

## Spezialisierungspraktikum

# Molecular Crowding

angefertigt von

**William Bode**

aus Helmstedt

am Institut für nichtlineare Dynamik / Theoretische Biophysik

**Bearbeitungszeit:** 1. Februar 2016 bis 1. März 2016

**Gutachter:** Prof. Dr. Stefan Klumpp



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Motivation</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Grundlagen</b>	<b>3</b>
2.1	Rezeptor-Ligandenbindung . . . . .	3
2.2	Betrachtung mittels Statistischer Mechanik . . . . .	3
2.2.1	Partikelarrangements Zählen . . . . .	4
2.2.2	Wahrscheinlichkeit von Mikrozuständen . . . . .	4
2.2.3	Bindewahrscheinlichkeit . . . . .	5
2.2.4	Verbindung Stat. Mech und Chemie . . . . .	6
2.2.5	Crowding . . . . .	6
2.3	Simulationsmethoden . . . . .	7
2.3.1	Random Walk . . . . .	7
2.3.2	Gittermodell . . . . .	8
2.3.3	Bindung . . . . .	8
<b>3</b>	<b>Programmbeschreibung</b>	<b>9</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>11</b>
<b>5</b>	<b>Ausblick</b>	<b>15</b>



# 1 Motivation

Das Innere einer Zelle ist so eng besetzt, dass die mittleren Abstände zwischen benachbarten Proteinen vergleichbar mit der Größe der Proteine selbst ist. Daher sind Betrachtungen, die von einer freien Bewegung in einer Zelle ausgehen, nicht ausreichend für eine korrekte Beschreibung von Diffusionskinetik und Gleichgewichtszuständen. Daher soll in diesem Spezialisierungspraktikum der Einfluss von *Crowding* untersucht werden, also dem dichten Besetzen einer Zelle mit Proteinen, die weder Ligand noch Rezeptor in einer zu betrachtenden Reaktion sind. Durch den Volumenausschluss der durch Crowderpartikel stattfindet, verändert sich das statistische Gleichgewicht in einer Zelle. Dieser Einfluss auf das Bindungsgleichgewicht soll nun mittels einer Computersimulation numerisch erfasst werden. Diese kann dann in einer Bachelorarbeit erweitert werden, um weitere Effekte wie zum Beispiel unspezifische Anziehungskräfte zu untersuchen.



## 2 Grundlagen

### 2.1 Rezeptor-Ligandenbindung

Im Herzen des Betrachteten Systems steht die Gleichgewichtsreaktion zwischen Rezeptor und Ligand. Aus dem Massenwirkungsgesetz ist für eine Reaktion zwischen Liganden L und Rezeptoren R der Begriff der Dissoziationskonstante gegeben:

$$K_d = \frac{[L][R]}{[LR]} \quad (2.1)$$

Das kann man umschreiben als

$$[LR] = \frac{[L][R]}{K_d} \quad (2.2)$$

Uns werden später die Bindewahrscheinlichkeiten interessieren. Diese sind nun gerade gegeben durch:

$$p_{bound} = \frac{[LR]}{[R] + [LR]} \quad (2.3)$$

Setzen wir nun 2.2 ein erhalten wir:

$$p_{bound} = \frac{[L]/K_d}{1 + ([L]/K_d)} \quad (2.4)$$

### 2.2 Betrachtung mittels Statistischer Mechanik

Ein wichtiges Werkzeug zur Betrachtung einer Zelle ist der Formalismus der Statistischen Mechanik. Die Zelle kann als chemisches oder mechanisches Gleichgewicht betrachtet werden, in der die niedrige Energiezustände und Entropieerhöhung angestrebt werden. Das Ziel soll nun sein, eine Boltzmannverteilung herzuleiten, welche die Wahrscheinlichkeit eines Mikrozustands basierend auf seiner Energie beschreibt. Zunächst wird die Boltzmannverteilung nur für Liganden und Rezeptor hergeleitet, dann um Crowding erweitert Die folgenden Berechnungen sind im wesentlichen

Kapitel 6 und 14 von [1] nachvollzogen.

