

6. Sequenz- und Salzeffekte der Methylenblau-DNA-Bindung

Methylenblau (MB) ist ein zur Gruppe der Phenothiazine gehörender Farbstoff, der in einer Typ-II-Photoreaktion durch einen Triplett-Triplett-Energietransfer vom als Photosensibilisator wirkenden Methylenblau zum molekularen Sauerstoff Singulett-Sauerstoff generiert [98, 99]. Die medizinische Bedeutung des Singulett-Sauerstoffs ist in Kap. 2.6 diskutiert worden [95]. Methylenblau wechselwirkt mit Nukleinsäuren, Proteinen sowie Lipiden und verursacht durch die Generierung von Singulett-Sauerstoff photooxidative Schäden in biologischen Systemen [96]. Diese photooxidativen Schäden können zu Strangbrüchen von Nukleinsäuren führen, so daß die Singulett-Sauerstoffgenerierung des Farbstoffs Methylenblau ausgenutzt werden kann, um die DNA gezielt zu schneiden. Voraussetzung dafür ist einerseits eine sequenzspezifische MB-DNA-Wechselwirkung und andererseits eine effiziente Singulett-Sauerstoffquantenausbeute. Durch Lumineszenz-Messungen konnte gezeigt werden, daß diese Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute stark von der Architektur des MB-DNA-Komplexes abhängig ist [40]. Da zwar eine Reihe spektroskopischer Daten über die MB-DNA-Bindung lange bekannt sind [162, 163, 164, 165], bisher aber keine Struktur von MB-DNA-Komplexen in Röntgenkristall- oder NMR-Messungen bestimmt werden konnte, sind im Rahmen dieser Arbeit theoretische Modellierungen durchgeführt worden, die detaillierte Erkenntnisse über die Konformation und Stabilität von MB-DNA-Komplexen in Abhängigkeit von der Basensequenz liefern [53]. Der in Abb. 4.5 dargestellte planare, trizyklische Farbstoff Methylenblau kann mit der DNA eine Komplexbildung eingehen, indem er zwischen zwei Basenpaare interkaliert oder in die kleine oder große Furche der DNA eindringt. Spektroskopische Daten deuten auf eine Interkalation des Liganden als bevorzugten Bindungsmodus hin [166, 167, 168]. Eine Abhängigkeit der MB-DNA-Bindung von der Basensequenz der Target-DNA [169] und von Umgebungseinflüssen [170] ist ebenfalls in spektroskopischen Untersuchungen beobachtet worden.

6.1. Sequenzspezifische Bindung von Methylenblau und DNA-Dekameren mit alternierenden AT und GC Basensequenzen

Die starke Sequenzabhängigkeit der MB-DNA-Bindung ist durch CD-Messungen bestätigt worden, in denen die Komplexbildung von MB und Polynukleotiden mit alternierenden AT und GC Basensequenzen verglichen wurde [100]. Da diese experimentellen Daten nicht die Aufklärung der Konformation der MB-DNA-Komplexe

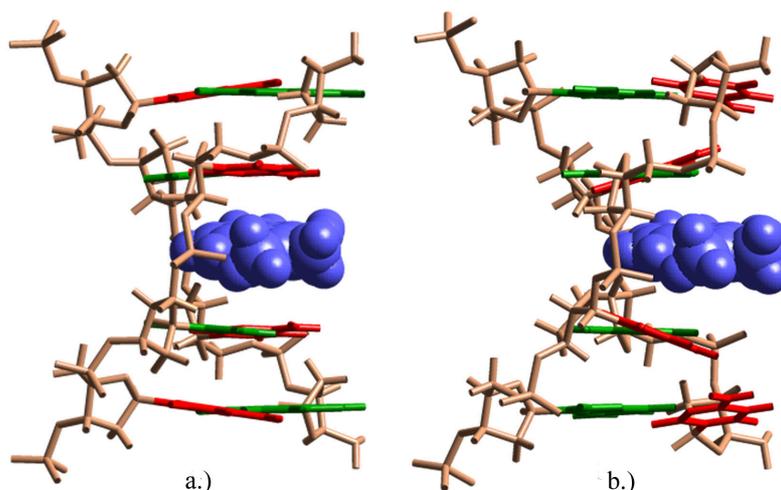


Abb. 6.1.: *Methylenblau-DNA-Komplexe mit symmetrischer Interkalation des Methylenblau in den a.) 5'-CpG-3'- bzw. b.) 5'-GpC-3'-Basenschritt des Dekamers [(dG - dC)₅]₂*

ermöglichen, wurden in theoretischen Modellierungen die verschiedenen Bindungsmodi der MB-DNA-Bindung mit AT und GC alternierenden Dekameren als DNA-Bindungspartner untersucht. Die Wahl von Modellsystemen mit alternierenden Basensequenzen ermöglicht den Vergleich der Resultate mit den experimentellen Daten.

Die Konformation des Liganden Methylenblau wurde zunächst durch eine Energieminimierung mit dem Kraftfeld CVFF [108] berechnet, so daß im weiteren das planare, trizyklische π -Elektronensystem des MB als starrer Körper behandelt wird und die inneren Freiheitsgrade des Liganden auf die Rotation der Methylgruppen reduziert werden können. Für die Energieminimierung der MB-DNA-Komplexe findet der Algorithmus JUMNA [104] und das darin integrierte, in 3.18 explizit angegebene Kraftfeld FLEX [103] Anwendung. Der Algorithmus JUMNA benutzt eine mit der reparametrisierten Hückel-Del Re-Methode berechnete Ladungsverteilung der Nukleotide [171]. Die Ladungsverteilung des MB wurde durch eine Hückel-Del Re-Berechnung definiert, die auf der Basis von ab-initio-Rechnungen mit dem Programm Gaussian 94 [172] reparametrisiert worden ist [53]. Dabei wurde ein Standard-STO-3G-Basissatz unter Einbeziehung der d-Orbitale verwendet. Mit diesen in Tab. 6.1 angegebenen atomaren Monopolladungen können die quantenchemisch berechneten elektrostatischen Potential- und Feldverteilungen gut approximiert werden.

Atom	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C _{methyl}
Ladung	-0,12	0,01	0,15	0,29	-0,16	0,32	0,05
Atom	S	N _{arom}	N _{amino}	H1	H2	H5	H _{methyl}
Ladung	-0,26	-0,07	-0,45	0,05	0,05	0,05	0,06

Tabelle 6.1.: *Berechnete Ladungsverteilung des Methylenblau in atomaren Einheiten. Die Bezeichnungen der Atome beziehen sich auf Abb. 4.5*

Die Energieminimierungen der MB-DNA-Komplexe mit dem Algorithmus JUMNA wurden unter Verwendung der in 3.20 angegebenen abstandsabhängigen Dielektrizitätsfunktion durchgeführt [110]. Die elektrostatische Komponente der Gesamtenergie der

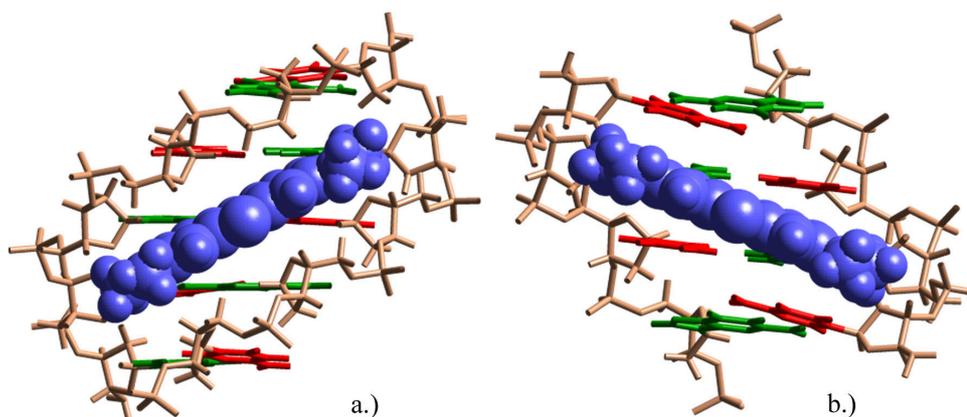


Abb. 6.2.: *Methylenblau-DNA-Komplexe mit Bindung des Methylenblau in a.) der kleinen Furche und b.) der großen Furche des Dekamers [(dG – dC)₅]₂*

