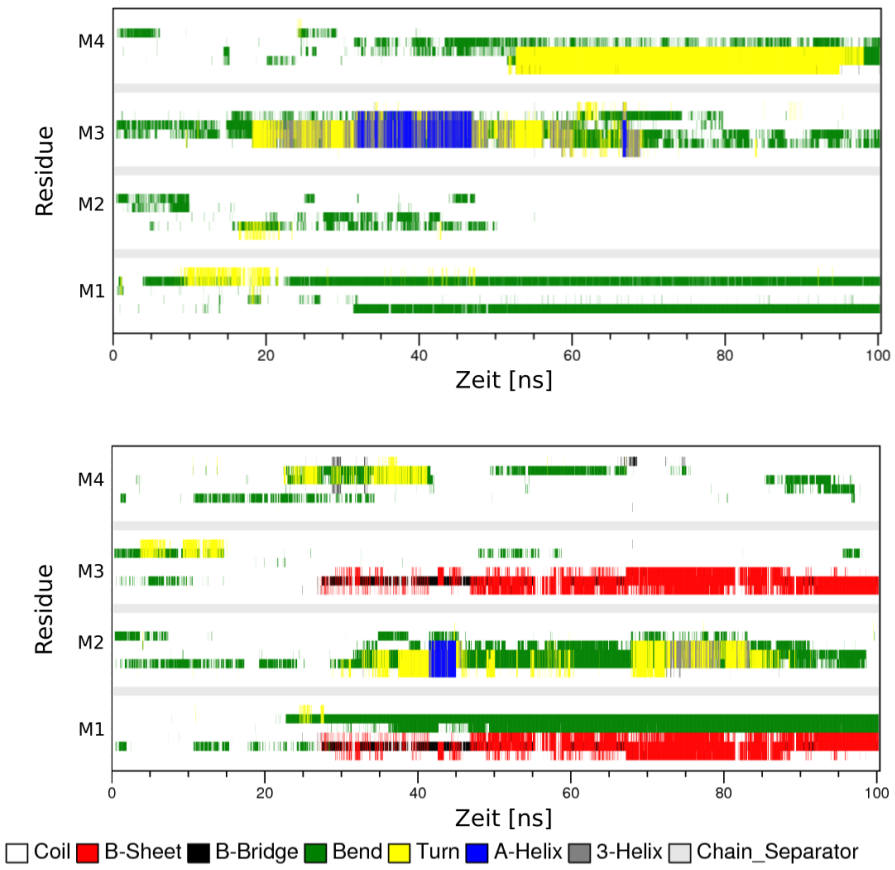


Abbildung 21: DSSP-Auftragung für die Sekundärstrukturbestimmung von Aβ(16-23) mit (oben) und ohne EGCG (unten). Es ist offensichtlich, dass sich keine β-Faltblätter innerhalb des Peptids mit EGCG ausbilden. Im Gegensatz dazu sind α-Helices möglich.

Daraus ergibt sich, dass β-Faltblätter, die während der Aβ-Aggregation für die Produktion der Protofibrillen verantwortlich sind, am C-Terminus nur ohne EGCG entstehen. Hierbei treten unterschiedliche Helix-Formen auf, nämlich die α- und 3_{10}-Helices. Es bestätigt sich auch in den langen Simulationen (Abb. 22 und Abb. 23), dass sich β-Faltblätter nur ohne EGCG bilden, allerdings wesentlich später bei ungefähr 360 ns. Im Gegensatz zur kurzen Trajektorie tauchen vereinzelte β-Brücken (engl.: β-*bridges*) auf, welche jedoch keine β-Faltblätter bilden.

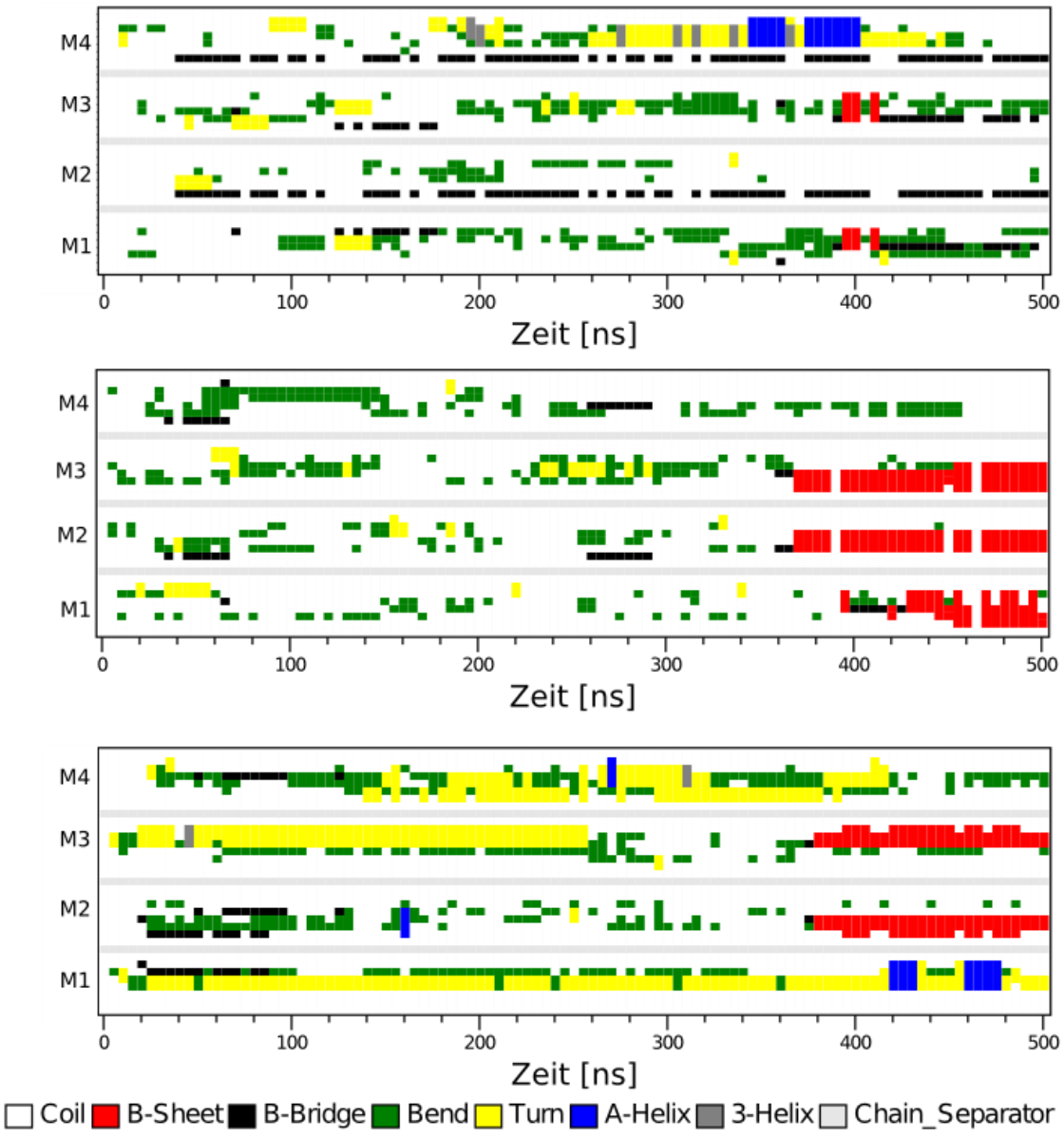


Abbildung 22: Auftragung der Sekundärstruktur von den Aβ(16-23)-Molekülen innerhalb von 500 ns ohne EGCG bei insgesamt drei Simulationen.

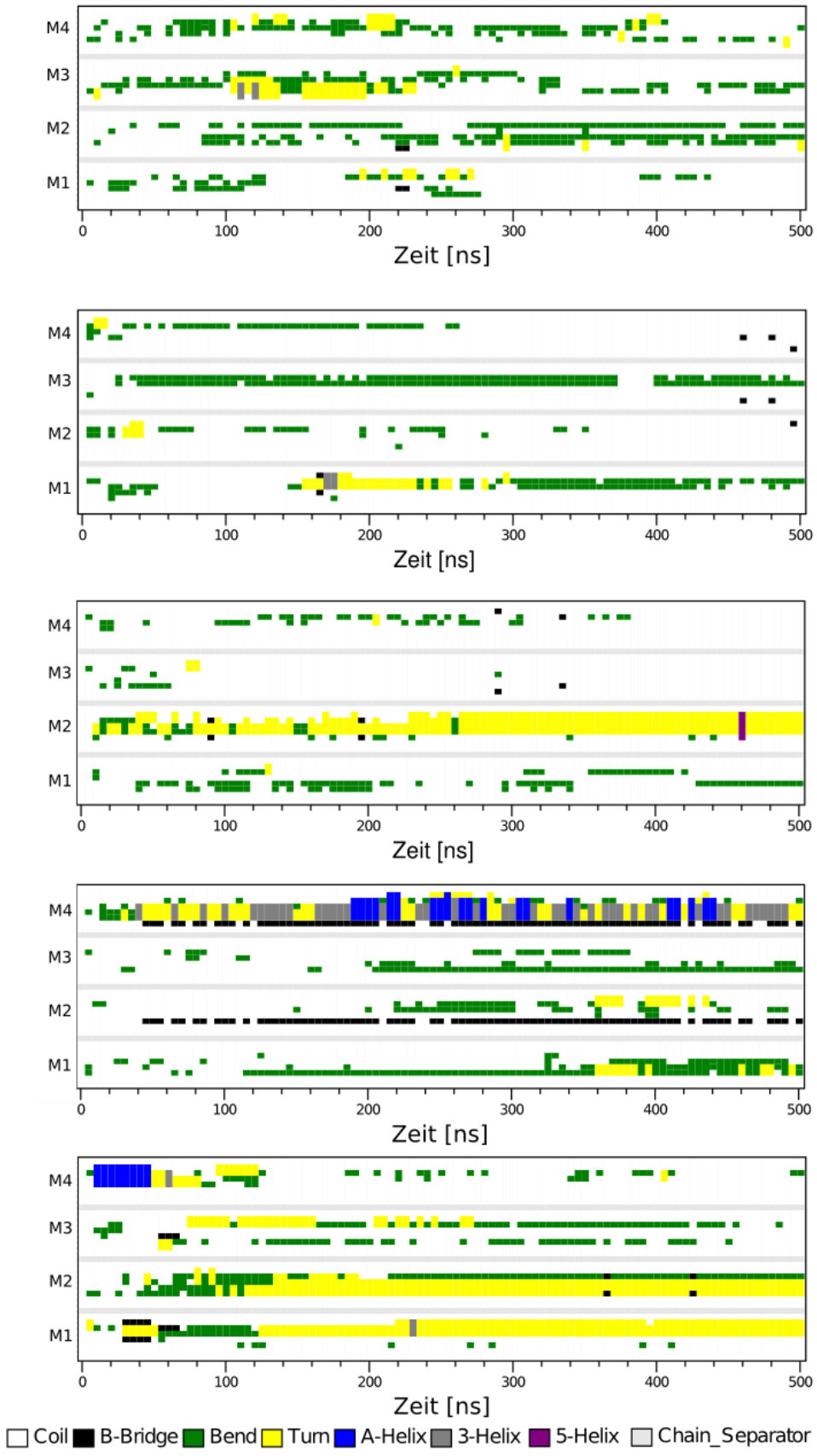


Abbildung 23: Sekundärstruktur der Aβ(16-23)-Fragmente mit EGCG aller fünf Simulationen.

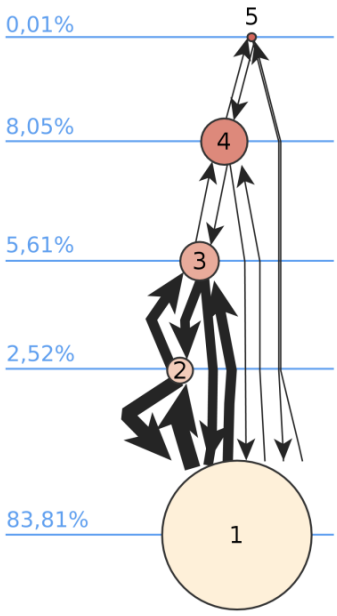
4.4 Transitionsnetzwerke

Die Transitionsnetzwerke dienen zur statistischen Auswertung und der Agregationssimulationen von EGCG mit beiden Ladungssätzen sowie von Aβ(16-23)-Peptiden mit und ohne EGCG.