### 2.2.1 Partikelarrangements Zählen

Betrachtet man ein Gitter mit  $\Omega$  Plätzen auf dem  $L$  Liganden zu verteilen sind, so gibt es für den ersten Liganden  $\Omega$  mögliche Plätze. Danach gibt es für den nächsten der  $L - 1$  möglichen Plätze  $\Omega - 1$  mögliche Plätze. Dieses Argument wiederholt man insgesamt  $L$ -mal und kommt auf die möglichen Arrangements:

$$\text{Anzahl Arrangements} = \frac{\Omega!}{(\Omega - L)!} \quad (2.5)$$

In unserem Fall sind die Liganden aber ununterscheidbar. Wenn also 2 Liganden Plätze tauschen würden, so würde sich daraus kein anderer Zustand ergeben. Um dieses Überzählen zu verhindern, führt man den *Gibbs-Faktor*  $\frac{1}{L!}$  ein:

$$\text{Anzahl Zustände} = \frac{\Omega!}{L!(\Omega - L)!} \quad (2.6)$$

### 2.2.2 Wahrscheinlichkeit von Mikrozuständen

Das Grundsätzliche Ziel der statistischen Mechanik ist es, Wahrscheinlichkeitsaussagen über das Auftreten verschiedener Mikrozustände zu treffen. Der wesentliche Unterschied zwischen zwei Mikrozuständen ist die Energie  $E_i$ , wobei  $i$  den  $i$ -ten Mikrozustand bezeichnet. Aus der Statistischen Mechanik ist nun genau die Wahrscheinlichkeit bekannt, mit der jeweils ein Mikrozustand auftritt:

$$p(E_i) = \frac{1}{Z} e^{-E_i/k_b T} \quad (2.7)$$

Der Faktor  $\frac{1}{Z}$  dient der Normierung der Verteilung.  $Z$  ist bekannt als die Zustandssumme. Die Gleichung 2.7 ist bekannt als Boltzmann-Verteilung. Die Normierungskonstante  $\frac{1}{Z}$  kann durch die Anforderung  $\sum_{i=1}^N p(E_i) = 1$  bestimmt werden, was bedeutet:

$$Z = \sum_{i=1}^N e^{-E_i \beta} \quad (2.8)$$

$\beta$  ist hier die inverse Temperatur  $\frac{1}{k_b T}$



### 2.2.3 Bindewahrscheinlichkeit

Diese Werkzeuge können nun angewandt werden, um die Bindewahrscheinlichkeit eines Liganden an einem Rezeptor zu berechnen.

Hierzu bilden wir das Verhältnis aus dem statistischen Gewicht des gebundenen Zustands und der Summe der statistischen Gewichte der gebundenen und ungebundenen Zustände. Das Gewicht des gebundenen Zustands ist

$$e^{-\beta\varepsilon_b} \sum_{\text{Lösung}} e^{-\beta(L-1)\varepsilon_{sol}}$$

Wobei der erste Faktor den gebundenen Liganden beschreibt und der zweite Faktor die Summe über alle ungebundenen Liganden in der Lösung ist. Wir haben hier  $\varepsilon_b$  als die Bindungsenergie und  $\varepsilon_{sol}$  als die Energie für ein freies Teilchen in der Lösung eingeführt. Die Summe über die Lösung ist eine Anweisung dafür, über alle Konfigurationen von  $L - 1$  Teilchen auf  $\Omega$  Plätzen zu summieren, wobei jede davon das Gewicht  $e^{-\beta(L-1)\varepsilon_{sol}}$  hat. Da der Boltzmannfaktor für all diese Zustände gleich ist, gilt es nur die Anzahl an Konfigurationen zu finden, das führt zu:

$$\sum_{\text{Lösung}} e^{-\beta(L-1)\varepsilon_{sol}} = \frac{\Omega!}{(L-1)![\Omega - (L-1)]!} e^{-\beta(L-1)\varepsilon_{sol}} \quad (2.9)$$

Desweiteren benötigen wir für die weitere Betrachtung die Zustandssumme, welche eine Summe ist aus den möglichen gebundenen und ungebundenen Zuständen, also:

$$Z(L, \Omega) = \sum_{\text{Lösung}} e^{-\beta L \varepsilon_{sol}} + e^{-\beta \varepsilon_b} \sum_{\text{Lösung}} e^{-\beta(L-1)\varepsilon_{sol}} \quad (2.10)$$