minimierten Komplexe wurde durch die jeweilige, mit der in Kap. 3.1.3 beschriebenen FDPB-Methode berechnete, elektrostatische Energie ersetzt, so daß die Gesamtenergie der Komplexe nachträglich korrigiert wurde, um elektrostatische Lösungsmiteleinflüsse zu berücksichtigen [53]. Die Parameter für die Energieminimierung wurden nach dem Kriterium jeweils niedrigster korrigierter Gesamtenergien festgelegt. Der Slope der abstandsabhängigen Dielektrizitätsfunktion wurde mit $s = 0,25 \text{ \AA}^{-1}$ und die Grenzwerte der Dielektrizitätsfunktion mit $\varepsilon = 2$ für $r \rightarrow 0$ und $\varepsilon = 78$ für $r > 20 \text{ \AA}$ festgelegt. Die Ladungen der Phosphatgruppen wurden auf $-0,25e$ gedämpft. Bei der Berechnung der elektrostatischen Energien mit der FDPB-Methode wurden Phosphatladungen von $-1,0e$ berücksichtigt.

Mit der FDPB-Methode wurden die minimierten Konformationen der MB-DNA-Komplexe einer Kontinuumsbehandlung der elektrostatischen Lösungsmiteleinflüsse unterzogen [113, 116]. Verwendet wurde dazu die im Algorithmus DelPhi implementierte FDPB-Methode [114, 115]. Die Grenzfläche zwischen dem Lösungsmittel mit hoher dielektrischer Permittivität ($\varepsilon = 80$) und dem MB-DNA-Komplex mit geringer dielektrischer Permittivität ($\varepsilon = 1$) wird dabei durch die van-der-Waals-Oberfläche der Atome des Komplexes definiert. Die Polarisation des Lösungsmittels wird durch das elektrische Feld der Ladungen des in Lösung befindlichen Moleküls induziert. Diese Polarisation ist die Quelle eines Reaktionsfeldes, dessen Beitrag zur elektrostatischen Energie durch die FDPB-Methode abgeschätzt wird. Für die Glättung der Grenzfläche zwischen Lösungsmittel und Komplex wird im Algorithmus DelPhi ein Sondenradius von $1,4 \text{ \AA}$ gewählt. Ein in Kap. 3.1.3 erläutertes Gitter wird mit 150 Gitterpunkten in jeder Raumrichtung definiert, um die Reaktionsfeldenergie mit einer Genauigkeit von $0,1 \text{ kcal/mol}$ berechnen zu können. Außerdem wird von einem Gitter mit einem Füllfaktor von 20 % und einer Gitterkonstanten von $1,2 \text{ \AA}$ in 5 Schritten auf ein Gitter mit einem Füllfaktor von 90 % und einer Gitterkonstanten von $< 0,3 \text{ \AA}$ fokussiert. Um Gittereffekte zu verringern, wird diese FDPB-Rechnung für 16 auf dem Gitter unterschiedlich orientierte Anordnungen jeder Konformation berechnet und schließlich gemittelt.

Die Lage und Orientierung des Liganden Methylenblau kann, wie in Kap. 4.1.6 erläutert, durch 3 Translationen und 3 Rotationen relativ zu einer helikalen Achse beschrieben werden. Diese Beschreibung dient auch zur Generierung von Startkonfigurationen für die Energieminimierungen. Es werden Startkonfigurationen für die Bindung des MB in der großen und kleinen Furche der Dekamere [(dA-dT)₅]₂ und [(dG-dC)₅]₂ generiert.

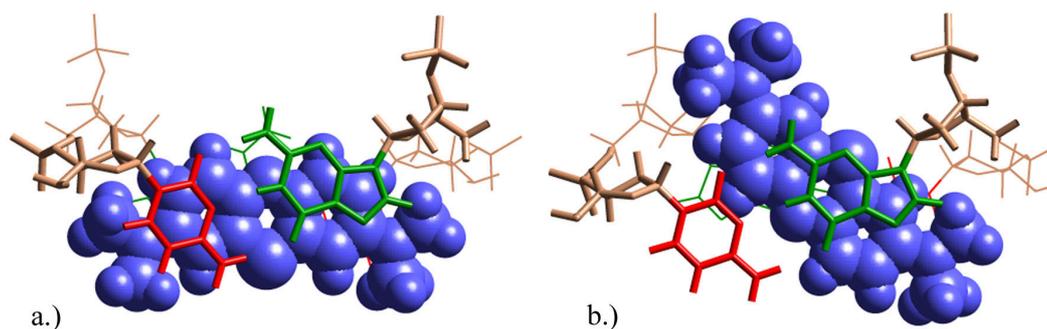


Abb. 6.3.: Methylenblau-DNA-Komplexe mit a.) symmetrischer und b.) gauche Interkalation des MB in den 5'-CpG-3'-Basenschritt

Außerdem wird durch eine Verdopplung des Rise und eine Verringerung des Twists eine Bindungstasche zwischen zentralen Basenpaaren der Dekamere geschaffen und Methylenblau in diese Bindungstasche mit einer Orientierung seines π -Elektronensystems senkrecht zur helikalen Achse eingeführt. In dieser Interkalationstasche wird eine adiabatische Suche durch Rotation des MB um die helikale Achse (in Analogie zum Twist der Basen) durchgeführt. Die Energieminimierungen führen zu einer großen Zahl von Konformationen, die lokalen Minima zuzuordnen sind. Detailliert diskutiert werden sollen diejenigen Strukturen, die nach der Energiekorrektur mit der FDPB-Methode Bindungsenergien aufweisen, die für den jeweiligen Bindungsmodus die stabilste Bindung anzeigen. Für diese Strukturen werden folgende Bezeichnungen gewählt:

ic1-RpY & ic1-YpR	Symmetrische Interkalation des MB in den 5'-RpY-3'- bzw. 5'-YpR-3'-Basenschritt: Die lange Achse des MB ist parallel zur langen Achse der flankierenden Basenpaare orientiert.
ic2-RpY & ic2-YpR	Gauche Interkalation des MB in den 5'-RpY-3'- bzw. 5'-YpR-3'-Basenschritt: Die lange Achse des MB ist um etwa 140°-145° um die helikale Achse rotiert.
AT-ming & AT-majg	MB ist in der kleinen bzw. großen Furche des Dekamers [(dA-dT) ₅] ₂ gebunden.
GC-ming & GC-majg	MB ist in der kleinen bzw. großen Furche des Dekamers [(dG-dC) ₅] ₂ gebunden.

Die adiabatische Suche in der Interkalationstasche führte zu jeweils zwei Konformationen, die durch den Twist des MB charakterisiert werden können. Die Konformationen mit interkalalierendem MB unterscheiden sich durch eine in Abb. 6.3 a.) dargestellte Orientierung der langen Achse des MB parallel zur langen Achse der flankierenden Basenpaare (symmetrische Interkalation) oder eine in Abb. 6.3 b.) dargestellte Rotation der langen Achse des MB um die helikale Achse um einen Betrag von etwa 140°-145°. Außerdem enthalten die AT und GC alternierenden Dekamere jeweils zwei mögliche Bindungstaschen für die Interkalation in den 5'-RpY-3'- oder 5'-YpR-3'-Basenschritt. Somit ergeben sich für jede der beiden Basensequenzen jeweils 6 MB-DNA-Komplexe (4 Interkalationen, 2 Furchenbindungen), die im folgenden energetisch und strukturell analysiert und diskutiert werden, wobei bei der energetischen Analyse die Bindungsenergien zunächst bei Vernachlässigung von Salzeffekten diskutiert werden.