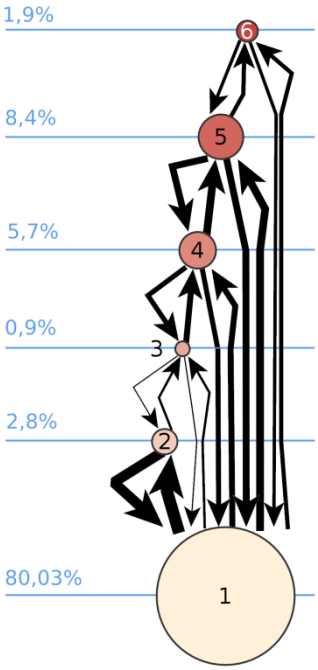
4.4.1 Aggregation von EGCG

Um weitere Unterschiede zwischen den beiden Methoden für die partielle Ladungsbestimmung zu erkennen, wird jeweils ein Transitionsnetzwerk erstellt (Abb. 24). Der Cutoff-Wert für die Erkennung von Oligomeren beträgt 5 Å. Es ist deutlich, dass die Interaktionen bei AM1-BCC-Ladungen kleiner sind als bei RESP, da sich bei einer Konzentration von 10 mM EGCG mit einer geringen Population ein Pentamer bildet, wohingegen bei RESP sogar ein Hexamer entsteht und die höheren Oligomerzustände eine größere Population aufweisen. Das liegt daran, dass die RESP-Ladungen betragsmäßig einen größeren Wert besitzen als die von AM1-BCC (Abb. 6). Daher treten stärkere Wechselwirkungen zwischen den EGCG-Molekülen auf und ziehen sich besser an, wenn sie sich in der Nähe befinden. Beide Simulationen sind 50 ns lang.

(a)



(b)



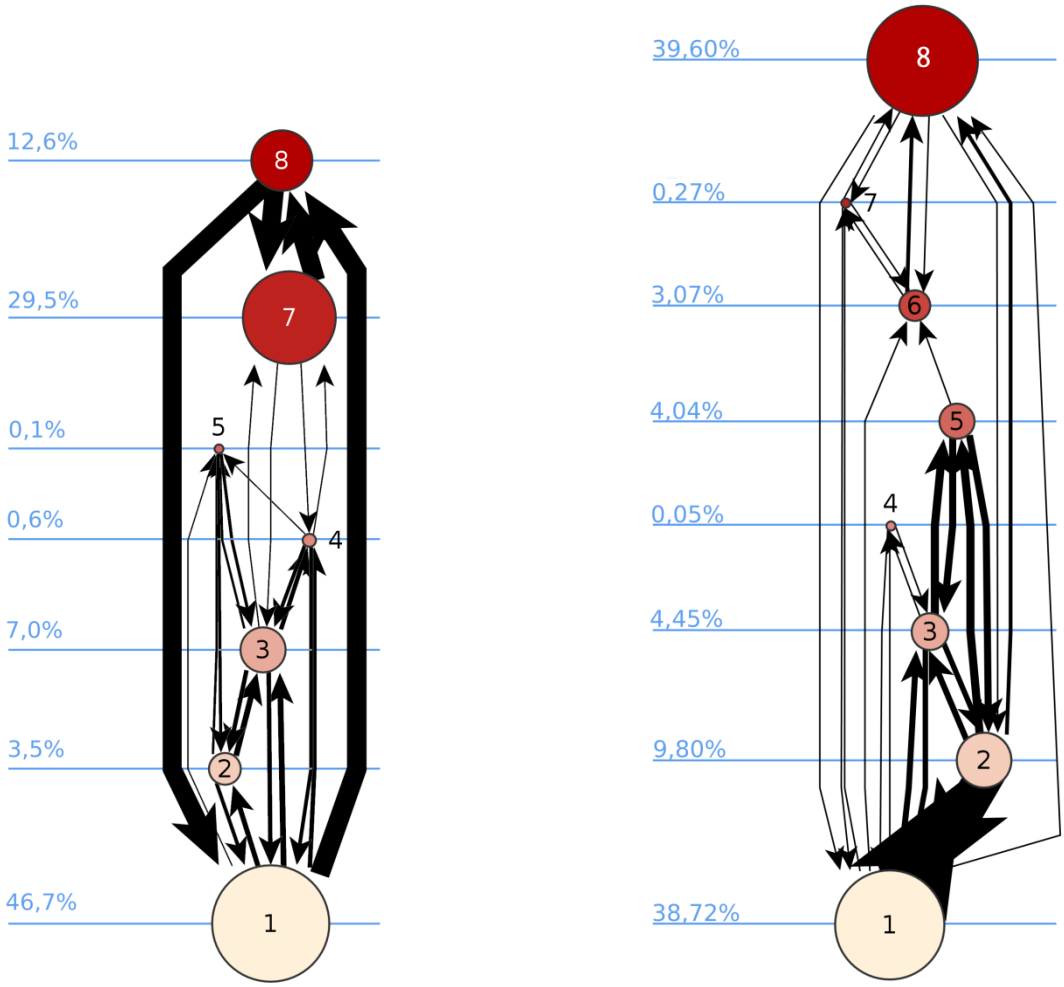


Abbildung 24: (a)Transitionsnetzwerke für die 50 ns-Simulationen des Systems mit 10 mM EGCG und (b) für die ersten 30 ns der Simulation mit 100 mM EGCG. Links sind die TN mit den AM1-BCC- und rechts mit den RESP-Ladungen dargestellt. Die Größe der Knoten entspricht der Population und die Pfeildicke der absoluten Anzahl der Übergänge zwischen den zugehörigen Oligomeren. Zusätzlich sind die Knoten nach dem Oligomerzustand rötlich gefärbt. Je höher der Zustand ist, desto intensiver ist die Farbe. Des Weiteren ist die relative Zahl der Population in blau, links von den Kreisen dargestellt.

Für 100 mM EGCG wurden nur die ersten 30 ns für die Erstellung der Transitionsnetzwerke verwendet, um die Populationen miteinander vergleichen zu können. Die Simulationslänge mit dem RESP-Ladungssatz beträgt 60 ns. Das zugehörige Netzwerk befindet sich zur Vollständigkeit im Anhang 7.3. Bei den AM1-BCC-Ladungen sind zwar die

zwei größten Oligomere 7 und 8 gut ausgebildet, aber die Aggregation ist noch nicht komplett abgeschlossen, da sich anscheinend wieder Monomere lösen. Deshalb besitzt das Heptamer mit dem Monomer zusammen die größte Population (46,7% und 29,5%). Des Weiteren sind die Übergänge zwischen den kleineren Oligomeren eher gering. Dagegen erfolgt bei der Benutzung von RESP-Ladungen der stärkste Übergang vom Monomer zum Dimer, der dann zu den Zuständen 3 und 5 weiterentwickelt. Das Tetramer ist weniger vorhanden, da es offensichtlich nur über das Trimer entsteht. Nach nur 30 ns besitzt das Oktamer die höchste Population von 39,6 %, wonach das Monomer mit 38,7% folgt. Zudem ist das Heptamer beim RESP-Ladungssatz nicht stabil und aggregiert sofort zum Zustand 8, was bei den AM1-Ladungen nicht der Fall ist. Dort findet die Aggregation langsamer statt.

4.4.2 EGCG mit dem Aβ(16-23)-Fragment

Im Folgenden wird die Aggregation des Aβ(16-23)-Peptids ohne EGCG (Abb. 25) und im Beisein von EGCG (Abb. 26) untersucht.

Abbildung 25: Transitionsnetzwerk der Aβ(16-23)-Fragmente ohne EGCG. Die farbliche Intensität der Kreise repräsentiert den Oligomerzustand, während die Kreisfläche die Population widerspiegelt. Die Dicke der Pfeile gibt die absolute Anzahl der Übergänge wieder. Zudem sind für die Vergleichbarkeit mit Abbildung 26 links nur die ersten 100 ns der MD-Simulation und rechts die gesamten 500 ns abgebildet. In blau ist die Population des jeweiligen Zustands in Prozent angegeben.

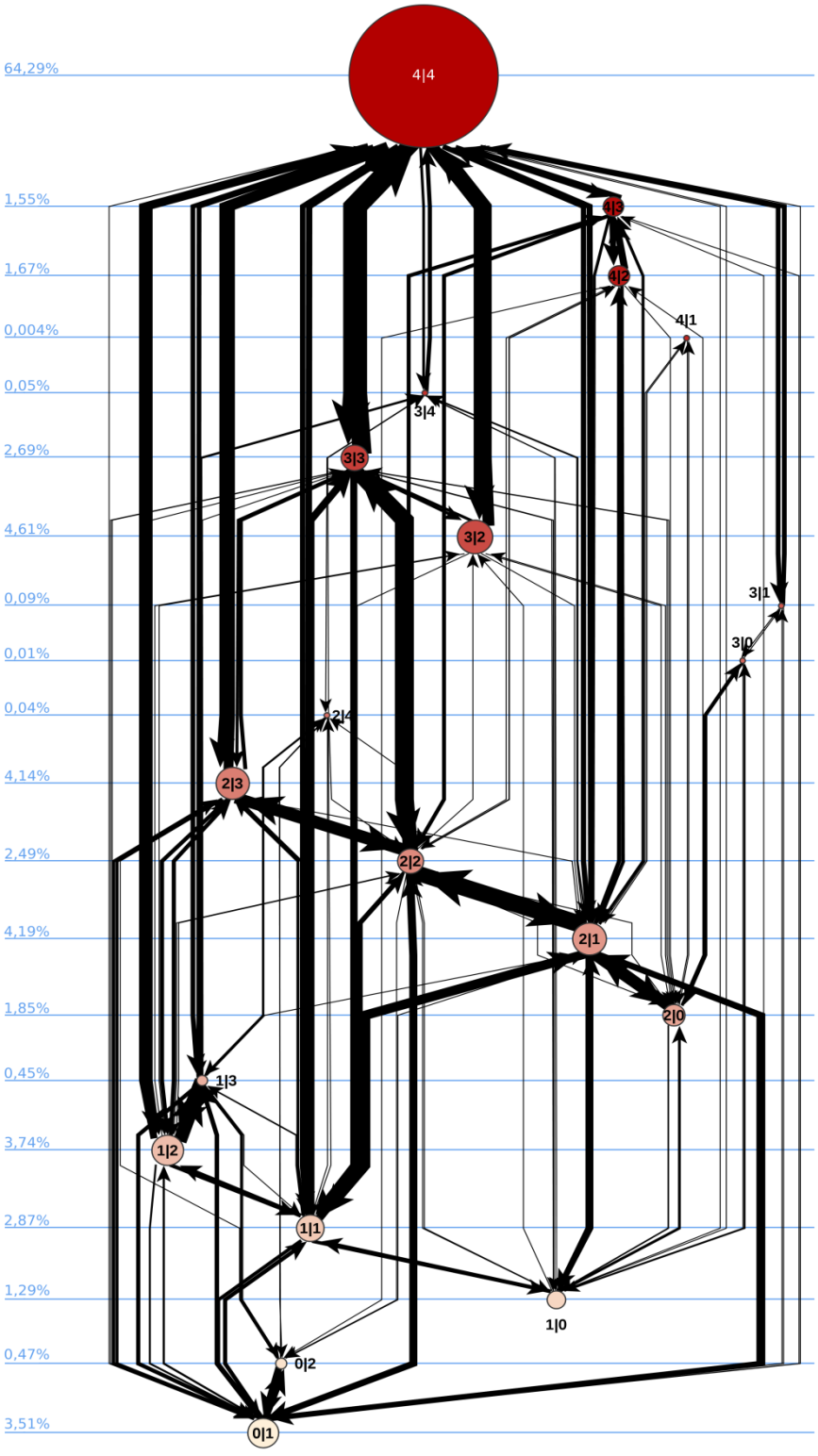


Abbildung 26: Transitionsnetzwerk der Simulationen von Aβ(16-23)-Peptiden mit EGCG. Hierbei werden nur die ersten 100 ns betrachtet, da danach in der Trajektorie keine weiteren Aggregationsprozesse pro Oligomer stattfinden. Die erste Zahl in den Knoten zeigt die EGCG- und die zweite die Aβ(16-23)-Anzahl an.

Hierbei wird ein Cutoff-Wert von 5 Å für die Assoziation und ein von 6 Å für die Dissoziation verwendet, um Molekülumlagerungen im Aggregat nicht als Übergang zu werten. Während der Aggregation bewegen sich die zusammengelagerten Moleküle ständig, bleiben dennoch meistens zusammen. Aus diesem Grund können die Moleküle den Abstand von 5 Å überschreiten, was jedoch kein Übergang in einen anderen Oligomerzustand ist. Deshalb wird ein Dissoziations-Cutoff von 6 Å gewählt.

