

## 8. Zusammenfassung

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit steht die erstmalige Anwendung eines im Raum kollektiver und innerer Variablen definierten MC-Algorithmus für Nukleinsäuren. Ziele der Arbeit bestehen sowohl in der Diskussion erster mit dem MC-Algorithmus gewonnener Resultate über die Sequenzspezifität der Konformation und Flexibilität von Nukleinsäure-Dekameren und Methylenblau-DNA-Komplexen als auch in der Bewertung der Leistungsfähigkeit des Algorithmus durch Untersuchungen der Equilibrierung und der Abhängigkeit von der Startkonfiguration der MC-Simulationen. Ergänzt werden die MC-Simulationen durch Energieminimierungen von MB-DNA-Komplexen und Energiebewertungen der Konformationen dieser Komplexe durch eine Kontinuumsbehandlung elektrostatischer Lösungsmittelleffekte.

Der in Kap. 4 vorgestellte MC-Algorithmus basiert auf einem von rigiden Basen und fixierten Bindungslängen ausgehenden molekularen Modell, das die Beschreibung der Freiheitsgrade von Nukleinsäuren durch einen Satz von 12 kollektiven und inneren Variablen pro Nukleotid ermöglicht. Die Nukleotide werden durch kollektive MC-Variablen in Form von 3 Translationen und 3 Rotationen im Raum bewegt. Die Zuckerfaltung wird durch die MC-Variablen Phase und Amplitude entsprechend der Pseudorotationsbeschreibung der Zuckerkonformation variiert [19, 152]. Der Glykosidwinkel  $\chi$ , die beiden endozyklischen Torsionswinkel  $\varepsilon$  und  $\gamma$  sowie der Valenzwinkel  $\omega_1$  komplettieren als innere Variablen den zur Beschreibung der Freiheitsgrade verwendeten Satz von 12 MC-Variablen pro Nukleotid. Die MC-Übergänge in den 12 kollektiven und inneren Variablen werden mit einem analytischen Kettenschluß kombiniert, der die übrigen endozyklischen Torsions- und Valenzwinkel als abhängige Variablen variiert. Der Kettenschluß ermöglicht lokale, auf einzelne Nukleotide beschränkte Konformationsänderungen infolge der MC-Übergänge. Über die Akzeptanz der MC-Übergänge wird nach dem Metropolis-Algorithmus [143] unter Berücksichtigung der entsprechenden Jacobi-Faktoren [150] entschieden. Für die Energieberechnungen werden das Kraftfeld AMBER [106] und eine implizite Beschreibung des Lösungsmittels [110] verwendet. Die polyanionische Ladung der Nukleinsäuren wird durch explizite Gegenionen neutralisiert, die durch Translationen beschreibende MC-Variablen bewegt werden.

Die Resultate von MC-Simulationen der DNA-Dekamere  $[(dA-dT)_5]_2$  und  $[(dG-dC)_5]_2$  werden in Kap. 5 dargestellt und diskutiert. Die Equilibrierung der MC-Simulationen wird auf der Grundlage mittlerer Energien und mittlerer struktureller Parameter bewertet. Sowohl die Mittelwerte der Gesamtenergien als auch der Parameter X-Displacement, Rise, Inclination, Twist, Phase und Glykosidwinkel bleiben nach den  $4 \cdot 10^5$  Makrozyklen weitgehend konstant, so daß von einer Equilibrierung der MC-Simulationen nach  $4 \cdot 10^5$  Makrozyklen ausgegangen werden kann. Beim Vergleich der Equilibrierungen der MC-Simulationen beider Dekamere fällt erstens auf, daß die Nukleotide an den Rändern der Dekamere aufgrund von Endeffekten einer höheren Be-

---

weglichkeit unterliegen und deren strukturelle Parameter damit schlechter equilibrieren, und zweitens, daß das Dekamer mit alternierender AT Basensequenz eine größere Flexibilität als das Dekamer mit alternierender GC Basensequenz aufweist, die ebenfalls in einer etwas schlechteren Equilibrierung resultiert. Die unterschiedliche Flexibilität beruht auf der geringeren Stabilisierung von AT-Basenpaaren aufgrund verminderter Wasserstoffbrücken-Wechselwirkungen im Vergleich zu GC-Basenpaaren.