6.1.1. Energetische Analyse der Methylenblau-DNA-Komplexe

Die elektrostatische Komponente E_{elec} der bei der Energieminimierung mit dem Kraftfeld FLEX berechneten Gesamtenergie E_{flex}^{tot} wird durch die elektrostatische Energie E_{cont} ersetzt, so daß die korrigierte Gesamtenergie E_{cont}^{tot} die Summe der nichtelektrostatischen Komponenten E_{ne} des Kraftfeldes FLEX und der elektrostatischen Energie E_{cont} ist. Die mit der Kontinuumsmethode berechnete elektrostatische Energie E_{cont} setzt sich dabei aus der Reaktionsfeldenergie E_{react} und der Coulomb-Energie der Komplexe E_{coul} zusammen:

$$E_{flex}^{tot} = E_{ne} + E_{elec} \quad (6.1)$$

$$E_{cont} = E_{react} + E_{coul} \quad (6.2)$$

$$E_{cont}^{tot} = E_{ne} + E_{cont} \quad (6.3)$$

Struktur	ΔE_{ne}	ΔE_{elec}	ΔE_{flex}^{tot}	ΔE_{coul}	ΔE_{react}	ΔE_{cont}	ΔE_{cont}^{tot}
	[kcal/mol]						
ic1-TpA	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
ic1-ApT	0,2	3,8	4,0	26,5	-25,4	1,1	1,3
ic2-TpA	3,5	3,4	6,9	30,0	-31,8	-1,8	1,7
ic2-ApT	7,5	6,6	14,1	29,9	-32,0	-2,1	5,4
AT-ming	-14,9	0,3	-14,6	163,0	-147,7	15,3	0,4
AT-majg	0,2	5,6	5,8	169,6	-165,2	4,4	4,6
ic1-CpG	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
ic1-GpC	-3,1	4,2	1,1	58,9	-55,7	3,2	0,1
ic2-CpG	1,9	0,7	2,6	7,8	-7,1	0,7	2,6
ic2-GpC	3,6	4,9	8,5	40,8	-42,0	-1,2	2,4
GC-ming	-12,0	0,2	-11,8	158,2	-144,2	14,0	2,0
GC-majg	-6,7	2,0	-4,7	152,9	-141,7	11,2	4,5

Tabelle 6.2.: Nichtelektrostatische E_{ne} und elektrostatische Komponenten E_{elec} der mit dem Kraftfeld FLEX [103] berechneten Gesamtenergie E_{flex}^{tot} . Reaktionsfeldenergie E_{react} und Coulomb-Energie E_{coul} der mit DelPhi [114, 115] berechneten elektrostatischen Energie E_{cont} und korrigierte Gesamtenergie E_{cont}^{tot} der Komplexe. Die Energien sind als Differenzen relativ zu dem für jedes Dekamer energetisch günstigsten MB-DNA-Komplex angegeben.

Die Auswahl der 6 MB-DNA-Komplexe für jedes der beiden Dekamere erfolgte nach dem Kriterium niedrigster Gesamtenergien nach Korrektur der elektrostatischen Komponente durch eine die elektrostatischen Lösungsmittelleffekte berücksichtigenden Kontinuumsbehandlung [114, 115]. Es zeigte sich, daß die energetische Rangfolge der Bindungsenergien der unterschiedlichen Bindungsmodi durch die Feinstruktur der Target-DNA nicht beeinflußt ist, so daß die Struktur der DNA nach demselben Kriterium niedrigster korrigierter Gesamtenergie bei einer Beschränkung auf die B-Form ausgewählt worden ist [53]. Die einzelnen Komponenten der mit dem Kraftfeld FLEX [103] berechneten und mit dem Algorithmus DelPhi [114, 115] korrigierten Gesamtenergien sind in Tab. 6.2 als Differenzen relativ zu den beiden MB-DNA-Komplexen ic1-TpA und

Struktur	ΔE_{def} ΔE_{int} ΔE_{bindg}			Struktur	ΔE_{def} ΔE_{int} ΔE_{bindg}		
	[kcal/mol]				[kcal/mol]		
ic1-TpA	8,9	-22,1	-13,2	ic1-CpG	5,7	-20,5	-14,8
ic1-ApT	6,6	-18,5	-11,9	ic1-GpC	3,0	-17,7	-14,7
ic2-TpA	10,6	-22,1	-11,5	ic2-CpG	6,2	-18,4	-12,2
ic2-ApT	10,9	-18,7	-7,8	ic2-GpC	5,7	-18,1	-12,4
AT-ming	6,3	-19,1	-12,8	GC-ming	3,0	-15,8	-12,8
AT-majg	3,7	-12,3	-8,6	GC-majg	2,0	-12,3	-10,3

Tabelle 6.3.: Deformationsenergien $\Delta E_{def} = \Delta E_{def}^{DNA} + \Delta E_{def}^{MB}$ der freien DNA-Dekamere und des freien MB als Differenzen der korrigierten Gesamtenergien E_{cont}^{tot} der im jeweiligen Komplex deformierten und der freien Strukturen. Wechselwirkungsenergien E_{int} der deformierten Strukturen und resultierende Bindungsenergien E_{bindg} der MB-DNA-Komplexe

ic1-CpG mit den für Bindung des MB mit jedem der beiden Dekamere $[(dA-dT)_5]_2$ und $[(dG-dC)_5]_2$ jeweils niedrigsten korrigierten Gesamtenergien E_{cont}^{tot} angegeben.

Die energetische Analyse der MB-DNA-Komplexe in Tab. 6.2 verdeutlicht den Einfluß der durch eine Kontinuumsbehandlung korrigierten elektrostatischen Komponente der Gesamtenergien auf die energetische Rangfolge der unterschiedlichen Bindungsmodi. Für die Bindung des MB mit dem AT alternierenden Dekamer wechselt bei der Korrektur die Rangordnung der energetischen Stabilität der Komplexe von „AT-ming/ic1-TpA/ic1-ApT/AT-majg/ic2-TpA/ic2-ApT“ bei einer Dämpfung der elektrostatischen Wechselwirkung durch eine abstandsabhängige Dielektrizitätsfunktion zu „ic1-TpA/AT-ming/ic1-ApT/ic2-TpA/AT-majg/ic2-ApT“ bei einer die elektrostatischen Lösungsmittelleffekte berücksichtigenden Kontinuumsbehandlung. Für die Bindung des MB mit dem GC alternierenden Dekamer wechselt bei dieser Korrektur die Rangordnung der energetischen Stabilität von „GC-ming/GC-majg/ic1-CpG/ic1-GpC/ic2-CpG/ic2-GpC“ zu „ic1-CpG/ic1-GpC/GC-ming/ic2-CpG/ic2-GpC/GC-majg“. Diese energetische Benachteiligung der Bindung des MB in den Furchen der DNA gegenüber der Interkalation infolge der Kontinuumsbehandlung beruht auf der in Tab. 6.2 angegebenen Destabilisierung der Komplexe mit Furchenbindung durch die mit der Kontinuumsmethode berechneten elektrostatischen Energie E_{cont} . Die Furchenbindungen des MB werden zwar durch die Reaktionsfeldenergie E_{react} infolge der besseren Lösungsmittelzugänglichkeit des Liganden deutlich stärker als die Interkalationskomplexe stabilisiert, dieser Effekt wird aber, wie in Tab. 6.2 ersichtlich, durch größere abstoßende Coulomb-Wechselwirkungen innerhalb des MB-DNA-Komplexes überkompensiert.