Des Weiteren wurden die jeweiligen Übergänge und die Populationen für alle Simulationen desselben Systems aufsummiert. Die Anzahl der Simulationen ohne EGCG beträgt aufgrund der Kürze der Bachelorarbeitszeit nur drei. In den Simulationen ohne EGCG sind nach 100 ns die verschiedenen Oligomere etwa gleich stark populiert, während nach einer Simulationszeit von 500 ns der Tetramerzustand dominiert und gleichzeitig die Monomeranzahl reduziert ist. Die beiden mittleren Zustände gleichen sich an. Zudem gibt es innerhalb von 500 ns mehr Übergänge zwischen dem Dimer und dem Tetramer, wohingegen der Rest der Transitionen etwa gleich bleibt.

Mit dem Polyphenol ist das Transitionsnetzwerk wesentlich größer und komplizierter, da es sich nun um ein heterogenes System handelt. Dabei beschreibt die erste Zahl eines Zustands die EGCG-Anzahl und die zweite Anzahl an Aβ(16-23)-Fragmenten. In weniger als 100 ns besitzt der EGCG-Aβ(16-23)-Komplex mit jeweils vier Molekülen (4|4), die höchste Population von etwa 63,3%, während die anderen Zustände nicht einmal eine Population von 5% erreichen. Dies bedeutet, dass die Aggregation des Komplexes sehr schnell verläuft. Trotzdem bilden sich kleine Intermediate wie einzelne EGCG- (2|0) und Aβ-Dimere (0|2). Die dominanten Übergänge sind jene, wenn entweder Monomere oder Dimere an das Aggregat binden.

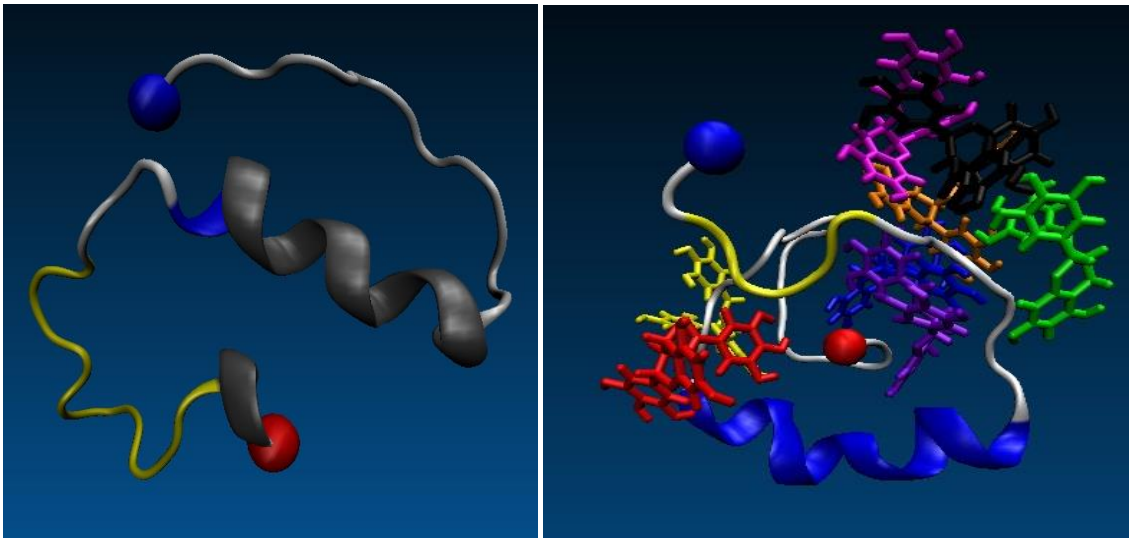
Am Anfang liegen die Moleküle einzeln vor, die entweder später ein homogenes oder heterogenes Dimer (2|0 und 0|2 oder 1|1) formen, wobei Homo-Dimere eher weniger auftreten bzw. schnell weiter aggregieren. Vom Zustand 1|1 verlaufen die Pfeile zum heterogenen Trimer (2|1 oder 1|2) oder direkt zum Hetero-Tetramer (2|2), wobei die Transition zum Zustand 1|2 eher gering ist. Dafür bildet sich bevorzugt vom Aggregat 1|2 der Zustand 1|3. Die absoluten Übergänge von 2|0 über die Zustände 2|1, 2|2 zu

2|3 sind etwa gleich stark ausgeprägt. Dabei binden hintereinander drei Aβ(16-23)-Fragmente an ein EGCG-Dimer. Zudem entsteht das heterogene Hexamer 3|3 aus den Zuständen 2|2 und 2|3 und geht dann in einem häufigen Übergang zum Oktamer 4|4 über, von dem sich Monomere, Dimere oder Trimere wieder abspalten. Daraus ergibt sich, dass sich Moleküle wieder lösen können, doch diese nähern sich an den Komplex sehr schnell wieder an. Selten bildet sich ein Aβ(16-23)-Dimer, an dem dann aber mindestens ein EGCG bindet. Die Zustände 2|4, 3|0, 3|1, 4|1 und 3|4 treten relativ selten auf, was darauf hindeutet, dass diese nur Übergangszustände von kurzer Lebensdauer darstellen.

4.5 Interaktion von Aβ(1-42) mit EGCG

In der Trajektorie nähern sich die acht EGCGs an das Aβ(1-42) entweder als Monomere oder als Oligomere an, wobei erst nach 110 ns die vollständige Assemblierung erfolgt ist. Um die Aggregation von EGCG mit Aβ zu analysieren, wird zunächst SASA der EGCG-Moleküle und des Aβ(1-42)-Peptids berechnet und gegen die Zeit aufgetragen, was in Abbildung 27 mit zusätzlicher Anfangsstruktur und einer Momentaufnahme der Simulation zu sehen ist.

(a)



(b)

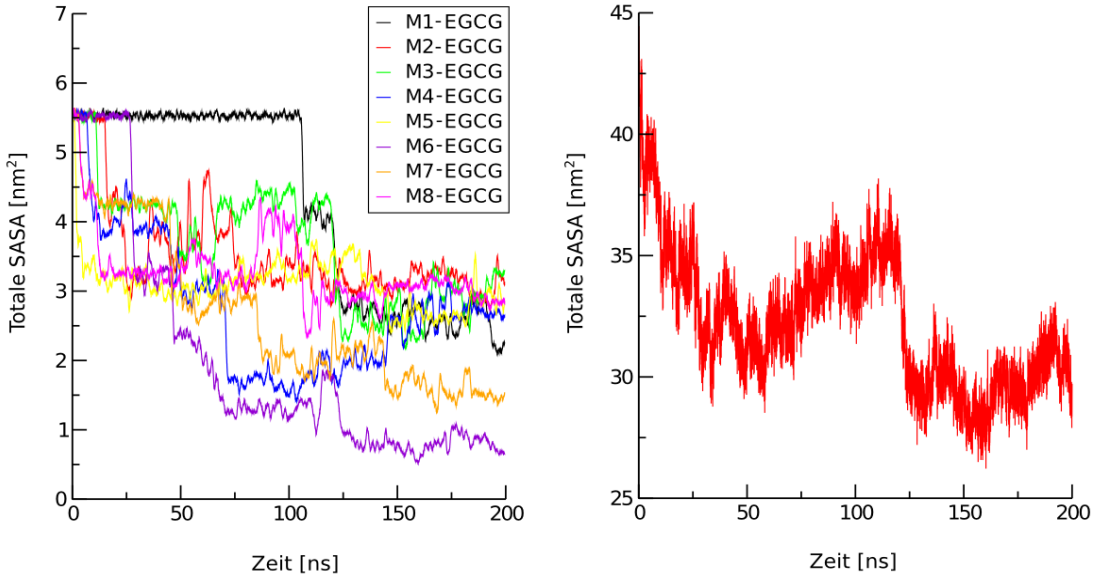


Abbildung 27: (a) Die Ausgangsstruktur von Aβ(1-40) (PDB-Code 2LFM) mit den zwei zusätzlichen C-terminalen Aminosäuren (links) und mit den aggregierten EGCGs während der Simulation (rechts). Die blaue Kugel zeigt den N-Terminus und die rote den C-Terminus an. (b) SASA der EGCG-Molekülen (links) und des Aβ(1-42)-Peptids (rechts).

Dabei bilden sich zunächst EGCG-Aggregate bis zum Trimerzustand und lagern sich anschließend an das Protein an. Das erste EGCG schließt die vollständige Aggregation nach circa 110 ns ab. Dies wird auch an SASA des Proteins und an dem Abstand zwischen dem Aβ(1-42) und den EGCG-Molekülen (Abb. 28) sichtbar. Des Weiteren steigt die Gesamtanzahl der Wasserstoffbrückenbindungen des Peptids mit EGCG bis auf 30, allerdings sinkt diese wieder. Das kann daran liegen, dass ein bis zwei EGCG-Moleküle stattdessen untereinander oder mit dem Wasser wechselwirken.

Um die Interaktion zwischen den Molekülen näher zu betrachten, wird eine Abstandsmatrix erstellt (Abb. 29), in der das Aβ(1-42)-Peptid in seine Aminosäuren aufgespalten wird und EGCG pro Molekül dargestellt ist. Anhand dieses Diagramms ist erkennbar, dass nicht alle EGCGs mit dem Aβ stark interagieren, sondern nur Nummer 2, 4, 5 sowie 6, welche die gesamte Sequenz des Peptids abdecken. Deshalb werden diese EGCG-Moleküle in ihre Atome zerlegt und der Abstand zu den Aminosäuren des

Aβ(1-42)-Peptids berechnet, um eine genauere Analyse der Wechselwirkung bezogen auf die Ringe von EGCG durchzuführen.

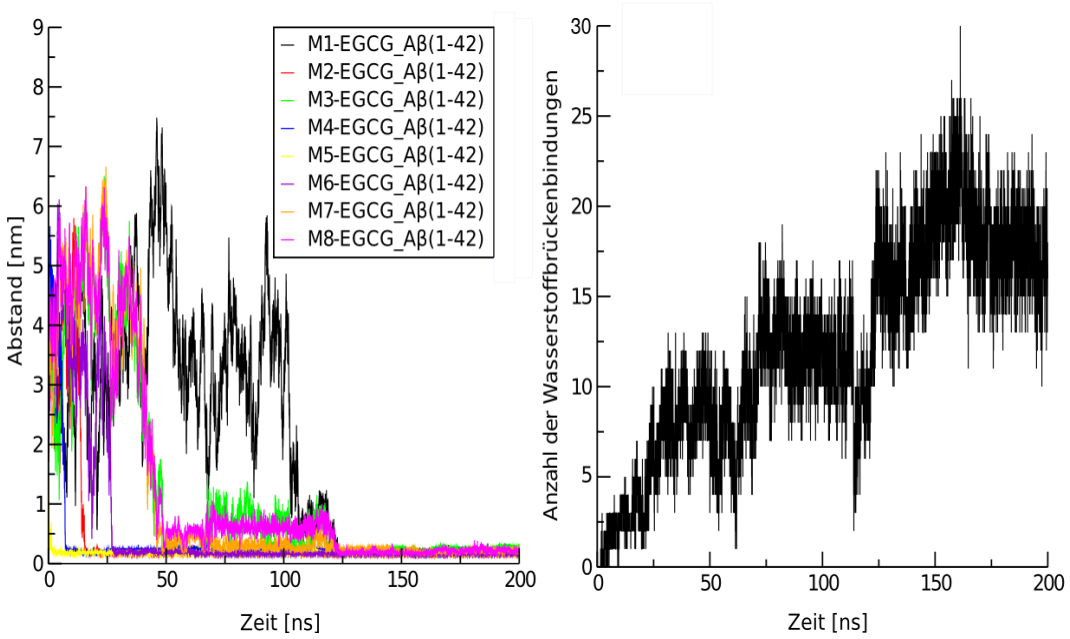


Abbildung 28: (a) Abstand zwischen den EGCGs und Aβ(1-42). (b) Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Aβ(1-42)-Peptid und den EGCG-Molekülen innerhalb der Simulation.

