

## 7. Monte-Carlo-Simulationen von Methylenblau-DNA-Komplexen

Die Methylenblau-DNA-Bindung ist Gegenstand aktueller spektroskopischer Untersuchungen [177, 178] und findet neben den in Kap. 2.6 und Kap. 6 diskutierten Anwendungen als Photosensibilisator in der Tumorthherapie auch aktuell Verwendung bei pharmakologisch-medizinischen und chemisch-technologischen Fragestellungen [179, 180, 181]. Eine in röntgenkristallographischen oder NMR-Untersuchungen atomar aufgelöste Struktur von MB-DNA-Komplexen ist nach wie vor nicht verfügbar. Die spektroskopischen Untersuchungen sind sehr aufwendig und führen teilweise zu Spektren, die nicht eindeutig interpretiert werden können [100]. Die in Kap. 6 diskutierten statischen Modelle für die MB-DNA-Bindung in den unterschiedlichen Bindungsmodi können der detaillierteren Interpretation experimenteller Resultate dienen. Da die MB-DNA-Bindung sich experimentell und theoretisch als abhängig von der Basensequenz der Target-DNA [53, 100] und von der Salzkonzentration der umgebenden Lösung [76, 173] erwies, so daß auch Übergänge zwischen unterschiedlichen Bindungsmodi wahrscheinlich sind, sind statische Modelle für das Verständnis der Komplexbildung zwar hilfreich aber nicht ausreichend. Der in Kap. 4 vorgestellte Algorithmus zur MC-Simulation von Nukleinsäuren hat bei der Simulation der Dekamere  $[(dA-dT)_5]_2$  und  $[(dG-dC)_5]_2$  zu neuen, in Kap. 5 dargestellten Erkenntnissen über die sequenzspezifische Struktur und Flexibilität dieser DNA-Dekamere geführt. In diesem Kapitel findet daher dieser MC-Algorithmus zur Untersuchung der dynamischen Eigenschaften der MB-DNA-Komplexe Verwendung.

Die Erweiterung des molekularen Modells für die Behandlung des Liganden Methylenblau um 6 kollektive und 4 innere Variablen wird in Kap. 4.1.6 erläutert. Die in der MC-Simulation variable Lage und Orientierung des MB-Moleküls relativ zur Target-DNA wird in Analogie zu Abb. 2.3 durch 6 helikale Parameter beschrieben. Diese helikalen Parameter werden für den Liganden in Kap. 4.2.4 durch die Gleichungen 4.25- 4.30 definiert [53].

Als Target-DNA werden die DNA-Dekamere  $[(dA-dT)_5]_2$  und  $[(dG-dC)_5]_2$  verwendet, so daß die in Kap. 6 vorgestellten statischen MB-DNA-Komplexe als Startkonfigurationen für die MC-Simulationen der Komplexe verwendet werden können. Die MC-Simulationen der MB-DNA-Komplexe erfolgen mit denselben Parametern wie die in Kap. 5 diskutierten MC-Simulationen der DNA-Dekamere. Somit wird als Kraftfeld wie bei der Simulation der Dekamere das Kraftfeld AMBER verwendet [105, 106]. Eine die Kraftfelder AMBER und FLEX vergleichende Studie berichtet über eine große Ähnlichkeit der Resultate [182]. Da in Kap. 5.1 ausführlich gezeigt wurde, daß die MC-Simulationen der Dekamere nach  $4 \cdot 10^5$  Makrozyklen gut equilibriert waren, wird davon ausgegangen, daß auch die MB-DNA-Komplexe nach dieser Anzahl von Ma-

krozyklen equilibriert sind. Die Ladung der Dekamere von  $q = -18e$  wird durch die Ladung des MB von  $q = +e$  auf eine Gesamtladung der MB-DNA-Komplexe von  $q = -17e$  reduziert, weshalb zur Neutralisation der Systeme nur 17 Gegenionen notwendig sind. Im Vergleich zu den MC-Simulationen der Dekamere besteht somit bei den MC-Simulationen der Komplexe der einzige Unterschied darin, daß ein explizites Gegenion durch ein MB-Molekül ersetzt wird.