Wir haben den zweiten Term schon in 2.9 bestimmt, daher fehlt noch der erste. Hierzu kommen wir mit Gleichung 2.6 auf:

$$\sum_{\text{Lösung}} e^{-\beta L \varepsilon_{sol}} = e^{-\beta L \varepsilon_{sol}} \frac{\Omega!}{L!(\Omega - L)!} \quad (2.11)$$

Somit können wir die Zustandssumme wie folgt ausdrücken:

$$Z(L, \Omega) = e^{-\beta L \varepsilon_{sol}} \frac{\Omega!}{L!(\Omega - L)!} + e^{-\beta \varepsilon_b} e^{-\beta(L-1)\varepsilon_{sol}} \frac{\Omega!}{(L-1)![\Omega - (L-1)]!} \quad (2.12)$$

## 2 Grundlagen

Man kann nun folgende Näherung rechtfertigen:[1]

$$\frac{\Omega!}{(\Omega - L)!} \approx \Omega^L \quad (2.13)$$

Nun können wir die Bindewahrscheinlichkeit  $p_{bound}$  folgendermaßen ausdrücken:

$$p_{bound} = \frac{e^{-\beta\varepsilon_b} \frac{\Omega^{L-1}}{(L-1)!} e^{-\beta(L-1)\varepsilon_{sol}}}{\frac{\Omega^L}{L!} e^{-\beta L\varepsilon_{sol}} + e^{-\beta\varepsilon_b} \frac{\Omega^{L-1}}{(L-1)!} e^{-\beta(L-1)\varepsilon_b}} \quad (2.14)$$

erweitern wir diesen Bruch um  $(L!/\Omega^L)e^{\beta L\varepsilon_{sol}}$  und definieren  $\Delta\varepsilon = \varepsilon_b - \varepsilon_{sol}$ , so vereinfacht sich der Ausdruck zu:

$$p_{bound} = \frac{(L/\Omega)e^{-\beta\Delta\varepsilon}}{1 + (L/\Omega)e^{-\beta\Delta\varepsilon}} \quad (2.15)$$

### 2.2.4 Verbindung Stat. Mech und Chemie

Vergleichen wir Gleichung 2.15 mit Gleichung 2.4 so erhalten wir folgende Identität:

$$K_d = \frac{1}{l^3} e^{\beta\Delta\varepsilon}, \quad (2.16)$$

Wobei  $l^3$  die Größe eines Gitterzellenvolumens darstellt. Diese Gleichung erlaubt uns die chemische Betrachtung mit der statistischen Mechanik zu verbinden.

### 2.2.5 Crowding

Das hergeleitete Gittermodell muss nun noch um Crowdermoleküle erweitert werden. Mit den selben Argumenten wie bei Gleichung 2.6 kommt man nun für C Crowdermoleküle auf die Zustandssumme

$$Z_{sol}(L, C) = \frac{\Omega!}{L!C!(\Omega - L - C)!} e^{-\beta L\varepsilon_L^{sol}} e^{-\beta C\varepsilon_C^{sol}} \quad (2.17)$$

wobei  $\varepsilon_C^{sol}$  und  $\varepsilon_L^{sol}$  die Energien von Crowderpartikel und Ligand darstellen. Der Rezeptor ist nun entweder besetzt oder nicht besetzt, die Gewichte dieser beiden Zustände sind nun  $Z_{sol}(L - 1, C)e^{-\beta\varepsilon_L^b}$  und  $Z_{sol}(L, C)$ . Die Bindewahrscheinlichkeit für ein Partikel ist daher:

$$p_{bound} = \frac{Z_{sol}(L - 1, C)e^{-\beta\varepsilon_L^b}}{Z_{sol}(L - 1, C)e^{-\beta\varepsilon_L^b} + Z_{sol}(L, C)}. \quad (2.18)$$

Erweitert man den Bruch nun um  $Z_{sol}(L-1, C)e^{-\beta\varepsilon_L^b}$  und geht davon aus dass  $\Omega - L - C \gg 1$  gilt, nimmt die Gleichung folgende einfache Form an:

$$p_{bound} = \frac{1}{1 + \frac{\Omega-L-C}{L}e^{\beta\Delta\varepsilon_L}} \quad (2.19)$$

wobei wir die Energiedifferenz  $\Delta\varepsilon_L = \varepsilon_L^b - \varepsilon_L^{sol}$  definiert haben.