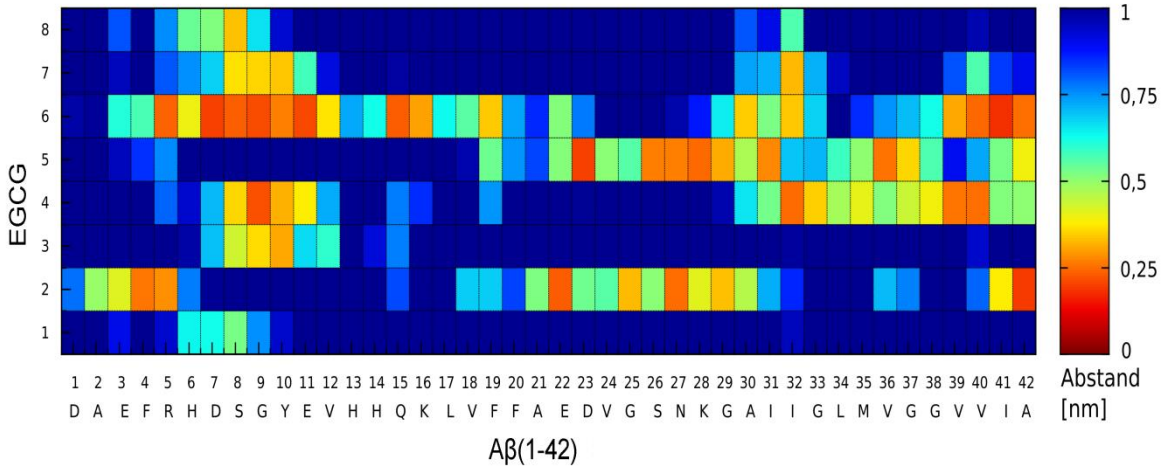
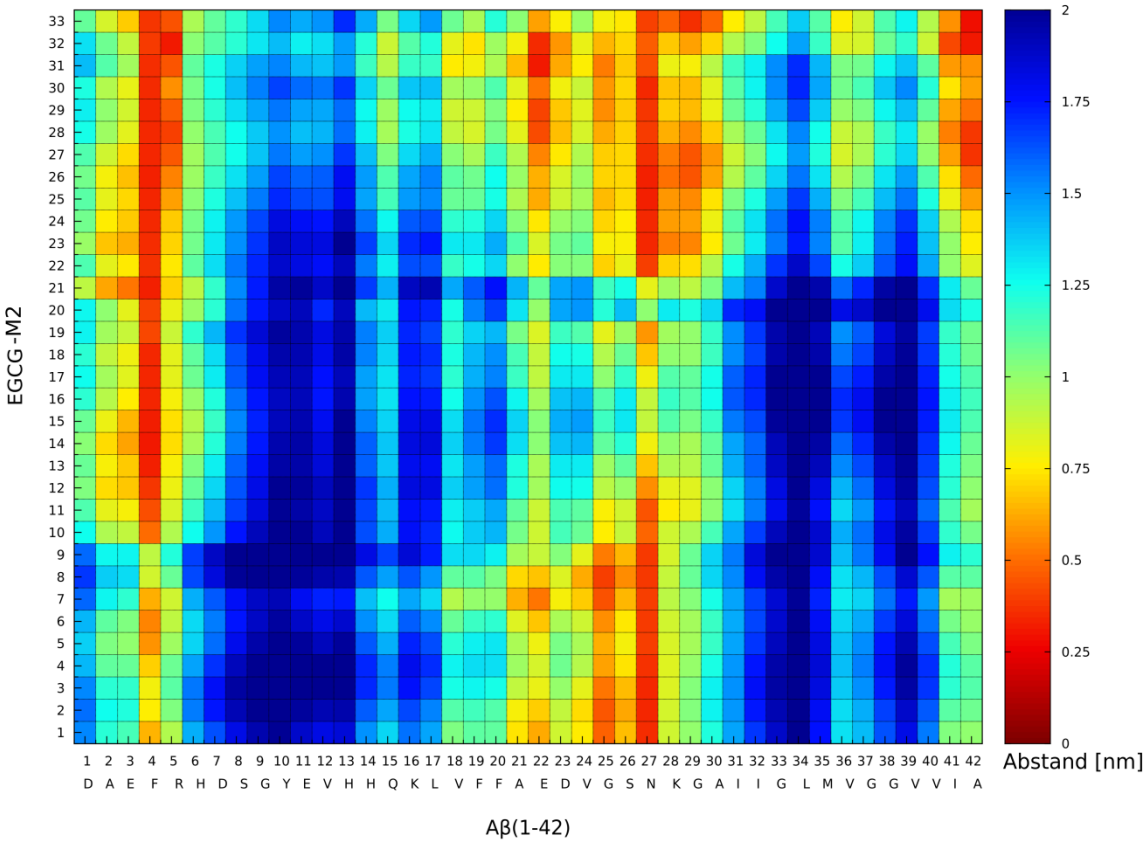


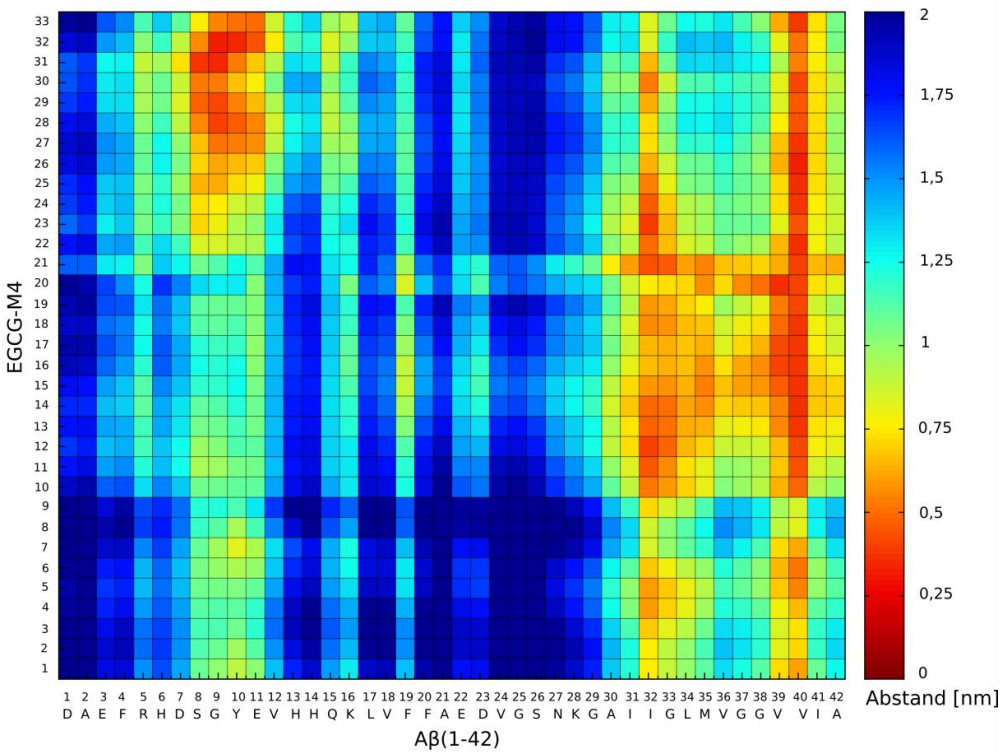
Abbildung 29: Abstandsmatrix zwischen den EGCG-Molekülen und dem Aβ(1-42)-Peptid. Die Abstände wurden ab 100 ns in der Simulation berechnet, nachdem alle EGCG-Moleküle an Aβ(1-42) angelagert sind.

Die resultierenden Abstandsmatrizen sind in Abbildung 30. Daraus ist ersichtlich, dass alle vier EGCG-Moleküle jeweils zu bestimmten Aminosäuren über 100 ns eine starke intermolekulare Interaktion mit einem Abstand von 3 bis 5 Å aufweisen. Beim EGCG interagieren alle drei Ringe mit dem Peptid teilweise an denselben Stellen. Dabei wechselwirkt vor allem Phe4 am N-Terminus mit dem 2. und 3. Ring, Glu22 und Asn27 in der Mitte mit dem 1. und 3. Ring sowie am C-Ende Ile41 und Ala42 mit Ring 3. Währenddessen ist das EGCG-Molekül 4 eher am C-Terminus lokalisiert, wobei sich der Ring mit der Ester-Verknüpfung im Bereich von Aminosäure 8 bis 11 befindet. Dafür liegt das Molekül 5 eher mittig zwischen Aminosäure 21 und 36, wohingegen sich Molekül 6 an den beiden Enden anlagert und stark interagiert. Das lässt darauf schließen, dass das Aβ(1-42)-Peptid zusammengefaltet ist und die Termini sehr nah liegen, was auch in Abbildung 27.a zu sehen ist. Zudem tritt auch die Ester-Gruppe in Kontakt mit den Aminosäuren, welche sowohl hydrophob als auch hydrophil sein können.

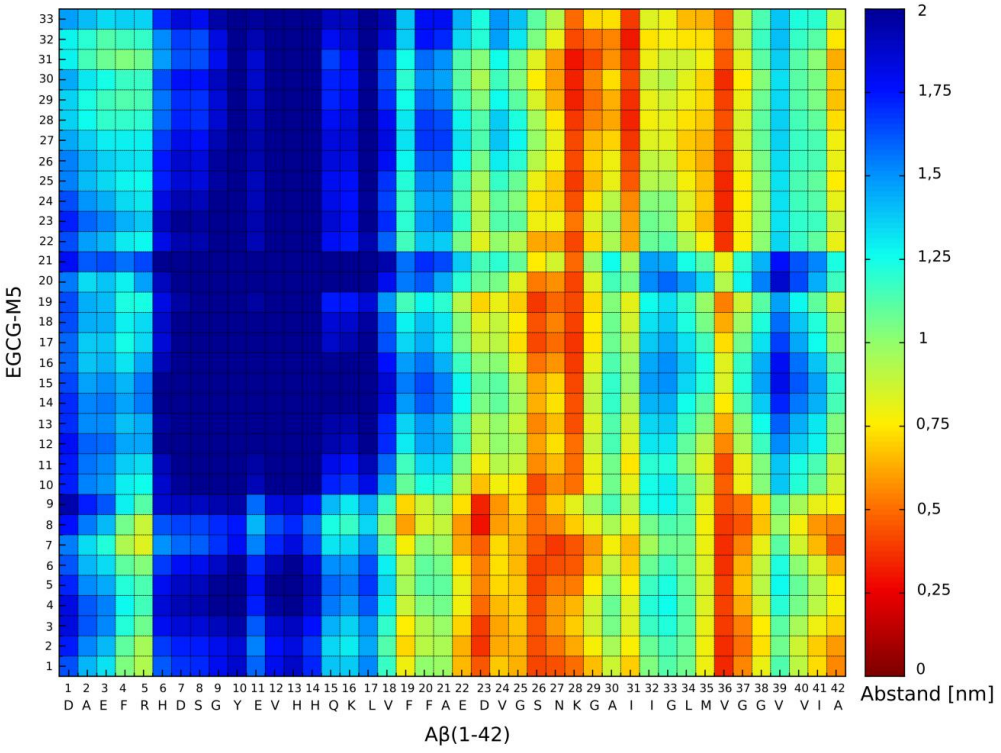
(a)



(b)


EGCG-M4
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33
D A E F R H D S G Y E V H H Q K L V F F A E D V G S N K G A I I G L M V G G V V I A
Aβ(1-42)
2
1,75
1,5
1,25
1
0,75
0,5
0,25
0
Abstand [nm]

(c)


EGCG-M5
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33
D A E F R H D S G Y E V H H Q K L V F F A E D V G S N K G A I I G L M V G G V V I A
Aβ(1-42)
2
1,75
1,5
1,25
1
0,75
0,5
0,25
0
Abstand [nm]

(d)

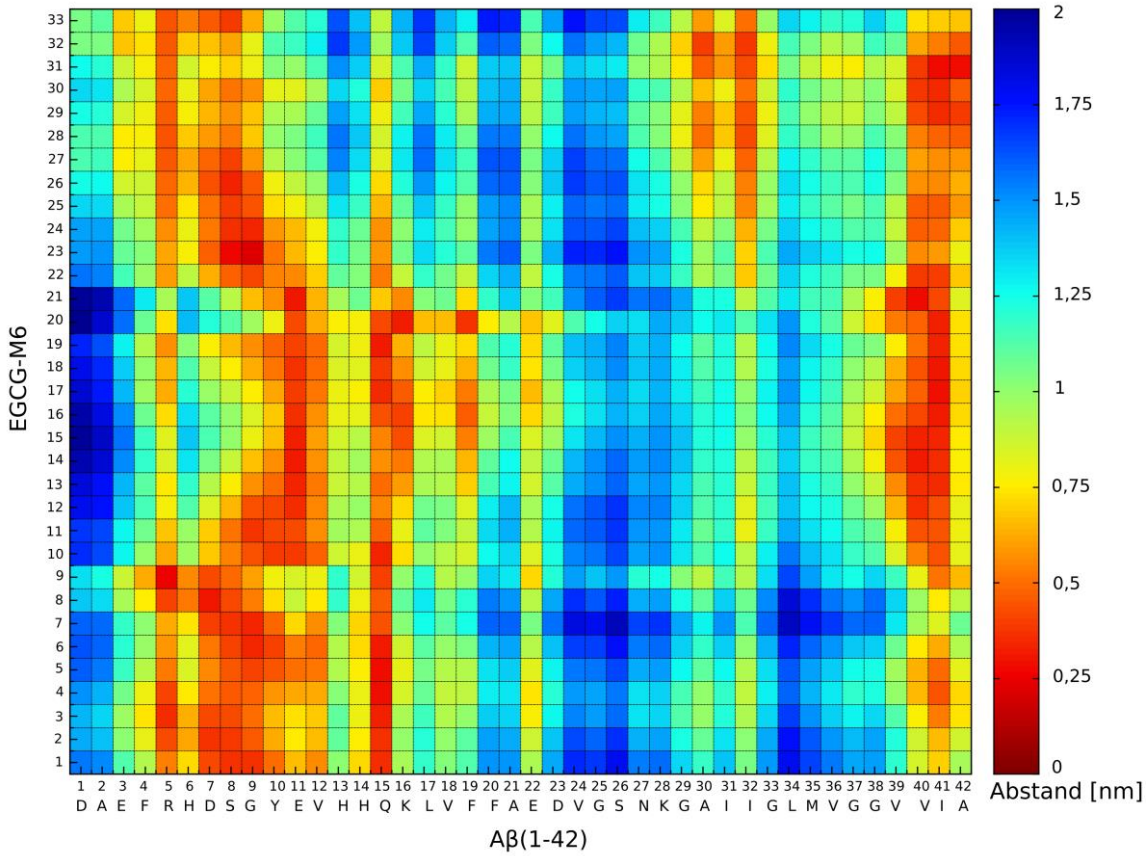


Abbildung 30: (a-d) Abstandsmatrizen zwischen den EGCG-Atomen des 2., 4., 5. und 6. Moleküls und dem Aβ(1-42)-Peptid ab 100 ns. Der Abstand ist bis zu 20 Å gezeigt. Die Ringe sind folgendermaßen angeordnet: Atome 1-9 gehören zum Ring ohne Ester-Verknüpfung, 10-21 zum Doppelring, 22-24 zur Ester-Gruppe und Ring mit Ester-Verknüpfung beinhaltet die Atome 25-33, wobei die Sauerstoff-Atome eines Rings jeweils den letzten Nummern zugewiesen sind (Abb. 11.d). Des Weiteren sind die Wasserstoff-Atome nicht dargestellt.