Der MC-Algorithmus führt nach den in Kap. 4 abgeschätzten Rechenzeiten somit in einer respektablen Zeit zur Equilibrierung der MC-Simulationen, wohingegen MD-Simulationen den vergleichbaren Nachweis einer notwendigen Equilibrierung bisher nicht erbringen konnten [55, 64, 72]. Das MC-Sampling kann als sehr effizient bewertet werden, denn Übergänge zwischen Substrukturen treten im Gegensatz zu sehr vereinzelt in MD-Simulationen [55, 72] vermehrt auf. Trotz wiederholten Ausflügen in Richtung der A- und der D-Form der DNA kehren die Konformationen immer wieder in die B-Form zurück. Die palindrome Symmetrie der Basensequenzen beider Dekamere spiegelt sich in den Mittelwerten struktureller Parameter und deren Fluktuationen wider, wodurch die erreichte Equilibrierung der MC-Simulationen bestätigt wird. Es konnte in Kap. 5 außerdem eine weitgehende Unabhängigkeit der Resultate der MC-Simulationen von der Startkonfiguration gezeigt werden. Für den equilibrierten Bereich einer von einer B-Form-Konformation und einer von einer extrem deformierten Konformation gestarteten MC-Simulation wurden mittlere Strukturen berechnet, die einen RMSD-Wert von nur 0,20 Å aufweisen, so daß beide mittleren Strukturen als nahezu äquivalent und die Resultate der MC-Simulationen als unabhängig von der Startkonfiguration betrachtet werden können.

Die Mittelwerte und Fluktuationen struktureller Parameter zeigen eine unterschiedlich stark ausgeprägte Sequenzspezifität. Die eindeutige Sequenzspezifität der Parameter X-Displacement, Rise, Tip, Twist, Phase und Glykosidwinkel von DNA-Dekameren mit alternierenden AT bzw. GC Basensequenzen wird diskutiert. Auch die Mittelwerte der Amplitude und der Torsionswinkel  $\varepsilon$ ,  $\zeta$ ,  $\alpha$ ,  $\gamma$  und  $\delta$  sowie die Fluktuationen der Parameter Rise, Inclination, Tip, Twist, Phase, Amplitude, Glykosidwinkel und der Torsionswinkel  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$  erweisen sich als sequenzspezifisch. Die Mittelwerte der strukturellen Parameter zeigen eine gute Übereinstimmung mit experimentell ermittelten Werten dieser Parameter [39, 45]. Der wichtige Parameter Twist mit 32°-34° für ApT-, 35°-37° für TpA-, 35,5°-36,5° für GpC- und 32,3°- 33,5° für CpG-Basenschritte korrespondiert gut mit experimentellen Daten [39], indem bei AT Basensequenzen die Twists der YpR- größer als die Twists der RpY-Basenschritte und bei GC Basensequenzen dagegen die Twists der RpY- größer als die Twists der YpR-Basenschritte sind. Im Gegensatz zu diesen Resultaten zeigt der Twist in MD-Simulationen mit ca. 30° ein deutliches Unwinding von 3-4° gegenüber experimentell bestimmten Twist-Werten [55, 64, 72].

Neben den Konformationen der Nukleinsäuren werden die Bewegungen der expliziten Gegenionen statistisch analysiert. Die höhere Aufenthaltswahrscheinlichkeit der Ionen in der Umgebung der Dekamere entspricht qualitativ der erwarteten Kondensation expliziter Gegenionen an der DNA-Oberfläche [47]. Bei Annahme eines Kondensationsradius von 22 Å ausgehend von der helikalen Achse der Dekamere kondensieren ca. 61 % der Gegenionen in Übereinstimmung mit experimentellen und theoretischen Studien an der DNA [48, 161].