Führt man noch eine Crowderkonzentration  $\phi_C = C/\Omega$  ein, gilt desweiteren:

$$p_{bound} = \frac{1}{1 + \frac{\Omega}{L}(1 - \phi_C)e^{\beta\Delta\varepsilon_L}} \quad (2.20)$$

Im Vergleich mit Gleichung 2.16 erfahren wir nun, dass für die Dissoziationskonstante unter Einfluss von Crowdern gilt:

$$K_d\phi_C = (1 - \phi_C)K_d(\phi_C = 0) \quad (2.21)$$

Dieser Ausdruck beschreibt den Einfluss von Crowder bezüglich der Bindungswahrscheinlichkeit.

## 2.3 Simulationsmethoden

Diese Beschreibungen folgen im Wesentlichen den Bedingungen von [2]

### 2.3.1 Random Walk

Lässt man Bindungen und Wechselwirkungen außen vor, so handelt es sich bei der Bewegung eines Liganden in einer Zelle um einen *Random Walk*. Im eindimensionalen Fall wird bei einem Random Walk ein Objekt auf einen diskreten Zahlenstrahl mit Schrittabstand  $l$  gesetzt. Pro arbiträr definierten Zeitschritt  $\tau$  bewegt sich das Objekt nun mit gleicher Wahrscheinlichkeit nach Links oder nach Rechts. Auf ein dreidimensionales Gitter verallgemeinert ist die Wahrscheinlichkeit für jede Richtung (Vorne, Hinten, Oben, Unten, Links, Rechts)  $\frac{1}{6}$ . In einem freien Volumen  $V = \Omega l^3$  mit Gitterabstand  $l$  und  $\Omega$  Gitterplätzen würde sich das Partikel also mit einer Diffusionskonstante  $D = l^2/(6\tau)$  bewegen. Wenn  $P$  Partikel vorliegen, die sich bewegen sollen, so wählen wir  $P$  mal zufällig ein Partikel aus, das sich bewegt, so dass auf Dauer jedes Partikel durchschnittlich einmal pro Zeitschritt bewegt wird.

### 2.3.2 Gittermodell

Wir betrachten nun ein dreidimensionales Gittervolumen  $V = \Omega l^3$  mit Gitterabstand  $l$  und  $\Omega$  Gitterplätzen und stattdessen es mit  $R$  Rezeptoren,  $L$  Liganden und  $C$  Crowdern, alle zufällig platziert, aus. Wir betrachten der Einfachheit halber, dass Rezeptor, Liganden und Crowder alle gleich groß sind. Wenn auf diesem Gitter Bewegung stattfindet, so gilt ein Volumenausschluss: Ein Gitterplatz kann nur von einem Partikel besetzt sein, und sollte ein Partikel sich auf einen besetzten Gitterplatz bewegen "wollen", so passiert nichts. Desweiteren ist es für Crowderpartikel verboten, den Platz am Rezeptor zu besetzen.

### 2.3.3 Bindung

Sobald ein Ligand auf einen Rezeptorplatz kommen, soll mit einer Wahrscheinlichkeit von 1 eine Bindung eingegangen werden. Da das System so in einen energetisch niedrigeren Zustand kommt, ist die Wahrscheinlichkeit dass es sich von diesem Platz löst verringert. Hierbei kommen 2 Effekte zum Tragen: Zum einen das Überwinden der Potentialbarriere und zum anderen die Eingeengtheit durch Crowder. Die effektive Affinität ist das Produkt aus der Affinität  $K_a$  des Potentials und des inversen Crowding Faktors  $1/(1 - \phi_c)$  Diese Größe die beschreibt, wie lange das Partikel(im Folgenden: Affinität,  $K_a$ ), ist nun gerade das Inverse und der Dissoziationskonstante:

$$K_{a_{effektiv}} = K_a(\phi_c = 0) / = \frac{1}{e^{\beta \Delta \epsilon_L} (1 - \phi_C)} \quad (2.22)$$