Abschließend wird die Sekundärstruktur des Peptids mithilfe des DSSP-Algorithmus während der Simulation bestimmt, wie in Abbildung 31 dargestellt ist. Trotz Anlagerung von EGCG bilden sich in der Nähe des C-Terminus zwischen Aminosäure 31 und 32 sowie 35 und 36 innerhalb von 30 ns β-Faltblätter, welche sich aber nach 100 ns wieder auflösen. In diesem Zeitraum bindet das letzte EGCG-Molekül an Aβ(1-42), aber nicht an dieser Stelle. Dort interagieren laut den Abstandsmatrizen M4 und M5 mit

dem Protein für 100 ns lang ziemlich stark. Zudem entstehen während der Simulation mehrmalig im mittleren Bereich von Aβ(1-42) zwei bis drei α-Helices im Bereich von Aminosäuren 13 bis 25. Das liegt an der Anfangsstruktur, die auch bereits diese Helices enthält.

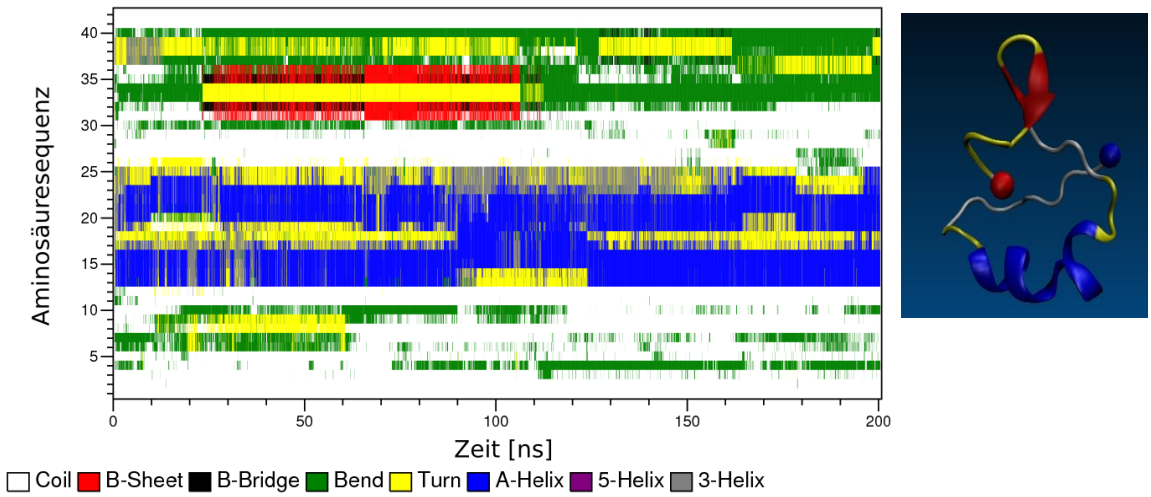


Abbildung 31: Sekundärstruktur von Aβ(1-42) während der Simulation mit EGCG-Molekülen und eine Momentaufnahme des Peptids bei 70 ns mit einem β-Faltblatt.

4.6 Diskussion

In den Simulationen mit nur EGCG reicht eine Konzentration von 100 mM für die vollständige Aggregation nach wenigen Nanosekunden aus. Dabei ist es unerheblich, welcher Ladungssatz für die EGCG-Moleküle verwendet wird. Bei 10 mM erfolgte die Anlagerung bis zum Hexamer innerhalb von 50 ns und ist somit nicht komplett. Wenn die Simulation länger gelaufen wäre, wäre wahrscheinlich auch die vollständige Aggregation eingetreten. Titrationsexperimente haben gezeigt, dass EGCG nur bis zu einer Konzentration von 1 mM zu 98% als Monomer vorliegt[47]. Bei der Aggregation von EGCG spielen π-Stapelwechselwirkungen und nicht stabile Wasserstoffbrückenbindungen eine wichtige Rolle, was in Abbildung 9 und Abbildung 10 erkennbar ist. In den Transitionsnetzwerke (Abb. 24) ist der stärkste Übergang meist vom Monomer- zum Dimerzustand zu sehen, allerdings bilden sich zuerst Trimere und darüber dann höhere Oli-

gomere. Die Aggregation erfolgt bevorzugt über die Anlagerung von entweder Monomere oder Dimere anlagern.

Bei der Interaktion von EGCG und den Aβ-Fragmenten hat sich gezeigt, dass die ausgewählten Peptide mit EGCG im 1:1-Verhältnis zwar wechselwirken, aber das Polyphenol nur mit höchstens einer Aminosäure in Kontakt tritt (Abb. 14). Das liegt daran, dass die Wassermoleküle ebenfalls mit beiden Moleküle durch Wasserstoffbrückenbindungen wechselwirken. Im Gegensatz dazu treten mehr Interaktionen im 4:4-Verhältnis auf, da dort eine Assemblierung von mehreren Molekülen erfolgt und dadurch das Wasser innerhalb des Komplexes nicht agieren kann. Dabei verdrängt das EGCG das Wasser von der Oberfläche der Peptide, was an Aβ(1-42) durch Liu et al. nachgewiesen wurde[48]. Eine Ausnahme stellt die Auswahl von Aβ(11-15)- und EGCG-Molekülen im 4:4-Verhältnis im Vergleich zum 1:1-System dar, da es zu keiner stärkeren Interaktion zwischen EGCG und diesem Fragment führt (Abb. 18). Das Aβ(1-42)-Peptid wechselwirkt mit einem der EGCG-Moleküle in dem Bereich 11-15, wobei His13 und 14 leicht sowie Tyr10 relativ stark beteiligt sind. Diese drei Aminosäuren spielen grundsätzlich eine große Rolle, da sie Metallionen binden und an der Erzeugung von ROS beteiligt sind, die den Neuronen schaden können[47], wenn sie nicht abgefangen werden. Des Weiteren finden bevorzugt Wechselwirkungen von EGCG mit den Aminosäuren Phe4, Arg5, Gln15, Glu22, Asp23, Lys28, Gly29, Ala30, Ile31, Ile32, Val36 sowie Ile 41 von Aβ(1-42) statt, was in Abbildung 30 zu sehen ist. Diese tauchen zum Teil auch bei den Fragmenten auf (Abb. 18). In einer anderen Studie wurde gefunden, dass vor allem die hydrophoben Seitenketten von Phe4, Phe20, Met35 und Ile41 und das Peptidrückgrat von Gly29 und Lys28 nichtpolare Wechselwirkungen mit EGCG eingehen, wohingegen Phe20, Gly29, Gly37 sowie andere hydrophobe Aminosäuren in ihrem Peptidrückgrat starke Wasserstoffbrückenbindungen mit EGCG aufweisen [48].

Beim Transitionsnetzwerk von Aβ(16-23) ohne EGCG zeigt sich deutlich, dass sich bevorzugt Dimere bilden und diese sich hauptsächlich zu Tetrameren zusammenlagern (Abb. 25). Dieser Verlauf der Aggregation wurde ebenfalls in Simulationen von sechs Aβ(16-22)-Peptiden anhand von Transitionsnetzwerken von Barz et al. gezeigt[41]. Dabei treten VdW- und π-Wechselwirkungen auf, insbesondere bei den Phenylalaninen

zwischen zwei Molekülen. In Anwesenheit von EGCG ist die Aggregation der Aβ(16-23)-Peptide wesentlich komplexer. Allerdings ist erkennbar, dass sich hauptsächlich Monomere sowie Dimere und seltener Trimere an dem vorhandenen EGCG- Aβ-Komplex anlagern (Abb. 26). Zudem lief die Aggregation mit EGCG innerhalb von 100 ns ab, sodass in den weiteren 400 ns, abgesehen von der Änderung der Sekundärstrukturen in den Peptiden, nicht passiert ist.

Weiterhin hat sich anhand der DSSP-Auftragungen gezeigt, dass sich in Aβ(16-23) in Anwesenheit von EGCG keine β-Faltblätter und kaum β-Bridges ausbilden. In Abwesenheit von EGCG können β-Faltblätter in der Mitte des Fragments entstehen (Abb. 21 und Abb. 23). Das große Peptid Aβ(1-42) weist zwar zeitweise an anderen Stellen von Ile31-Ile32 sowie Met35-Val36 β-Faltblätter auf, jedoch verschwinden diese nach der Anlagerung des letzten EGCG-Moleküls (Abb. 31). In den letzten 100 ns besitzt jeweils ein EGCG-Molekül einen Kontakt mit diesen vier Aminosäuren (Abb. 30), sodass das Peptidrückgrat mit dem EGCG vermutlich mehr Wasserstoffbrückenbindungen ausbildet als im Protein selbst. Mutmaßlich wandelt sich während der Aβ-Aggregation der Teil der α-Helices in β-Faltblätter im Aβ(1-42)-Peptid um und durchläuft somit einen konformativen Übergang, den EGCG offensichtlich verhindern kann. Dabei begünstigt EGCG die Coil- und Helices-Strukturen[48][49], was am Aβ(16-23)-Peptid erkennbar ist (Abb. 21 und Abb. 23). Durch NMR-Experimente wurde gezeigt, dass sich in der Nähe des C-Terminus zwischen Aminosäuren 29 und 36 bei Aβ(1-40) β-Faltblätter ausbilden können, während der N-Terminus hauptsächlich unstrukturiert ist[47]. Dies tritt auch bei der Simulation von Aβ(1-42) auf (Abb. 31).

5. Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass EGCG mit dem Aβ-Peptid in Wechselwirkung tritt. Dabei spielen sowohl hydrophobe wie π-Stapelwechselwirkungen als auch hydrophile Interaktionen durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen diesen beiden Molekülen eine Rolle. Aufgrund der Bindung von EGCG bilden sich keine β-Faltblätter im Aβ(16-23)-Peptid aus, was ein Hinweis auf die Inhibition der Amyloid-Aggregation von Aβ ist. Im Gegensatz dazu entstehen beim gesamten Protein zeitweise β-Faltblätter in der Nähe des C-Terminus während der Anlagerung der EGCG-Moleküle, allerdings werden diese nach 120 ns wieder aufgelöst, als die Aggregation von EGCG am Aβ(1-42)-Peptid vollständig abgelaufen ist. Die Wechselwirkung von EGCG-Molekülen basiert hauptsächlich auf aromatischen Interaktionen in Form von Stapelung der Phenylringe und der Ausbildung von wechselhaften Wasserstoffbrückenbindungen. In einen hoher Konzentration von 100 mM aggregiert das EGCG vollständig innerhalb von 50 ns, während bei 10 mM keine komplette Zusammenlagerung der acht EGCG-Moleküle erfolgt.