Für die medizinisch bedeutsame Methylenblau-DNA-Bindung [96] werden in Kap. 6 durch Energieminimierung MB-DNA-Komplexe generiert [104], die die jeweils energie-

tisch bevorzugte Bindung in den drei möglichen Bindungsmodi (Interkalation des MB zwischen benachbarte Basenpaare, Bindung des MB in der kleinen oder der großen Furche) repräsentieren [53]. Bei der Auswahl der MB-DNA-Komplexe nach dem Kriterium niedrigster Energie wurden elektrostatische Lösungsmittelleffekte durch eine Kontinuumsbehandlung mit der FDPB-Methode [114, 115] berücksichtigt. Eine Interkalation des MB ist in den 5'-TpA-3'- und 5'-ApT-3'-Basenschritt eines AT alternierenden sowie in den 5'-CpG-3'- und 5'-GpC-3'-Basenschritt eines GC alternierenden Dekamers möglich. Eine adiabatische Suche durch Rotation der langen Achse des MB um die helikale Achse resultiert für jede Interkalationstasche in zwei möglichen Orientierungen des MB. Bei der symmetrischen Interkalation ist die lange Achse des MB parallel zu den flankierenden Basenpaaren orientiert und bei der gauche Interkalation um ca. 140°-145° um die helikale Achse rotiert. Sequenzeffekte der MB-DNA-Bindung werden durch einen Vergleich der Bindung des MB mit AT und GC alternierenden Dekamern untersucht. In salzfreier Umgebung ist die symmetrische Interkalation gegenüber den anderen Bindungen energetisch bevorzugt. Die abgeschätzten Bindungsenergien der MB-DNA-Komplexe mit symmetrischer Interkalation des MB in den 5'-CpG-3'- und den 5'-GpC-3'-Basenschritt deuten eine gleiche Stabilität dieser Komplexe in Übereinstimmung mit spektroskopischen Daten an [100]. Die stabilere Bindung bei der symmetrischen Interkalation resultiert aus einer reduzierten Stapelwechselwirkung des MB mit den flankierenden Basen und einer stärkeren Deformation der Target-Dekamere bei der gauche Interkalation.

Salzeffekte der MB-DNA-Bindung werden durch Abschätzung von Bindungsenergien der Komplexe im Bereich von  $10^{-4}$  – 2 mol/l untersucht. Die Bindung des MB in der kleinen Furche des AT alternierenden Dekamers wird bei geringen Ionenstärken gegenüber der Interkalation stabilisiert und bleibt bei hohen Ionenstärken der energetisch bevorzugte Bindungsmodus. Dagegen wechselt die bei geringen Ionenstärken energetisch bevorzugte Interkalation des MB bei einer Bindung mit dem GC alternierenden Dekamer erst bei hohen Ionenstärken zur Bindung in der kleinen Furche als bevorzugtem Bindungsmodus [76]. Die Resultate der sequenzspezifischen und salzabhängigen MB-DNA-Bindung befinden sich in Übereinstimmung mit experimentellen Daten [100, 173]. Da in röntgenkristallographischen oder NMR-Untersuchungen atomar aufgelöste Strukturen von MB-DNA-Komplexen bisher nicht vorliegen und aus spektroskopische Daten die Architektur der Komplexe nicht vollständig abgeleitet werden kann, sind die in Kap. 6 vorgestellten MB-DNA-Komplexe als Grundlage der Interpretation experimenteller Resultate geeignet [177, 178].

MC-Simulationen der MB-DNA-Komplexe ermöglichen erstmals detaillierte Erkenntnisse über die Dynamik und Flexibilität einer DNA-Liganden-Bindung. MD-Simulationen sind auf kleine Systeme [184] oder auf Zeitskalen beschränkt, die eine Equilibrierung der MD-Simulationen ausschließen [84]. In Kap. 7 kann gezeigt werden, daß die bisher begrenzten theoretischen Möglichkeiten zur Untersuchung dynamischer Eigenschaften einer Komplexbildung der DNA mit Liganden [185] durch die Anwendung des in Kap. 4 vorgestellten MC-Algorithmus eine signifikante Erweiterung erfahren. In dem MC-Algorithmus werden die Bewegungen des Liganden relativ zur Target-DNA durch 3 Translationen und 3 Rotationen beschrieben. Ergänzt werden diese 6 kollektiven MC-Variablen des MB durch 4 innere MC-Variablen, die den Rotationen der Methylgruppen zuzuordnen sind.