In Tab. 6.3 sind die Werte der Deformationsenergien ΔE_{def} der im Komplex deformierten Konformationen gegenüber den Konformationen der freien DNA-Dekamere und des freien MB angegeben. Außerdem finden sich in Tab. 6.3 die Wechselwirkungsenergien der deformierten Konformationen der Dekamere DNA* und des MB* im Komplex DNA*/MB* und die daraus resultierenden Bindungsenergien der einzelnen MB-DNA-Komplexe:

$$E_{int} = E_{cont}^{tot}(DNA^*/MB^*) - E_{cont}^{tot}(DNA^*) - E_{cont}^{tot}(MB^*) \quad (6.4)$$

$$E_{bindg} = E_{cont}^{tot}(DNA^*/MB^*) - E_{cont}^{tot}(DNA) - E_{cont}^{tot}(MB) = E_{int} + E_{def} \quad (6.5)$$

Die Deformationsenergien ΔE_{def} in Tab. 6.3 der Interkalationskomplexe sind größer als die Deformationsenergien der Komplexe mit Furchenbindung. Dieser Unterschied wird im Vergleich der Darstellungen der Interkalationskomplexe in Abb. 6.1 und der Komplexe mit Furchenbindung in Abb. 6.2 deutlich, denn die Interkalation erfordert eine zur Deformation der DNA beitragende Bindungstasche. Im Gegensatz zu den Deformationsenergien begünstigen die Wechselwirkungsenergien E_{int} die Interkalationskomplexe gegenüber den Komplexen mit Furchenbindung. Die geringere Stabilität der Komplexe mit einer gauche Interkalation, bei der die lange Achse des MB um einen Betrag von etwa 140° - 145° um die helikale Achse gedreht ist, gegenüber den Komplexen mit symmetrischer Interkalation ist hauptsächlich auf eine stärkere Deformation der Dekamere dieser Komplexe zurückzuführen.

Die in Tab. 6.3 angegebenen Bindungsenergien bei Vernachlässigung von Salzeffekten deuten bei der Bindung des MB mit beiden Dekameren auf eine Bevorzugung der symmetrischen Interkalation in den 5'-YpR-3'-Basenschritt mit $-13,2$ kcal/mol für den Komplex ic1-TpA und $-14,8$ kcal/mol für den Komplex ic1-CpG hin. Die Bindungsenergie von $-12,8$ kcal/mol des Komplexes mit Bindung des MB in der kleinen Furche des AT alternierenden Dekamers ist gegenüber der Interkalation in den TpA-Basenschritt allerdings nur um $0,4$ kcal/mol energetisch benachteiligt. Die symmetrische Interkalation in den 5'-ApT-3'-Basenschritt liegt mit $-11,9$ kcal/mol bereits um $1,3$ kcal/mol unter der Bindungsenergie des Komplexes ic1-TpA. Im Gegensatz dazu unterscheiden sich die Bindungsenergien der symmetrischen Interkalationen in den 5'-CpG-3'- mit $-14,8$ kcal/mol und in den 5'-GpC-3'-Basenschritt mit $-14,7$ kcal/mol nur um $0,1$ kcal/mol. Wenn man berücksichtigt, daß die Bindungsenergien zwar in der richtigen Größenordnung liegen, aber aus Differenzen sehr großer absoluter Energien hervorgehen, die gewisse Fehlertoleranzen aufweisen, können die beiden in Abb. 6.1 dargestellten Interkalationskomplexe als energetisch gleichermaßen bevorzugt betrachtet werden. Die Komplexe mit der gauche Interkalation in die beiden Bindungstaschen des GC alternierenden Dekamers unterscheiden sich ebenfalls energetisch kaum, sind aber gegenüber den symmetrischen Interkalationen energetisch benachteiligt. Die reduzierte Stapelwechselwirkung in dem Komplex ic2-CpG wird in Abb. 6.3 im Vergleich zum Komplex ic1-CpG ersichtlich. Die in Abb. 6.2 dargestellte a.) Bindung des MB in der kleinen Furche des GC alternierenden Dekamers ist mit $-12,8$ kcal/mol günstiger als die gauche Interkalationen aber um $2,0$ kcal/mol gegenüber dem Komplex ic1-CpG energetisch benachteiligt. Die Bindungen des MB in der großen Furche beider Dekamere, von denen der Komplex GC-majg in Abb. 6.2 b.) dargestellt ist, sind gegenüber den anderen Bindungsmodi energetisch unvorteilhaft.

6.1.2. Strukturelle Analyse der Methylenblau-DNA-Komplexe

Die für jedes der beiden Dekamere 6 verschiedenen, die Bindungsmodi repräsentierenden MB-DNA-Komplexe sind mit dem Algorithmus Curves [13, 14] strukturell analysiert worden. Die Dyadensymmetrien der freien DNA-Dekamere $[(dA-dT)_5]_2$ und $[(dG-dC)_5]_2$ mit palindromen Basensequenzen sind in den Komplexen mit paralleler Interkalation des MB, also in den Komplexen ic1-YpR und ic1-RpY, erhalten geblieben, weshalb diese Interkalation auch als symmetrische Interkalation bezeichnet wird. In diesen Komplexen fällt die Symmetrieachse des MB mit der Dyadenachse der Dekamere zusammen.

6.1. Sequenzspezifische Bindung von Methylenblau und DNA-Dekameren

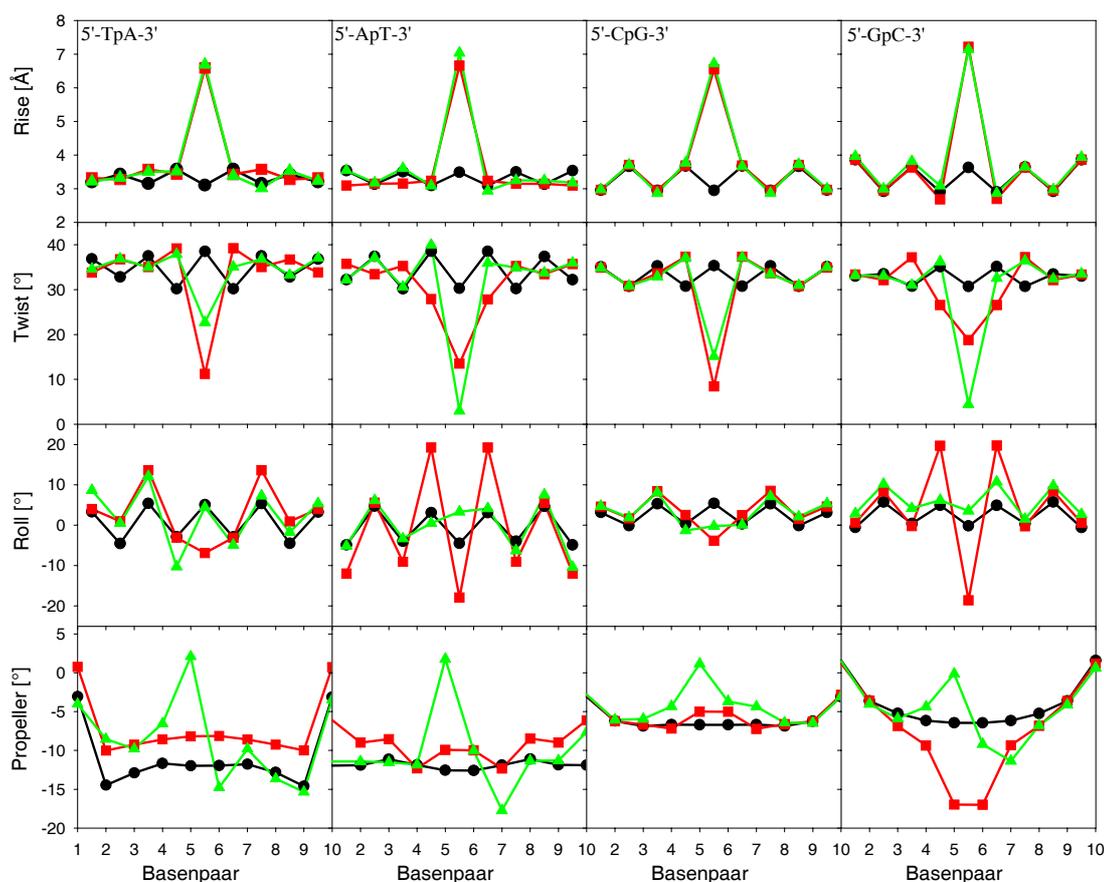


Abb. 6.4.: Helikale Parameter *Rise*, *Twist*, *Roll* und *Propeller* der freien DNA-Dekamere (schwarz), der MB-DNA-Komplexe mit symmetrischer (rot) und gauche (grün) Interkalation des MB in den zentralen Basenschritt zwischen dem 5. und 6. Basenpaar. Vergleich der Interkalationen in den 5'-YpR-3'- und 5'-RpY-3'-Basenschritt AT und GC alternierender Dekamere.