EGCG besitzt wahrscheinlich das Potential, die Aβ-Assemblierung in β-Faltblätter aufzuhalten und zu verhindern, was in dieser und vorherigen Arbeiten sowohl experimentell als auch durch Simulationen nachgewiesen wurde. Die nächsten Schritte könnten mithilfe von MD-Simulationen sein, größere Systeme zu analysieren, zum Beispiel mindestens zwei Aβ(1-42)-Peptide mit verschiedenen Konzentrationen von EGCG, um die Interaktionen von Aβ und EGCG noch genauer beobachten zu können. Für eine größere, statistische Analyse des Aggregationsverhaltens von EGCG mit Aβ könnten mehrere kürzere Trajektorien erzeugt und davon Transitionsnetzwerke erstellt werden. Zukünftig wäre die Aggregation von Aβ mit Membranen in Anwesenheit von EGCG interessant, um die Zerstörung der Membranen von Neuronen durch Aβ und die mögliche Inhibition dieses Vorgangs durch EGCG zu untersuchen. Zudem sollte die Antioxidans-Fähigkeit von EGCG im Zusammenspiel mit Metallionen und Aβ mithilfe von QM/MM-Simulationen untersucht werden, inwiefern EGCG die Bildung von ROS bzw. Oxidierung der Membran verhindern und damit vielleicht auch die Neuronen vor dem Zelltod schützen könnte.

6. Literaturverzeichnis

[1] **World Alzheimer Report 2013**. August 2014. http://www.alz.co.uk/.

[2] **Gravitz, L.** Drugs: A tangled web of targets. *Nature.* Volume 475, 2011, S. 9-11.

[3] **G. Yamin, K. Ono, M. Inayathullah, D. B. Teplow.** Amyloid β -Protein Assembly as a Therapeutic Target of Alzheimer's Disease. *Curr. Pharm. Des.* Volume 14, 2008, Issue 14, S. 3231-3246.

[4] **B. Cheng, H. Gong, H. Xiao, R. B. Petersen, L. Zheng, K. Huang.** Inhibiting toxic aggregation of amyloidogenic proteins: A therapeutic strategy for protein misfolding diseases. *Biochimica et Biophysica Acta.* Volume 1830, 2013, Issue 10, S. 4860–4871.

[5] **Selkoe, D. J.** Soluble oligomers of the amyloid β-protein impair synaptic plasticity and behavior. *Behavioural Brain Research.* Volume 192, Issue 1, S. 106-113.

[6] **D. G. Smith, R. Cappai, K. J. Barnhama.** The redox chemistry of the Alzheimer's disease amyloid β peptide. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes.* Volume 1768, 2007, Issue 8, S. 1976–1990.

[7] **Rauk, A.** The chemistry of Alzheimer's disease. *Chem. Soc. Rev.* Voulume 38, 2009, Issue 9, S. 2698-2715.

[8] **S. Sinha, Z. Du, P. Maiti, F. Klärner, T. Schrader, C. Wang, G. Bitan.** Comparison of Three Amyloid Assembly Inhibitors: The Sugar scyllo-Inositol, the Polyphenol Epigallocatechin Gallate, and the Molecular Tweezer CLR01. *ACS Chem. Neurosci.* Volume 3, 2012, Issue 6, S. 451–458.

[9] **C. Priller, T. Bauer , G. Mitteregger ,B. Krebs , H. A. Kretzschmar, J. Herms.** Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein. *The Journal of Neuroscience.* Volume 26(27), 2006, S. 7212-7221.

[10] **G. Thinakaran, E. H. Koo.** Amyloid Precursor Protein Trafficking, Processing, and Function. *The Journal of Biological Chemistry.* Volume 283, 2008, Issue 44.

[11] **O. M. A. El-Agnaf, D. S. Mahil, B. P. Patel, B. M. Austen.** Oligomerization and Toxicity of β-Amyloid-42 Implicated in Alzheimer's Disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* Volume 273, 2000, Issue 3, S. 1003-1007.

[12] **C. Patterson MD, J. W. Feightner, A. Garcia, R. Hsiung, C. MacKnight, A. D. Sadovnick.** Diagnosis and treatment of dementia: 1. Risk assessment and primary prevention of Alzheimer disease. *CMAJ.* Volume 178, 2008, Issue 5, S. 548-556.

[13] **E. Ferreiro, I. Baldeiras, I. L. Ferreira, R. O. Costa, A. C. Rego, C. F. Pereira, C. R. Oliveira.** Mitochondrial- and Endoplasmic Reticulum-Associated Oxidative Stress in Alzheimer's Disease: From Pathogenesis to Biomarkers. *International Journal of Cell Biology.* Volume 2012, 2012.

[14] **N. Dragicevic, A. Smith, X. Lin, F. Yuan, N. Copes, V. Delic, J. Tan, C. Cao, R. D. Shytle,.** Green Tea Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG) and Other Flavonoids Reduce Alzheimer's Amyloid-Induced Mitochondrial Dysfunction. *Journal of Alzheimer's Disease.* Volume 26, 2011, Issue 3, S. 507{521.

[15] **P. Cao, D. P. Raleigh.** Analysis of the Inhibition and Remodeling of Islet Amyloid Polypeptide Amyloid Fibers by Flavanols. *Biochemistry.* Volume 51, 2012, Issue 13, S. 2670–2683.

[16] **F. L. Palhano, J. Lee, N. P. Grimster, J. W. Kelly.** Toward the Molecular Mechanism(s) by Which EGCG Treatment Remodels Mature Amyloid Fibrils. *J. Am. Chem. Soc.* Volume 135, 2013, Issue 20, S. 7503–7510.

[17] **N. Jia, K. Han, J. J. Kong, X. M. Zhang, S. Sha, G. R. Ren, Y. P. Cao,.** (−)-Epigallocatechin-3-gallate alleviates spatial memory impairment in APP/PS1 mice by restoring IRS-1 signaling defects in the hippocampus. *Molecular and Cellular Biochemistry.* Volume 380, 2013, Issue 1-2, S. 211-218.

[18] August 2014. http://clinicaltrials.gov/show/NCT00951834.

[19] **S. Pronk, S. Páll, R. Schulz, P. Larsson, P. Bjelkmar, R. Apostolov, M. R. Shirts, J. C. Smith, P. M. Kasson, D. van der Spoel, B. Hess, E.Lindahl.** GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. *Bioinformatics.* Volume 29, 2013, Issue 7, S. 845-854.

[20] **Schlick, T.** *Molecular Modeling and Simulation: An Interdisciplinary Guide.* 2. Auflage. s.l. : Springer, 2010. S. 432-436. ISBN 978-1-14419-6351-2.

[21] **D. Frenkel, B. Smit.** *Understanding Molecular Simulation-From Algorithms to Applications.* 2. Auflage. London : Computational Science Series-volume 1, 2002. S. 69-75. ISBN 0-12-267351-4.

[22] **B. Hess, D. van der Spoel, E. Lindahl.** GROMACS USER MANUAL-Version 4.6.5. August 2014. ftp://ftp.gromacs.org/pub/manual/manual-4.6.5.pdf.

[23] **PumMa-Parallel Utility for Modeling of Molecular Aggregation.** August 2014. http://cbio.bmt.tue.nl/pumma/index.php/Theory/Potentials.

[24] **Jr, A. D. Mackerell.** Empirical force fields for biological macromolecules: Overview and issues. *Journal of Computational Chemistry.* Volume 25, 2004, Issue 13, S. 1584–1604.

[25] **Brueschweiler, D. W. Li and R.** NMR-Based Protein Potentials. *Angewandte Chemie.* Volume 122, 2010, Issue 38, S. 6930–6932.

[26] **K. A. Beauchamp, Y.-S. Lin, R. Das, V. S. Pande.** Are Protein Force Fields Getting Better? A Systematic Benchmark on 524 Diverse NMR Measurements. *J. Chem. Theory Comput.* Volume 8 (4), 2012, S. 1409–1414.

[27] **I. M. Robertson, Monica X. Li, D. Sykes.** Solution Structure of Human Cardiac Troponin C in Complex with the Green Tea Polyphenol, (−)-Epigallocatechin 3-Gallate. *The Journal of Biological Chemistry.* Volume 284, 2009, Issue 34, S. 23012-23023.

[28] **A. W. Sousa da Silva, W. F. Vranken.** ACPYPE - AnteChamber PYthon Parser interfacE. *BMC Research Notes.* Volume 5:367, 2012.

[29] **J. Wang, W. Wang, P. A. Kollman, D. A. Case.** Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanical calculations. *Journal of Molecular Graphics and Modelling.* Volume 25, 2006, Issue 2, S. 247–260.

[30] **J. M. Wang, R. M. Wolf, J. W. Caldwell, P. A. Kollman, D. A. Case.** Development and testing of a general amber force field. *Journal of Computational Chemistry.* Volume 25, 2004, Issue 9, S. 1157–1174.

[31] **A. Jakalian, B. L. Bush, D. B. Jack, C. I. Bayly.** Fast, efficient generation of high-quality atomic charges. AM1-BCC model: I. Method. *Journal of Computational Chemistry.* Volume 21, 2000, Issue 2, S. 132–146.

[32] **A. Jakalian, D. B. Jack, C. I. Bayly.** Fast, efficient generation of high-quality atomic charges. AM1-BCC model: II. Parameterization and validation. *Journal of Computational Chemistry.* Volume 23, 2002, Issue 16, S. 1623–1641.

[33] **C. I. Bayly, P. Cieplak, W. D. Cornell, P. A. Kollman.** A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges: the RESP model. *The Journal of Physical Chemistry.* Volume 97, 1993, Issue 40, S. 10269–10280.

[34] **W. D. Comell, P. Cieplak, C. I. Bayly, P. A. Kollman.** Application of RESP Charges To Calculate Conformational Energies, Hydrogen Bond Energies, and Free Energies of Solvation. *J. Am. Chem. Soc.* Volume 115, 1993, Issue 21, S. 9620–9631.

[35] **M. Krone, K. Bidmon,T. Ertl.** Interactive Visualization of Molecular Surface Dynamics. *Visualization and Computer Graphics, IEEE Transactions on.* Volume 15, 2009, Issue 6, S. 1391 - 1398 .

[36] **Gromacs.** August 2014. http://manual.gromacs.org/programs/gmx-sasa.html.

[37] **Gromacs**. Juli 2014. http://manual.gromacs.org/programs/gmx-hbond.html.

[38] **CMBI-DSSP.** August 2014. http://swift.cmbi.ru.nl/gv/dssp/.

[39] **W. Kabsch, C. Sander.** Dictionary of Protein Secondary Structure: Pattern Recognition of Hydrogen-Bondedand Geometrical Features. *Biopolymers.* Volume 22, 1983, Issue 12, S. 2577-2637.

[40] **visone.** August 2014. http://visone.info/html/about.html.

[41] **B. Barz, D. J. Wales, B. Strodel.** A Kinetic Approach to the Sequence−Aggregation Relationship in Disease-Related Protein Assembly. *J. Phys. Chem. B.* 118, 2014, S. 1003–1011.

[42] **S. Vivekanandan, J.R. Brender, S.Y. Lee, A. Ramamoorthy.** A partially folded structure of amyloid-beta(1–40) in an aqueous environment. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* Volume 411, 2011, Issue 2, S. 312–316.

[43] **Schlick, T.** *Molecular Modeling and Simulation: An Interdisciplinary Guide.* 2. Auflage. s.l. : Springer, 2010. S. 359-361. ISBN 978-1-14419-6351-2.

[44] **Gromacs.** August 2014. http://www.gromacs.org/Documentation/How-tos/Position_Restraints.

[45] **VMD.** Juli 2014. http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/.

[46] **M. O. Sinnokrot, C. D. Sherrill.** High-Accuracy Quantum Mechanical Studies of π−π Interactions in Benzene Dimers. *J. Phys. Chem. A.* Volume 110 (37), 2006, S. 10656–10668.

[47] **J. M. Lopez del Amo, U. Fink, M. Dasari, G. Grelle, E. E. Wanker, J. Bieschke, B. Reif.** Structural Properties of EGCG-Induced, Nontoxic Alzheimer's Disease Aβ Oligomers. *J. Mol. Biol.* Volume 421, 2012, Issue 4-5, S. 517–524.

[48] **F.-F. Liu, X.-Y. Dong, L. He, A. P. J. Middelberg, Y. Sun.** Molecular Insight into Conformational Transition of Amyloid β-Peptide 42 Inhibited by (−)-Epigallocatechin-3-gallate Probed by Molecular Simulations. *J. Phys. Chem. B.* Volume 115 (41), 2011, S. 11879–11887.

[49] **T. Zhang, J. Zhang, P. Derreumaux, Y. Mu.** Molecular Mechanism of the Inhibition of EGCG on the Alzheimer Aβ1–42 Dimer. *J. Phys. Chem. B.* 117 (15), 2013, S. 3993–4002.

7. Anhang

7.1 Input-Dateien

In diesem Abschnitt sind die Programme für die Energieminimierung in Tabelle 5, Äquilibrierung in Tabelle 6 und MD-Simulationsstart in Tabelle 7 aufgelistet. Für die Energieminimierung wurde die Einstellung *nstep* ab und zu erhöht, um diese abzuschließen.