### 3 Programmbeschreibung

Zur Simulation des in der Theorie beschriebenen Sachverhalts wurde nun ein Computerprogramm geschrieben, das vereinfacht gesagt folgende Dinge tut:

- Erstelle ein Dreidimensionales Gitter mit  $\Omega = l^3$  Plätzen und periodischen Randbedingungen
- Besetze dieses Gitter mit  $L = \phi_L \Omega$  Liganden und  $C = \phi_C \Omega$  Crowdern sowie 1 Rezeptor
- Gebe eine Potenzialffinität vor
- Gebe N Zeitschritte vor
- Bewege N Zeitschritte lang zufällig  $(C + L)$  Teilchen unter Beachtung von Volumenausschluss
- Speichere die Zeiten zu denen ein Ligand gebunden ist
- Gebe die Bindewahrscheinlichkeit, die mittlere Bindedauer und die mittlere ungebundene Dauer aus



## 4 Ergebnisse

Besagte Simulation wurde nun einige Zeit lang laufen gelassen. Abbildung 4.1 zeigt den Verlauf der Bindewahrscheinlichkeit gegen die Crowderkonzentration für ein Gitter mit  $\Omega = 8^3$  Plätzen und einer Affinität von 500. Angelegt wurde folgender Fit für für  $K_d$  :

$$P_b(\phi_C) = \frac{1}{1 + (512K_d)(1 - \phi_C)} \quad (4.1)$$

Das Ergebnis ist

$$K_d = 0.002033 \pm 0.0000206 \quad (4.2)$$

und weicht vom Theoretischen Wert  $K_{d_{theoretisch}} = 1/500$  um 7% ab.

Abbildung 4.2 zeigt die mittlere Zeiten für den gebundenen und ungebundenen Zustand. Interessant hierbei ist, dass die ungebundene Zustand anscheinend nicht von der Crowderkonzentration beeinflusst wird. Die gebundene Zeit hingegen schon. Gefittet wurde die Funktion auf  $t(\phi_C) = \frac{b}{1-\phi_C}$  mit  $b = 505 \pm 6$ .

Dies ergibt Sinn, da im Falle der kompletten Besetzung des Volumens durch Crowdern der Ligand ständig gebunden wäre.