Die Dyadensymmetrie der freien DNA-Dekamere und der Komplexe mit symmetrischer Interkalation des MB wird in der Darstellung helikaler Parameter in Abb. 6.4 ersichtlich. Die helikalen Parameter verdeutlichen, daß die Konformationen der Target-DNA bei Interkalationen in die beiden Bindungstaschen eines Dekamers signifikante Unterschiede aufweisen, wohingegen sich die Interkalationen in die 5'-YpR-3'-Basenschritte wie die Interkalationen in die 5'-RpY-3'-Basenschritte der beiden unterschiedlichen Dekamere wenig unterscheiden. Gemeinsam ist allen Interkalationkomplexen die Erhöhung des Rise (6,6 Å beim ic1-TpA-, 6,7 Å beim ic1-ApT-, 6,6 Å beim ic1-CpG- und 7,2 Å beim ic1-GpC-Komplex) und die Verringerung des Twist (11° beim ic1-TpA-, 14° beim ic1-ApT-, 8° beim ic1-CpG- und 19° beim ic1-GpC-Komplex) zwischen den die Bindungstasche bildenden Basenpaaren. Dabei weist der Twist bei symmetrischen Interkalationen in den 5'-YpT-3'-Basenschritt im Vergleich zu den gauche Interkalationen einen kleineren Wert auf. Im Gegensatz dazu liegt der Twist bei symmetrischen Interkalationen in den 5'-RpY-3'-Basenschritt über dem Twist bei gauche Interkalationen in diesen Basenschritt. Signifikant sind in Abb. 6.4 außerdem, die größeren Variationen des Roll zwischen -20° und 22° bei symmetrischen Interkalationen in den 5'-RpY-3'-Basenschritt beider Dekamere gegenüber symmetrischen Interkalationen in

6. Sequenz- und Salzeffekte der Methylenblau-DNA-Bindung

Struktur	d^m	w^m	d^M	w^M	Struktur	d^m	w^m	d^M	w^M
	[Å]					[Å]			
[(dA-dT) ₅] ₂	6,3	4,7	12,5	6,5	[(dG-dC) ₅] ₂	6,9	4,2	12,5	7,7
ic1-TpA	7,4	5,0	19,9	5,3	ic1-CpG	9,5	3,2	18,1	4,0
ic1-ApT	11,7	0,1	18,2	9,1	ic1-GpC	10,8	3,2	16,0	7,6
ic2-TpA	7,8	4,7	16,0	2,3	ic2-CpG	8,8	3,6	17,1	3,8
ic2-ApT	11,3	3,9	18,0	5,0	ic2-GpC	11,2	2,9	16,9	7,1
AT-ming	5,0	5,5	12,8	5,0	GC-ming	4,7	5,5	13,7	5,6
AT-majg	7,3	4,3	10,2	7,4	GC-majg	7,9	3,6	9,2	9,3

Tabelle 6.4.: *Furchentiefen d und -weiten w der kleinen (minor) bzw. großen (Major) Furche der DNA-Dekamere und der MB-DNA-Komplexe*

den 5'-YpR-3'-Basenschritt. Der Propeller hingegen zeigt bei allen gauche Interkalationen deutliche Variationen zwischen den der Bindungstasche benachbarten Basenpaaren. Nur bei der symmetrischen Interkalation in den 5'-GpC-3'-Basenschritt weist der Propeller der die Interkalationstasche flankierenden Basenpaare mit -17° große negative Werte auf, die auch in Abb. 6.1 im Vergleich der Komplexe ic1-CpG und ic1-GpC deutlich erkennbar sind. Die in Abb. 6.4 dargestellten Unterschiede in den helikalen Parametern der verschiedenen Interkalationskomplexe könnten durch die Zuckerkaltung der die Bindungstasche flankierenden Nukleotide bedingt sein. Die Zuckerkonformation der die Bindungstasche flankierenden Nukleotide bei allen Interkalationen in eine 5'-YpR-3'-Bindungstasche unterscheidet sich mit 5'-Y(C3'-endo)>p<R(C2'-endo)-3' von der Zuckerkonformation bei allen Interkalationen in eine 5'-RpY-3'-Bindungstasche mit 5'-R(C3'-endo)>p<Y(C3'-endo)-3'. Diese Analogie in der Konformation der unterschiedlichen Interkalationskomplexe wird durch einen bei allen diesen Komplexen beobachteten α/γ -Flip im Nukleinsäure-Rückgrat unmittelbar zwischen den die Interkalationstasche bildenden Nukleotiden ergänzt.

Die Deformation der Target-Dekamere äußert sich auch in den Furchengeometrien, deren Charakterisierung durch Furchentiefen und -weiten in Kap. 2.2.2 erläutert wurde. Die für die einzelnen MB-DNA-Komplexe mit dem Algorithmus Curves [18] berechneten Furchentiefen und -weiten sind in Tab. 6.4 im Vergleich zu den freien DNA-Dekameren angegeben. Beide Furchen zeigen bei allen Interkalationskomplexen an der Bindungstasche eine vergrößerte Furchenweite und eine verkleinerte Furchentiefe, die durch das Stretching und Unwinding der Doppelhelix bedingt sind. Bei den Komplexen mit Bindung des MB in den Furchen fällt in Tab. 6.4 auf, daß diejenige Furche, in der das MB jeweils gebunden ist, vertieft und verengt ist, während die andere Furche dementsprechend eine verringerte Tiefe und vergrößerte Weite aufweist. Bei der Bindung in beiden Furchen sind die Methylgruppen und das Schwefelatom nach außen gerichtet, so daß eine Vertiefung und Verengung der Furche, in der sich das MB befindet, die Bindung stabilisieren kann.

Die Lage und Orientierung des MB ist in Tab. 6.5 relativ zum helikalen Achsensystem des benachbarten Basenpaares durch helikale Parameter charakterisiert, die für den Liganden in Kap. 4.2.4 definiert worden sind. Die helikalen Parameter der Komplexe mit symmetrischer Interkalation des MB in Tab. 6.5 verdeutlichen, daß der Farbstoff im Zentrum der Bindungstasche positioniert ist und daß seine Methylgruppen in die große Furche zeigen. Die lange Achse des MB ist in den Komplexen mit gauche Interka-

Struktur	Xdisp [Å]	Ydisp [Å]	Rise [Å]	Inc [°]	Tip [°]	Twist [°]
ic1-TpA	2,1	0,0	3,3	-4,0	0,5	4,9
ic1-ApT	1,0	0,0	3,3	2,1	-0,1	6,4
ic2-TpA	2,5	0,8	2,9	1,4	12,8	141,4
ic2-ApT	2,9	0,6	3,5	2,9	-1,1	144,7
AT-ming	8,1	0,8	0,3	27,3	-5,1	174,1
AT-majg	5,1	1,5	2,6	0,5	-38,4	7,0
ic1-CpG	0,9	-0,1	3,3	-5,1	-0,3	4,0
ic1-GpC	1,4	-0,2	3,7	-5,8	-5,1	8,6
ic2-CpG	3,4	1,0	3,1	3,7	9,6	142,5
ic2-GpC	2,8	0,0	3,4	10,0	3,9	145,5
GC-ming	9,6	-1,2	0,0	34,4	0,9	-170,8
GC-majg	5,9	-0,2	1,4	-14,1	3,3	15,6

Tabelle 6.5.: *Helikale Parameter X- und Y-Displacement, Rise, Inclination, Tip sowie Twist des Liganden Methylenblau relativ zu dem direkt benachbarten Basenpaar im globalen helikalen Achsensystem der DNA*

lation um einen Twist von ca. 141,4°-145,5° um die helikale Achse gedreht. Außerdem zeigt das X-Displacement an, daß der Farbstoff bei den gauche Interkalationen etwas in Richtung der kleinen Furche verschoben ist. Die helikalen Parameter der Komplexe mit Furchenbindung verdeutlichen, daß bei der Bindung in der kleinen Furche die lange Achse des MB parallel zu den DNA-Strängen orientiert ist, während das MB bei der Bindung in der großen Furche diese Furche aufspannt. Der Rise von 0,3 Å bzw. 0,0 Å bei Bindung des MB in der kleinen Furche bestätigt, daß die Achse des Stickstoff- und Schwefelatoms im zentralen Ring des MB in der Ebene eines Basenpaares liegt. Eine Wasserstoffbrücke zwischen dem in die kleine Furche gerichteten Stickstoffatom des MB und einem Proton der Aminogruppe eines Guanins der DNA kann diese Bindung stabilisieren. Bei der Bindung in der großen Furche muß dagegen auch aufgrund der kleineren Bindungsenergie und der vielen alternativen Strukturen von einer großen Beweglichkeit des MB ausgegangen werden, die in Kap. 7 diskutiert werden wird.