Tabelle 5: Einstellungen der Energieminimierung.

define	=	-DFLEXIBLE
constraints	=	none
integrator	=	steep
dt	=	0.002 ps
nsteps	=	20000
nstxout	=	50
nstlist	=	10
ns_type	=	grid
rlist	=	1.0
coulombtype	=	PME
rcoulomb	=	1.0
vdwtype	=	cut-off
rvdw	=	1.4
optimize_fft	=	yes
emtol	=	100.0
emstep	=	0.01

Tabelle 6: Parameter für die Äquilibrierung.

define	=	-DPOSRES
integrator	=	md
comm-mode	=	Linear
dt	=	0.002 ps
nsteps	=	250000; total 500 ns
nstcomm	=	100
nstxout	=	2500; collect data every 1 ps
nstvout	=	2500
nstfout	=	0
nstlog	=	500
nstenergy	=	100
cutoff-scheme	=	Verlet
nstlist	=	20
ns_type	=	grid
rlist	=	1.2
coulombtype	=	PME
rcoulomb	=	1.2
pme_order	=	6
vdwtype	=	cut-off
rvdw	=	1.2
DispCorr	=	EnerPres
ewald_rtol	=	1e-5
optimize_fft	=	yes
fourierspacing	=	0.10
Tcoupl	=	v-rescale
tc-grps	=	water non-water
tau_t	=	0.1 0.1
ref_t	=	300 300
Pcoupl	=	berendsen
Pcoupltype	=	isotropic
tau_p	=	1.0
compressibility	=	4.5e-5
ref_p	=	1.0
refcoord-scaling	=	all

gen_vel	=	yes
gen_temp	=	300.0
gen_seed	=	-1
constraint-algorithm	=	LINCS
lincs-order	=	4
lincs-iter	=	2
lincs-warnangle	=	30
continuation	=	no
constraints	=	all-bonds

In Tabelle 7 ist ein Beispiel für eine MD-Simulation dargestellt. Meistens wurden die Parameter *nstep*, *nstxout*, *nstvout* und *nstlog* verändert, welche die Simulationslänge (nstep), die Anzahl der Frames (nstxout, nstvout) und Größe der der Output-Dateien (*nstlog*) beeinflusst.

Tabelle 7: Beispiel der Input-Datei für eine MD-Simulation.

integrator	=	md
comm-mode	=	Linear
dt	=	0.002 ps
nsteps	=	100000000; total 200 ns
nstcomm	=	100
nstxout	=	2500; collect data every 20 ps
nstvout	=	10000
nstfout	=	0
nstlog	=	10000
nstenergy	=	10000
cutoff-scheme	=	Verlet
nstlist	=	20
ns_type	=	grid
rlist	=	1.2
coulombtype	=	PME
rcoulomb	=	1.2

pme_order	=	6
vdwtype	=	cut-off
rvdw	=	1.2
DispCorr	=	EnerPres
ewald_rtol	=	1e-5
optimize_fft	=	yes
fourierspacing	=	0.10
Tcoupl	=	nose-hoover
tc-grps	=	water non-water
tau_t	=	1.0 1.0
ref_t	=	300 300
Pcoupl	=	Parrinello-Rahman
Pcoupltype	=	isotropic
tau_p	=	1.0
compressibility	=	4.5e-5
ref_p	=	1.0
refcoord-scaling	=	all
gen_vel	=	no
gen_temp	=	300.0
gen_seed	=	-1
constraint-algorithm	=	LINCS
lincs-order	=	4
lincs-iter	=	2
lincs-warnangle	=	30
continuation	=	yes
constraints	=	all-bonds

7.2 Abstandsdiagramme bestimmter Systeme

Im Folgenden werden die Diagramme für den Abstand aufgeführt, um zusätzliche Informationen über die großen Trajektorien zu liefern. In Abbildung 32 und Abbildung 33 sind die Abstände zwischen den EGCG-Molekülen bei 10 mM und 100 mM EGCG dargestellt. Anschließend folgen die Systeme mit den Aβ-Fragmenten und EGCG im 4:4-Verhältnis (Abb. 34 bis Abb. 36).

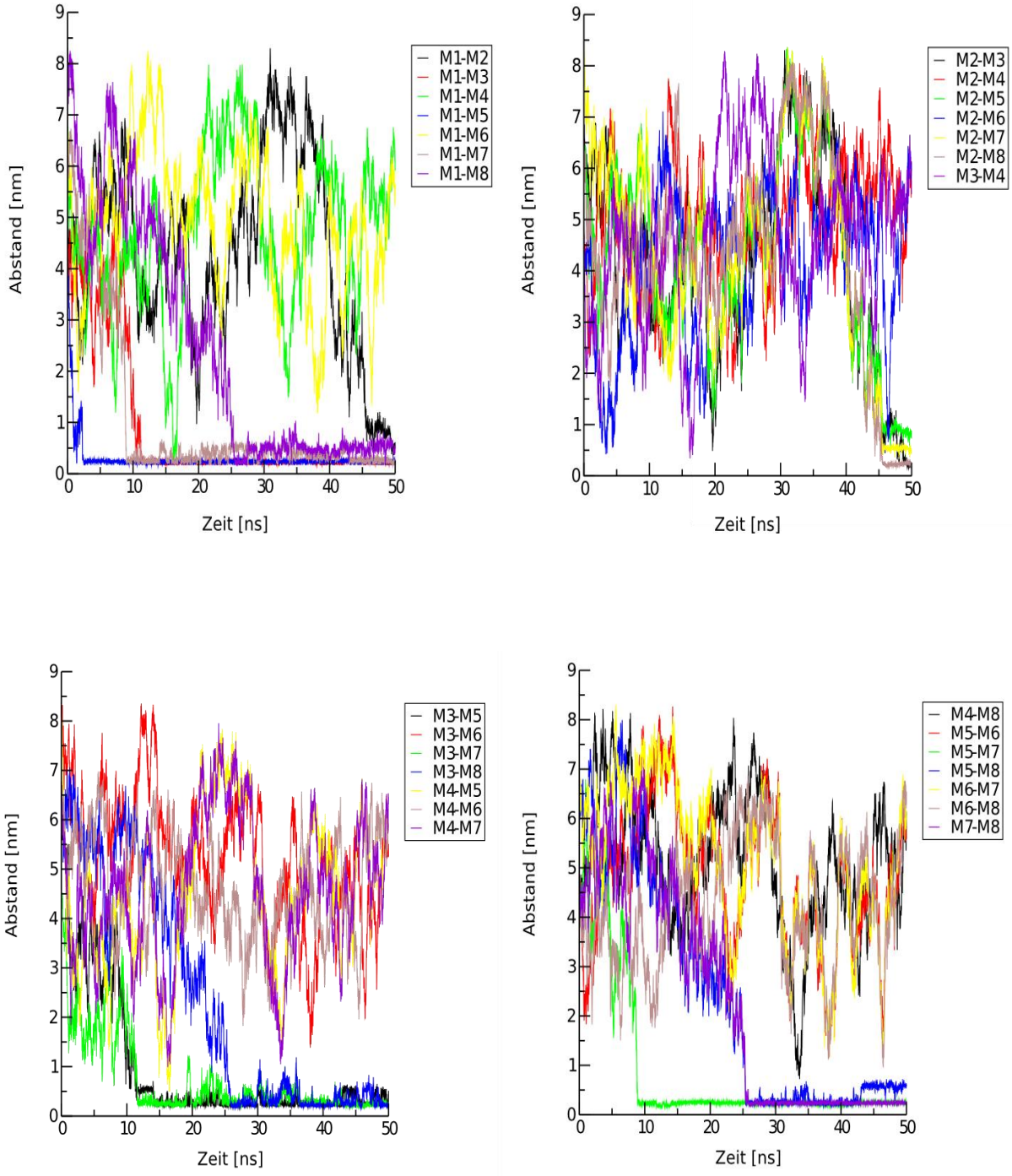


Abbildung 32: Mindestabstände zwischen den acht Molekülen in der 10 mM-EGCG-Simulation.

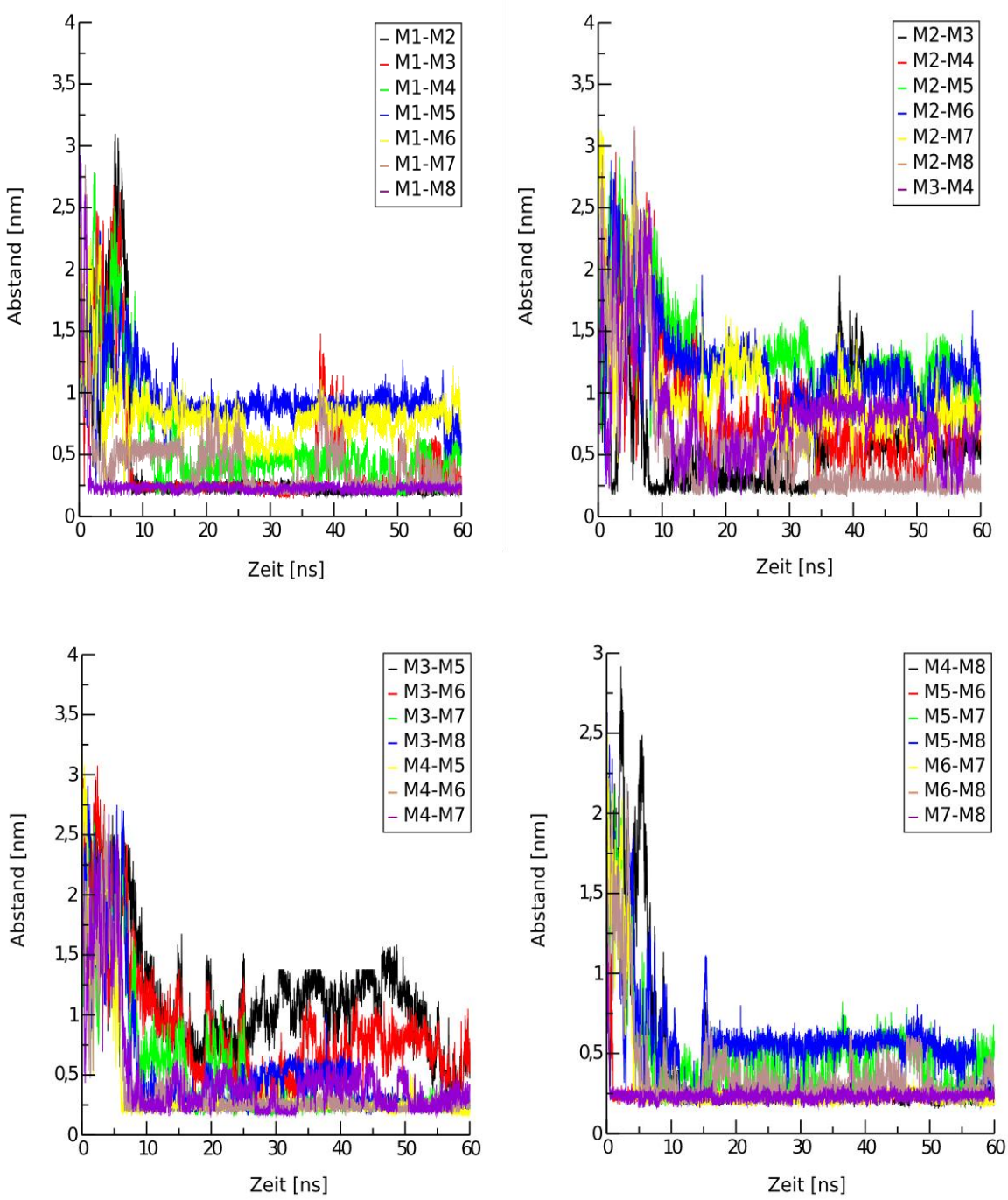


Abbildung 33: Der Verlauf der Trajektorie von 100 mM EGCG mithilfe des Abstands zwischen den acht EGCG-Molekülen.