Die symmetrischen und gauche Interkalationen des MB erweisen sich in den MC-

---

Simulationen als stabil, denn Übergänge zwischen den alternativen Interkalationsmodi konnten nicht beobachtet werden. Die Lage und Orientierung des MB in der Bindungstasche sind variabler bei gauche gegenüber symmetrischen Interkalationen. Eine Ausnahme bildet die symmetrische Interkalation in den 5'-GpC-3'-Basenschritt, bei der sich die lange Achse des MB während der MC-Simulation um ca. 60° um die helikale Achse dreht, dann aber wieder zur symmetrischen Interkalation mit einem mittleren Twist von 1°-5° zurückkehrt. Die Konformation der Target-Dekamere unterliegt an der Interkalationstasche einem Stretching und Unwinding. Größere mittlere Rise-Werte bei der gauche Interkalation deuten eine stärkere Deformation der Target-Dekamere im Vergleich zur symmetrischen Interkalation an. Die Differenzen in den mittleren Twist-Werten von YpR- und RpY-Basenschritten freier Dekamere bleiben in den deformierten Interkalationskomplexen erhalten. Die Konservierung der Twist-Differenzen kann sowohl bei Basenschritten, die die Interkalationstasche bilden und damit einem starken Unwinding unterliegen, als auch bei den einer Bindungstasche benachbarten Basenschritten, die mit erhöhten Twist-Werten dem Unwinding entgegenwirken, beobachtet werden. Die Zuckerkaltungen der der Interkalationstasche benachbarten Nukleotide erweisen sich als spezifisch für Interkalationen in YpR- und RpY-Basenschritte.

Bei einer Bindung des MB in der kleinen Furche des AT alternierenden Dekamers ereignen sich wiederholte Übergänge zwischen alternativen Bindungsstellen. Die diskreten Bindungsstellen werden durch eine Orientierung des MB mit aus der Furche weisenden Methylgruppen und jeweils in der Ebene eines Basenpaares liegendem Schwefel- und zentralem Stickstoffatom charakterisiert. Bei der Bindung des MB in der kleinen Furche des GC alternierenden Dekamers werden nur vereinzelte Übergänge zwischen alternativen Bindungsstellen beobachtet. Diese stärkere Lokalisation des MB wird auf eine Wasserstoffbrücke zwischen dem zentralen Stickstoffatom und einem Proton der Aminogruppe eines Guanins zurückgeführt. Bei der Bindung des MB in der großen Furche zeigt das MB stärkere Bewegungen, die eine geringere Stabilisierung der Bindung andeuten. Die Target-Dekamere unterliegen bei einer Bindung des MB in den Furchen charakteristischen Krümmungen, die sich in einer Verringerung der mittleren Rise-Werte aller Basenschritte und einer Vergrößerung mittlerer Twists der YpR-Basenschritte äußern.

Die MC-Simulationen der MB-DNA-Komplexe identifizieren stabile Bindungszustände, beschreiben Übergänge zwischen alternativen Bindungsstellen des MB und eine Sequenzspezifität der durch die Bindung des MB verursachten Deformationen der Target-Nukleinsäuren. Die Resultate über die Flexibilität der MB-DNA-Komplexe tragen zum Verständnis der Ursachen und der Entstehung der Bindung bei. Die Daten ermöglichen zudem eine detailliertere Interpretation experimenteller Untersuchungen.

Die Resultate dieser Arbeit zeigen, daß viele weitere Anwendungen des vorgestellten MC-Algorithmus zu Ergebnissen führen werden, die auf großes Interesse hoffen lassen. Fortgesetzt werden die in dieser Arbeit vorgestellten Studien um MC-Simulationen von weiteren sequenzspezifischen Nukleinsäurekonformationen, von Komplexen der DNA mit anderen Liganden bis hin zur Protein-DNA-Wechselwirkung.