6.2. Salzabhängigkeit der Methylenblau-DNA-Bindung

In spektroskopischen Untersuchungen ist eine Abhängigkeit der MB-DNA-Bindung von der Salzkonzentration nachgewiesen worden [170, 173, 174]. Diese Salzabhängigkeit wirkt sich in der Verschiebung relativer Stabilitäten alternativer Bindungsmodi aus, denn für AT reiche Basensequenzen konnte in CD-Messungen gezeigt werden, daß das MB bei sehr geringen Salzkonzentrationen interkaliert, wohingegen bei etwas höheren Salzkonzentrationen eine nichtinterkalative Bindung ausgebildet wird, die mit der Bindung in der kleinen Furche assoziiert wird [100]. Theoretische Untersuchungen konnten zeigen, daß Salzeffekte zwar relative Stabilitäten beeinflussen können, Konformationen aber weitgehend von Salzeffekten unbeeinflusst sind [122, 123, 175]. Deshalb werden die Bindungsenergien der in Kap. 6.1 diskutierten MB-DNA-Komplexe unter der Berücksichtigung von Salzeffekten abgeschätzt.

Dazu wurde mit der in Kap. 3.1.3 erläuterten FDPB-Methode die nichtlineare Poisson-Boltzmann-Gleichung 3.21 unter Anwendung des Algorithmus UHBD [119] für die ein-

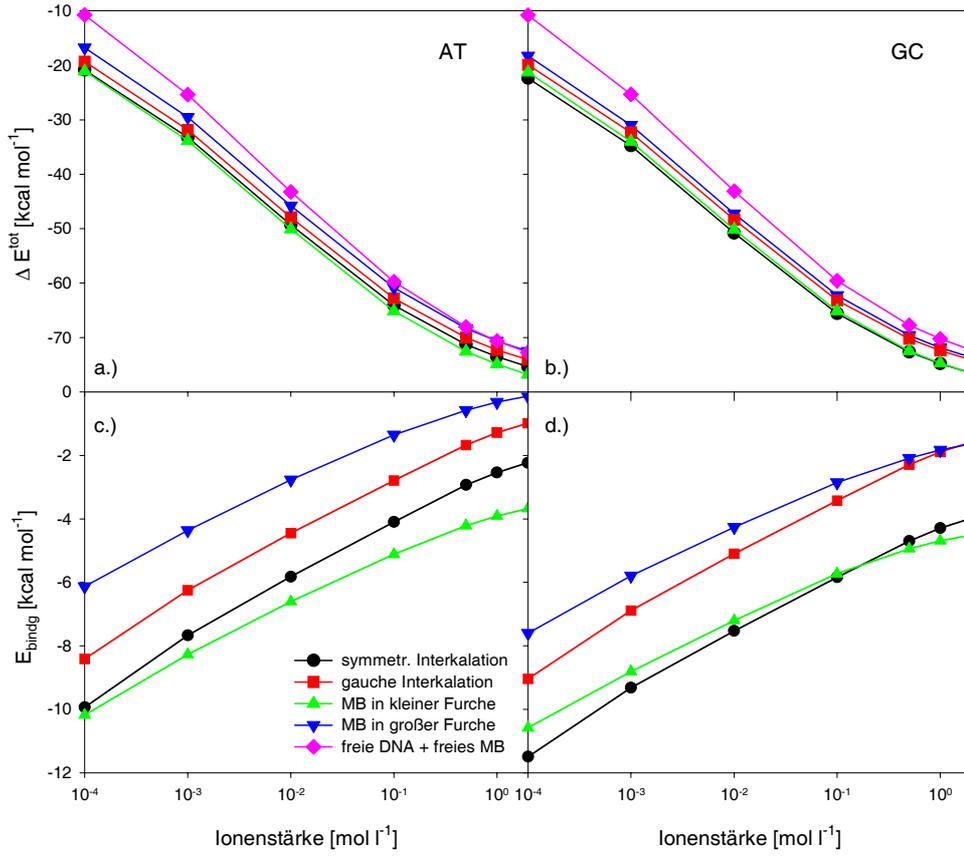


Abb. 6.5.: Gesamtenergien ΔE_{cont}^{tot} des freien a.) AT und b.) GC alternierenden Dekamers zzgl. des freien MB und der jeweiligen MB-DNA-Komplexe sowie Bindungsenergien E_{bindg} der MB-DNA-Komplexe bei Bindung des MB und des Dekamers c.) $[(dA - dT)_5]_2$ und d.) $[(dG - dC)_5]_2$ in Abhängigkeit von der Salzkonzentration.

zelen MB-DNA-Komplexe gelöst, wobei die Ionenstärke von 10^{-4} -2,0 mol/l variiert wurde. Den Rechnungen wurden die im Kraftfeld FLEX definierten Ladungsverteilungen der Nukleotide [171] und die in Tab. 6.1 angegebene Ladungsverteilung des MB zugrunde gelegt. Das dem Lösungsmittel unzugängliche Volumen der MB-DNA-Komplexe wurde durch den Mittelpunkt einer auf der van-der-Waals-Oberfläche des Komplexes abgerollten Kugel mit einem Radius von 1,4 Å definiert. Dem Inneren dieser Oberfläche wurde eine dielektrische Permittivität von $\epsilon = 1$ und dem Lösungsmittel ein Wert von $\epsilon = 78$ zugewiesen. Nach Rashin und Honig wurde zudem eine Schicht auf der Oberfläche des Komplexes definiert, die dem Lösungsmittel nicht aber den Ionen zugänglich ist, indem den Ionen ein Radius von $R = 1,68$ Å zugewiesen wurde [120]. Außerdem wurde die dielektrische Grenze mit dem Algorithmus UHBD geglättet, um die Abhängigkeit der Resultate vom verwendeten Gitter mit 120 Gitterpunkten in jeder Raumrichtung zu verringern. In drei Fokussierungsschritten wurde eine Gitterkonstante von $< 0,33$ Å erreicht. Die elektrostatische Energie wurde nach dem von Sharp und Honig angegeben, in Kap. 3.1.3 erläuterten Volumenintegral 3.22 berechnet [121].

Die elektrostatischen Energien E_{cont} wurden für die in Kap. 6.1 diskutierten 12 MB-DNA-Komplexe sowie die freien DNA-Dekamere $[(dA-dT)_5]_2$ und $[(dG-dC)_5]_2$ in Abhängigkeit von einer monovalenten Salzkonzentration von 10^{-4} -2 mol/l berechnet.