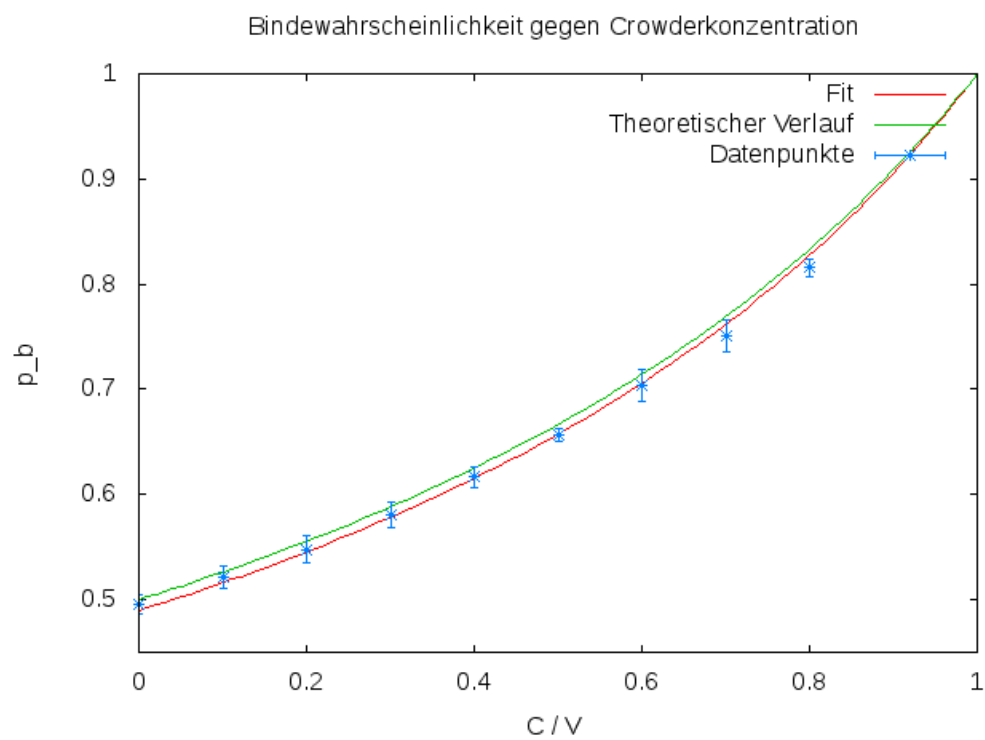


Abb. 4.1: Bindewahrscheinlichkeit gegen Crowderkonzentration



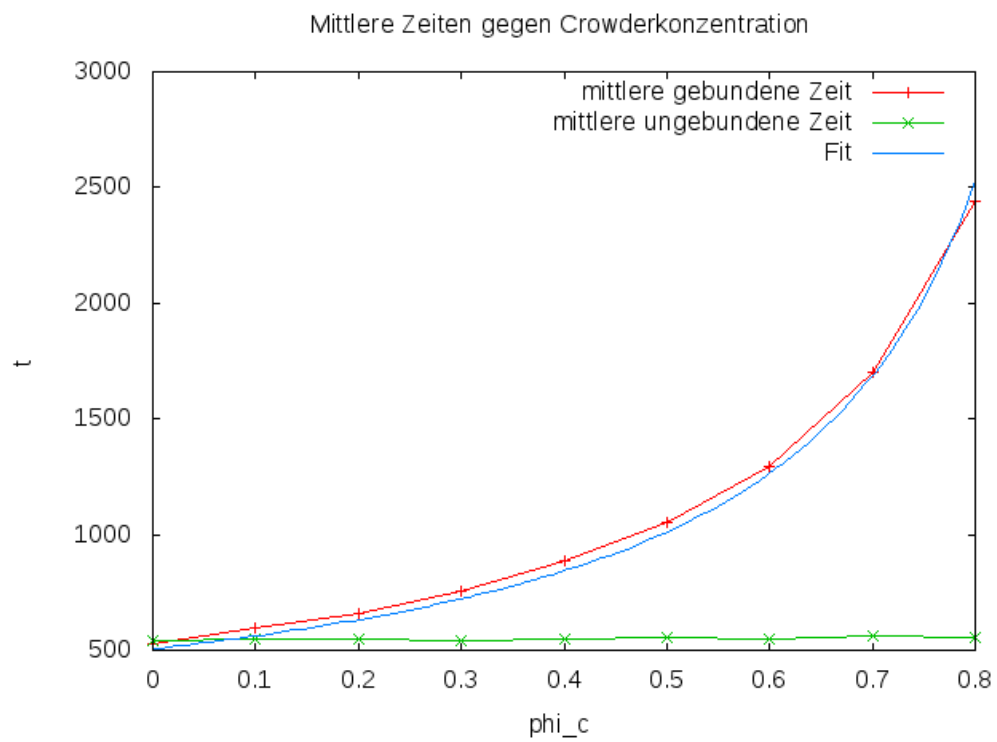


Abb. 4.2: Mittlere Zeiten gegen Crowderkonzentration



## 5 Ausblick

Ziel dieser Arbeit war es, ein Programm zu schreiben, mit der man eine Zelle in der Crowding stattfindet beschreiben kann. In einer Bachelorarbeit kann man dieses Programm noch erweitern, so zum Beispiel um nicht-spezifische Anziehungskräfte oder verschieden große Volumina der Partikel. Empfehlenswert wären noch weitere, längere, Simulationsdurchläufe als auch welche auf größeren Gittern um Gitterartefakte zu minimieren. Interessanter Aspekt ist auch die weitere statistische Analyse, um mehr über die Verteilungen der einzelnen Größen zu erfahren.



# Literaturverzeichnis

- [1] Rob Phillips et al. *Physical Biology of the Cell*. Garland Science, 2013.
- [2] David Gomez and Stefan Klumpp. Biochemical reactions in crowded environments: revisiting the effects of volume exclusion with simulations. *Front. Phys.*, 3:45, DOI: 10.3389/fphy.2015.00045:1117–1135, 2015.