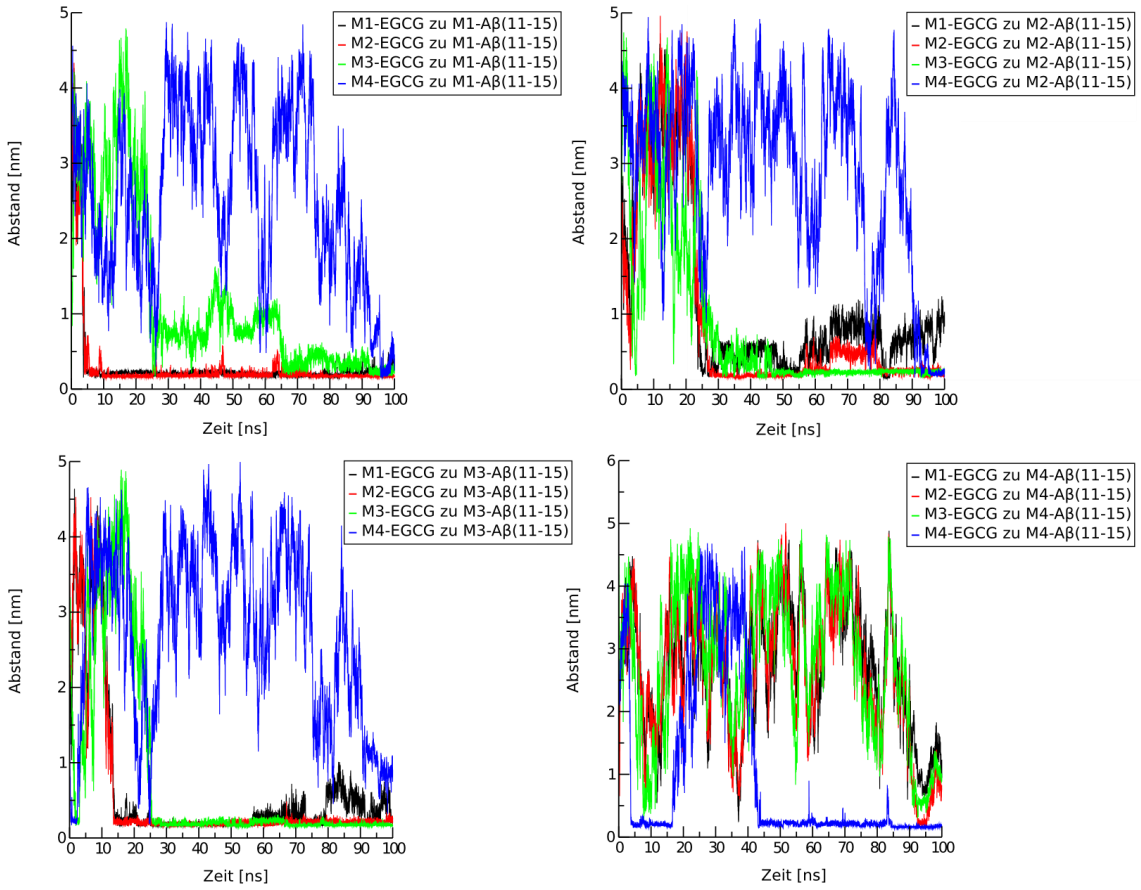
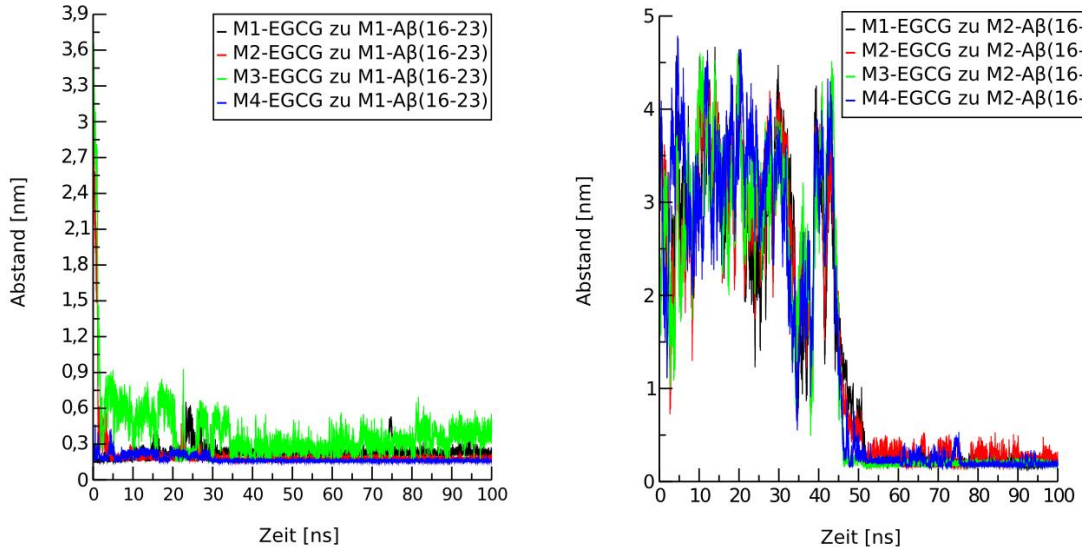


Abbildung 34: Abstände zwischen EGCG und den Aβ(11-15)-Fragmenten während der 4:4-Simulation.



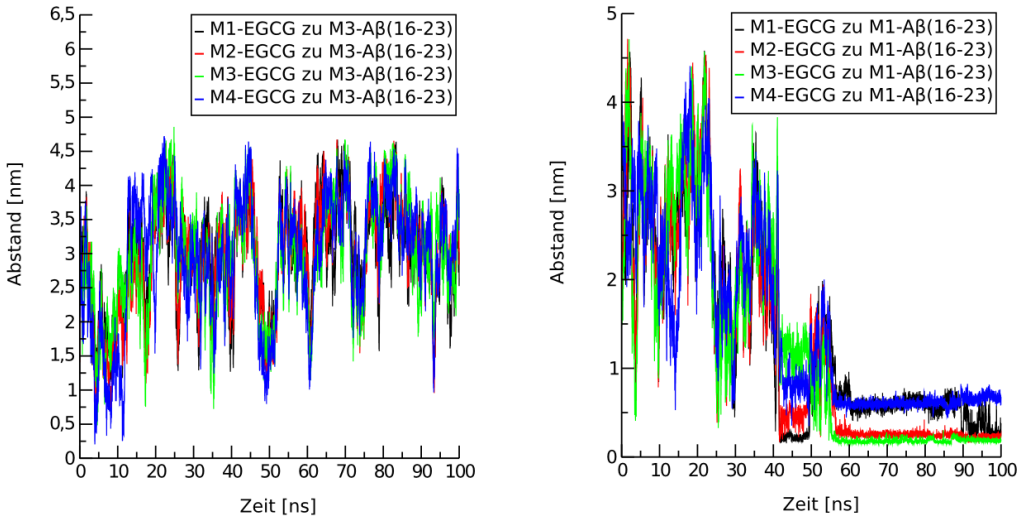


Abbildung 35: Abstand von EGCG zu den Aβ(16-23)-Peptiden innerhalb von 100 ns.

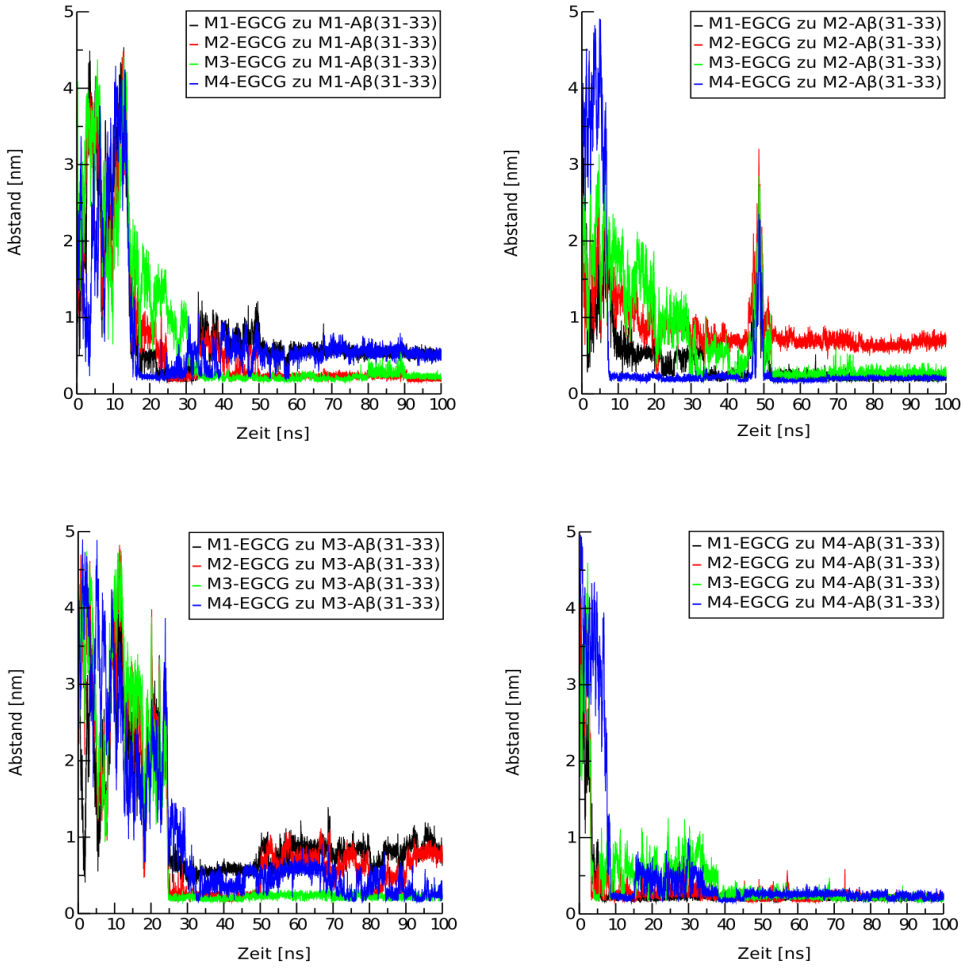


Abbildung 36: Simulationsverlauf des Abstands von Aβ(31-33) und EGCG im 4:4-Verhältnis.

7.3 Transitionsnetzwerk von 100 mM EGCG mit RESP-Ladungen

In Abbildung 37 ist das Transitionsnetzwerk von 100 mM mit dem RESP-Ladungssatz über die ganze Simulation von 60 ns zu sehen.

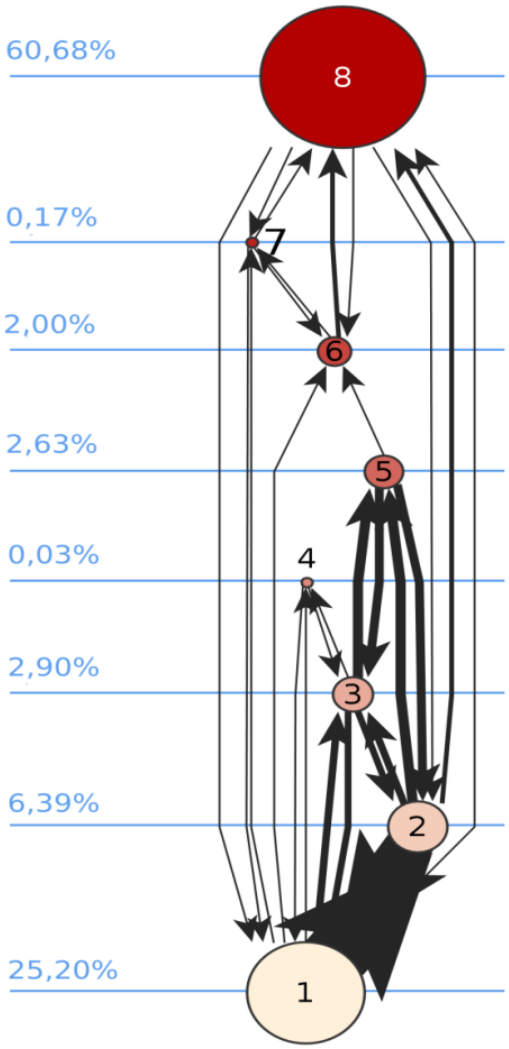


Abbildung 37: Transitionsnetzwerk der ganzen 60 ns-Simulation von 100 mM EGCG unter Benutzung der RESP-Ladungen.

Danksagung

Zum Schluss möchte ich meinen herzlichen Dank aussprechen, insbesondere meinem Betreuer Oliver Schillinger und Jun.-Prof. Birgit Strodel für die intensive Betreuung bei meiner Bachelor-Arbeit. Zudem möchte ich mich bei der gesamten Gruppe von Frau Stodel in Jülich für die Hilfe und das angenehme, schöne Umfeld bedanken, insbesondere bei Marianne Schulte und Bogdan Barz, die mir halfen, als Oliver in Urlaub gewesen ist.

Des Weiteren möchte ich Prof. Christel Marian für die Übernahme als Zweitgutachterin und für den zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz im Institut der Theoretischen und Computerchemie der Heinrich-Heine-Universität danken. In diesem Zusammenhang geht ein Dank an den Prof. Christel Marian, ihres Arbeitskreis und ihren Bachelorstudenten für das angenehme Klima, für die Diskussionen sowie Gespräche und für die leckeren Kuchenstücken während meiner Arbeit.

Erklärung

Hiermit versichere ich, Jennifer Loschwitz, dass die vorliegende Bachelorarbeit selbstständig verfasst wurde und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet wurden.

Datum der Abgabe	Jennifer Loschwitz