6.2. Salzabhängigkeit der Methylenblau-DNA-Bindung

Ionenstärke	0,0	10^{-4}	10^{-3}	10^{-2}	0,1	0,5	1,0	2,0
	[mol/l]							
Struktur	E_{bindg} [kcal/mol]							
ic1-TpA	-13,2	-9,9	-7,7	-5,8	-4,1	-2,9	-2,5	-2,2
ic1-ApT	-11,9	-8,8	-6,5	-4,7	-3,0	-1,8	-1,4	-1,0
ic2-TpA	-11,5	-8,4	-6,2	-4,4	-2,8	-1,7	-1,3	-1,0
ic2-ApT	-7,8	-4,7	-2,4	-0,6	1,1	2,2	2,7	3,0
AT-ming	-12,8	-10,2	-8,3	-6,6	-5,1	-4,2	-3,9	-3,7
AT-majg	-8,6	-6,2	-4,4	-2,8	-1,4	-0,6	-0,3	-0,1
ic1-CpG	-14,8	-11,5	-9,3	-7,5	-5,8	-4,7	-4,3	-4,0
ic1-GpC	-14,7	-11,8	-9,8	-8,0	-6,4	-5,3	-5,0	-4,7
ic2-CpG	-12,2	-9,0	-6,9	-5,1	-3,4	-2,3	-1,9	-1,6
ic2-GpC	-12,4	-9,4	-7,3	-5,5	-3,8	-2,7	-2,4	-2,1
GC-ming	-12,8	-10,6	-8,8	-7,2	-5,7	-4,9	-4,7	-4,5
GC-majg	-10,3	-7,6	-5,8	-4,3	-2,8	-2,1	-1,8	-1,6

Tabelle 6.6.: Bindungsenergien E_{bindg} der in Kap. 6.1 diskutierten MB-DNA-Komplexe in Abhängigkeit von der Salzkonzentration

Die sich mit diesen salzabhängigen, elektrostatischen Energien E_{cont} ergebenden Gesamtenergien E_{cont}^{tot} sind relativ zu den jeweiligen Gesamtenergien bei Salzfreiheit für das freie Dekamer $[(dA-dT)_5]_2$ zzgl. des MB und die Komplexe ic1-TpA, ic2-TpA, AT-ming und AT-majg in Abb. 6.5 a.) und für das freie Dekamer $[(dG-dC)_5]_2$ zzgl. des MB und die Komplexe ic1-CpG, ic2-CpG, GC-ming und GC-majg in Abb. 6.5 b.) als Funktion des dekadischen Logarithmus der Salzkonzentration dargestellt. Zur Veranschaulichung der Energiedifferenzen ΔE_{cont}^{tot} der salzabhängigen Gesamtenergien in Abb. 6.5 relativ zu den Gesamtenergien der jeweiligen Komplexe bei Salzfreiheit wurden die in Tab. 6.3 angegebenen Bindungsenergien als Nullpunkt definiert. Wegen des dabei sehr ähnlichen Verhaltens der Interkalationskomplexe beschränkt sich die Abb. 6.5 auf die symmetrischen Interkalationskomplexe ic1-YpR und die gauche Interkalationskomplexe ic2-YpR. In den Abbn. 6.5 a.) und b.) ist deutlich erkennbar, daß die freien Strukturen (Dekamere zzgl. des geringen Beitrages des freien MB) mit steigender Salzkonzentration stärker als die MB-DNA-Komplexe stabilisiert werden. Nukleinsäuren werden aufgrund ihrer polyanionischen Ladung durch Salz stabilisiert. Da die Ladung der MB-DNA-Komplexe mit $q = -17e$ gegenüber der Ladung der freien Dekamere mit $q = -18e$ um die Ladung des MB von $q = +e$ reduziert ist, werden die MB-DNA-Komplexe durch das Salz relativ zu den freien Dekameren weniger stabilisiert. Die relative Stabilität der Komplexe zueinander verändert sich durch das Salz nur leicht.

Diese Verschiebung relativer Stabilitäten wird durch die Darstellung der Bindungsenergien E_{bindg} für die Komplexe ic1-TpA, ic2-TpA, AT-ming und AT-majg in Abb. 6.5 c.) und für die Komplexe ic1-CpG, ic2-CpG, GC-ming und GC-majg in Abb. 6.5 d.) als Funktion des dekadischen Logarithmus der Salzkonzentration verdeutlicht und in Tab. 6.6 angegeben. Aufgrund der geringeren Stabilisierung der Komplexe gegenüber den freien Dekameren verringern sich die Bindungsenergien aller Komplexe mit zunehmender Salzkonzentration. In den Abbn. 6.5 c.) und d.) ist eine geringere Abnahme der Bindungsenergien der Komplexe mit Bindung des MB in den Furchen der Dekamere gegenüber den Interkalationskomplexen zu beobachten. Dabei ist die Bindung des

MB in der kleinen Furche des AT alternierenden Dekamers bereits bei der geringen Salzkonzentration von 10^{-4} mol/l mit -10,2 kcal/mol gegenüber der symmetrischen Interkalation mit -9,9 kcal/mol energetisch bevorzugt, obwohl bei Salzfreiheit in Kap. 6.1 noch die symmetrische Interkalation gegenüber der Bindung in der kleinen Furche energetisch begünstigt war. Im Gegensatz dazu bleibt bei der Bindung des MB mit dem GC alternierenden Dekamer die symmetrische Interkalation bis zu hohen Salzkonzentrationen von > 1 mol/l gegenüber der Bindung in der kleinen Furche energetisch bevorzugt. Erst bei weiter steigender Salzkonzentration wechselt die energetische Präferenz von der symmetrischen Interkalation zur Bindung in der kleinen Furche. Auch erreicht die Bindungsenergie für die Bindung in der großen Furche des GC alternierenden Dekamers bei einer sehr hohen Salzkonzentration von 2 mol/l die Bindungsenergie der gauche Interkalation, wohingegen bei der Bindung des MB mit dem GC alternierenden Dekamer die gauche Interkalation gegenüber der Bindung in der großen Furche bevorzugt bleibt. Die Salzabhängigkeit der MB-DNA-Bindung erweist sich somit als sequenzabhängig, denn während bei der Bindung des MB mit dem AT alternierenden Dekamer bereits bei einer geringen Salzkonzentration von 10^{-4} mol/l die Bindung in der kleinen Furche zum energetisch gegenüber der symmetrischen Interkalation bevorzugten Bindungsmodus wird, erfolgt diese Veränderung der relativen Stabilitäten von der symmetrischen Interkalation zur Bindung in der kleinen Furche bei der Bindung des MB mit dem GC alternierenden Dekamer erst bei hohen Salzkonzentrationen von > 1 mol/l.

6.3. Diskussion der Resultate, Teil II

Die Sequenzabhängigkeit der MB-DNA-Bindung wurde anhand des Vergleichs der Bindung des MB mit den DNA-Dekameren $[(dA-dT)_5]_2$ und $[(dG-dC)_5]_2$ untersucht, da für die Bindung des MB an Polynukleotide mit alternierenden Basensequenzen vergleichende experimentelle Daten vorliegen [100, 173]. Durch Energieminimierungen wurden für jedes der beiden Dekamere jeweils 6 MB-DNA-Komplexe generiert, die die Bindung des MB in den drei unterschiedlichen Bindungsmodi (Interkalation, Bindung in der kleinen bzw. der großen Furche) repräsentieren. Berücksichtigt wurden bei der Auswahl der Komplexe nach energetischen Kriterien elektrostatische Lösungsmittelleffekte durch die Berechnung der elektrostatischen Energien in einer Kontinuumsbehandlung des Lösungsmittels [53].

Für die Bindung zwischen MB und Polynukleotiden mit alternierenden GC Basensequenzen wurde in Absorptions- und LD-Messungen gezeigt, daß die Interkalation unabhängig von einer Salzkonzentration und dem Bindungsverhältnis der einzige Bindungsmodus ist [100]. Dagegen weisen Absorptions-Spektren für die Bindung zwischen MB und Polynukleotiden mit alternierenden AT Basensequenzen auch bei einem geringen Bindungsverhältnis auf die Interkalation und eine nichtinterkalative Bindung als zwei koexistierende Bindungsmodi hin [173]. In spektroskopischen Untersuchungen wurde gezeigt, daß MB durch Interkalation bevorzugt mit einem GC-Basenpaar gegenüber einem AT-Basenpaar wechselwirkt [167]. Die Fluoreszenz-Quantenausbeute des MB ist in der Umgebung GC reicher Sequenzen stark vermindert, wohingegen sie in der Umgebung AT reicher Sequenzen nahezu der Fluoreszenz-Quantenausbeute des freien Farbstoffs entspricht [169]. Die Lebenszeit des Singulett-Zustandes des MB erwies sich in einer fs-Transientenabsorptions-Messung als stark durch GC und nur wenig durch

AT enthaltende Polynukleotide beeinflusst [176]. Diese experimentellen Daten sind somit sehr gut mit den in Kap. 6.1 angegeben theoretischen Resultaten vereinbar, wonach MB in salzfreier Umgebung mit beiden Dekameren eine Bindung durch Interkalation eingeht und wonach die Bindung in der kleinen Furche des AT alternierenden Dekamers energetisch der Interkalation gegenüber nahezu gleichwertig ist.

Tuite und Nordén beobachteten für die Bindung des MB mit AT und GC alternierenden Polynukleotiden sehr unterschiedliche CD-Spektren, wobei das MB bei geringen Ionenstärken mit beiden Polynukleotiden eine Bindung durch Interkalation eingeht [100]. Das CD-Signal des an das AT alternierende Polynukleotid gebundenen MB zeigte einen kleinen Betrag bei geringen und einen deutlich größeren Betrag bei hohen Ionenstärken, wobei die Rotverschiebung des Signals mit steigender Salzkonzentration zunahm und das CD-Signal über das gesamte Spektrum der Ionenstärken ein positives Vorzeichen besaß, so daß mit wachsender Ionenstärke von einer zunehmenden Stabilisierung einer nichtinterkalativen gegenüber der interkalativen Bindung ausgegangen werden kann [100]. Aus den CD-Daten erschließt sich nicht, ob die nichtinterkalative Bindung einer Bindung in der kleinen oder der großen Furche entspricht. Allerdings kann aus LD-Messungen auf eine Bindung des MB in entweder einem großen Winkel relativ zur helikalen Achse oder einer ungerichteten Orientierung geschlossen werden [100]. Tuite und Nordén berechneten aufgrund des LD-Signals mit kleinem negativen Betrag einen Winkel von ca. 56° - 58° zwischen der langen Achse des MB und der helikalen Achse des Polynukleotids, wobei dieses Signal auch eine ungerichtete Orientierung erklären kann [100]. Eine vollkommen ungerichtete Orientierung des Farbstoffs ist auch in der großen Furche nicht möglich, obgleich das MB dort eine große Bewegungsfreiheit haben dürfte. Aber der Steigungswinkel der kleinen Furche einer DNA in B-Form entspricht in etwa dem aus dem LD-Signal berechneten Orientierungswinkel des MB, so daß bei Annahme einer im Komplex AT-ming ausgebildeten Orientierung der langen Achse des MB parallel zu den flankierenden DNA-Strängen von der Bindung in der kleinen Furche ausgegangen werden kann.

Bei der Bindung des MB an das GC alternierende Polynukleotid konnten Tuite und Nordén zwei CD-Signale mit entgegengesetzten Vorzeichen und Verschiebungen beobachten, die auf zwei verschiedene, koexistierende interkalative Bindungsmodi hinweisen, die als Interkalationen in den beiden Bindungstaschen $5'$ -CpG- $3'$ und $5'$ -GpC- $3'$ interpretiert werden [100]. Diese Interpretation der CD-Daten wird durch die nahezu gleiche energetische Stabilität der MB-DNA-Komplexe ic1-CpG und ic1-GpC unterstützt. Die CD-Daten zeigten eine starke Abhängigkeit von der Lage und Orientierung des MB in der Bindungstasche, so daß die gauche Interkalationen als alternative Interkalationsmodi unwahrscheinlich sind [100], was sich auch in den theoretischen Resultaten durch eine energetische Benachteiligung der gauche gegenüber den symmetrischen Interkalationen ausdrückt. Damit befinden sich die theoretischen Resultate in sehr guter Übereinstimmung mit den CD- und LD-Daten für die Bindung des MB sowohl an das AT als auch an das GC alternierende Polynukleotid. Die strukturelle Kenntnis von MB-DNA-Komplexen ermöglicht zudem eine detailliertere Diskussion und Bewertung der experimentellen Daten.

Ausgehend von Dichroismus- und Topoisomerisations-Messungen wird die Verlängerung einer DNA-Helix durch die Interkalation eines MB-Moleküls mit $2,9 \text{ \AA}$ und das damit verbundene Unwinding mit 24° angegeben [163, 168], das einem Twist von ca. 10° entsprechen würde. Die Zuckerkaltungsmodi der das MB-Molekül flankierenden Nu-

kleotide sind in Röntgenkristallstrukturen von Komplexen mit anderen interkalierenden Liganden bereits beobachtet worden [77].

Die Salzabhängigkeit beeinflusst nach den Resultaten in Kap. 6.2 die relativen Stabilitäten der Bindungsmodi bei der Bindung des MB an das AT alternierende Dekamer schon bei geringen Salzkonzentrationen von 10^{-4} mol/l durch einen Wechsel von der symmetrischen Interkalation zur Bindung in der kleinen Furche als energetisch bevorzugtem Bindungsmodus, während diese Stabilitätsverschiebung bei der Bindung des MB an das GC alternierende Dekamer erst bei hohen Salzkonzentrationen von > 1 mol/l zu erwarten ist. Lumineszenz-Messungen nach optischer Anregung durch Laserstrahlung zeigten, daß MB bei sehr geringen Salzkonzentrationen hauptsächlich durch Interkalation eine Bindung mit AT alternierenden Polynukleotiden eingeht, die mit steigender Salzkonzentration in eine nichtinterkalative Bindung übergeht, wohingegen das MB an GC alternierende Polynukleotide durch Interkalation gebunden bleibt [170]. Spektroskopische Untersuchungen berichten über eine Reduktion der Bindung mit zunehmender Salzkonzentration unabhängig vom Bindungsmodus [162, 174]. Tuite und Kelly geben Bindungskonstanten an, die für die Bindung des MB mit AT und GC alternierenden Polynukleotiden in der gleichen Größenordnung liegen, wobei sich die Bindung an das GC alternierende Polynukleotid als etwas stabiler im Vergleich zur Bindung an das AT alternierende Polynukleotid erweist [173], womit diese Daten sehr gut mit den in Tab. 6.3 angegebenen Bindungsenergien korrespondieren. Die spektroskopischen Daten interpretieren die Bindung des MB an das GC alternierende Polynukleotid als etwas stärker von der Salzkonzentration beeinflusst als die Bindung des MB an das AT alternierende Polynukleotid [170]. Außerdem wird über eine unterschiedliche Abhängigkeit der Bindung des MB an das AT alternierende Polynukleotid im Vergleich zu Polynukleotiden mit anderen Sequenzen berichtet, was auf einen nichtinterkalativen Bindungsmodus hinweist [173]. Die experimentellen Erkenntnisse über die Salzabhängigkeit der Bindung des MB an das GC alternierende Dekamer und über einen nichtinterkalativen Bindungsmodus bei Bindung des MB an das AT alternierende Dekamer, sind mit den theoretischen Resultaten erklärbar. Tuite und Kelly führten die Bindungsstudien bei Ionenstärken von 10^{-3} - 1 mol/l durch [173]. Für diesen gegenüber den theoretischen Untersuchungen bei Ionenstärken von 10^{-4} - 2 mol/l eingeschränkten Bereich, ist bei der Bindung des MB an das AT alternierende Dekamer die Bindung des MB in der kleinen Furche energetisch relativ stabil. Dagegen nimmt bei der Bindung des MB an das GC alternierende Dekamer die energetische Stabilisierung der Interkalation gegenüber der Bindung in der kleinen Furche mit steigender Ionenstärke ab, so daß bei Ionenstärken von 0,5-1,5 mol/l eine Koexistenz von Interkalation und Bindung in der kleinen Furche zu erwarten ist. Dieser experimentell und theoretisch erwartete Effekt spiegelt damit die Salzabhängigkeit der Bindung des MB an das GC alternierende Dekamer wider, während die Bindung des MB in der kleinen Furche des AT alternierenden Dekamers zur Stabilisierung lediglich eine geringe Salzkonzentration benötigt.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Resultate zur sequenzspezifischen und salzabhängigen Bindung des MB an ein GC alternierendes Dekamer wurden publiziert [53, 76] und haben bereits zur Interpretation experimenteller Ergebnisse [177, 178], zu einer theoretischen Modellbildung [178] und der experimentellen Untersuchung weiterer Anwendungen der MB-DNA-Bindung [179, 180, 181] beigetragen.