### 7.1. Komplexbildung durch Interkalation des Methylenblau zwischen benachbarte Basenpaare der Dekamere

Da die beiden Dekamere  $[(dA-dT)_5]_2$  und  $[(dG-dC)_5]_2$  als zentralen Basenschritt einen 5'-ApT-3'- bzw. einen 5'-GpC-3'-Basenschritt enthalten, die Interkalation aber auch in einen 5'-TpA-3'- bzw. einen 5'-CpG-3' Basenschritt möglich ist, werden als Target-Dekamere auch die Dekamere  $[(dT-dA)_5]_2$  und  $[(dC-dG)_5]_2$  verwendet. Dadurch kann in den MC-Simulationen die Interkalation immer in den zentralen Basenschritt erfolgen, wodurch der Einfluß von Endeffekten reduziert werden soll. Es werden MC-Simulationen von MB-DNA-Komplexen durchgeführt, deren Interkalationsmodi in Kap. 6 charakterisiert und diskutiert worden sind: In den Komplexen ic1-TpA, ic1-ApT, ic1-CpG bzw. ic1-GpC ist das MB jeweils in den Basenschritt 5'-TpA-3', 5'-ApT-3', 5'-CpG-3' bzw. 5'-GpC-3' so interkaliert, daß die lange Achse des MB ungefähr parallel zur Achse der die Interkalationstasche flankierenden Basenpaare orientiert ist. Dieser Interkalationsmodus ist in Kap. 6 als symmetrische Interkalation bezeichnet worden. In den Komplexen ic2-TpA, ic2-ApT, ic2-CpG bzw. ic2-GpC ist das MB dagegen in den Basenschritt so interkaliert, daß die lange Achse des MB um die helikale Achse des Target-Dekamers um etwa  $140^\circ$ - $145^\circ$  rotiert ist. Dieser Interkalationsmodus wurde in Kap. 6 als gauche Interkalation bezeichnet. Um die unterschiedlichen Interkalationsmodi zu erfassen, werden MC-Simulationen der 8 Interkalationskomplexe (4 Komplexe je Sequenz und 2 Komplexe je Interkalationstasche) durchgeführt. Diskutiert werden die Lage und Orientierung des MB sowie die Konformationsänderungen der Nukleotide im Bereich der Bindungstasche.

#### 7.1.1. Lage und Orientierung des Methylenblau in der Bindungstasche

Gemittelt über jede 10. Konformation des equilibrierten Bereichs der MC-Simulationen von  $4 \cdot 10^5 - 10^6$  Makrozyklen bleiben die Lage und Orientierung des MB in der Interkalationstasche im wesentlichen erhalten, so daß von einer hohen energetischen Stabilität der symmetrischen und der gauche Interkalation in den YpR- und RpY-Bindungstaschen der Dekamere mit alternierenden AT bzw. GC Basensequenzen ausgegangen werden kann. Lediglich bei der symmetrischen Interkalation des MB in den 5'-GpC-3'-Basenschritt erfolgt ein zeitweiliger Übergang zu einer Interkalation mit um die helikale Achse gedrehtem MB. Wegen der hohen Stabilität der symmetrischen und der gauche Interkalation werden für diese beiden Interkalationsmodi die Bindungen in den jeweils zwei möglichen Bindungstaschen der beiden Dekamere mit AT bzw. GC alternierenden Basensequenzen strukturell verglichen.

### Symmetrische Interkalation des Methylenblau

Die Besetzungswahrscheinlichkeiten der helikalen Parameter des Liganden sind in Abb. 7.1 geglättet dargestellt. Bei einem ersten Vergleich der Verteilungen fällt auf, daß die Besetzungswahrscheinlichkeiten der 6 helikalen Parameter für die Interkalation in den 5'-CpG-3'-Basenschritt am stärksten lokalisiert sind. Diese Beobachtung korrespondiert mit der bereits diskutierten Feststellung, daß das AT alternierende Dekamer eine höhere Flexibilität als das GC alternierende Dekamer zeigt. Die Flexibilität des Target-Dekamers wirkt sich auf die Variation der Lage und Orientierung des Interkalators aus. Die Interkalation in den 5'-GpC-Basenschritt bildet bei dieser Bewertung aufgrund eines Ausfluges in einen modifizierten Interkalationsmodus eine Ausnahme.

Die Besetzungswahrscheinlichkeiten des X-Displacements in Abb. 7.1 a.) führen bei der symmetrischen Interkalation zu mittleren X-Displacements von 1,1 Å beim TpA-, 0,7 Å beim ApT, ebenfalls 0,7 Å beim CpG und -0,9 Å beim GpC-Basenschritt. Diese Werte charakterisieren die Verschiebung des MB entlang der in die große Furche weisenden  $\vec{v}$ -Achse des Referenzbasenpaares. Das MB liegt bei den Interkalationen in die 4 Bindungstaschen etwa im Zentrum zwischen den Basenpaaren, denn der als Referenzpunkt dienende Ursprung des körperfesten Achsensystems des MB ist nach Abb. 4.5 im Zentrum des in die große Furche orientierten Schwefelatoms definiert. Der Mittelpunkt des MB hingegen liegt auf der Achse zwischen dem Schwefel- und dem Stickstoffatom des zentralen heterozyklischen Ringes. Das negative mittlere X-Displacement bei der Interkalation in den GpC-Basenschritt resultiert aus einem Ausflug zu einer Konformation, in der das MB um die helikale Achse gedreht ist, wodurch die eine Seite des MB in die kleine Furche vordringen kann. Dieser modifizierte Interkalationsmodus ist mit einer Verschiebung des MB in Richtung der kleinen Furche verbunden, so daß das X-Displacement negativ wird. Diese modifizierte Interkalation generiert ein Nebenmaximum in der Verteilung des X-Displacements bei ca. -4,2 Å.

Die zentrale Lage des MB in der Interkalationstasche wird durch die Mittelwerte der in Abb. 7.1 b.) dargestellten Verteilungen des Y-Displacements mit 0,0 Å beim TpA-, 0,3 Å beim ApT, 0,1 Å beim CpG und 0,3 Å beim GpC-Basenschritt bestätigt. Auch entlang der helikalen Achse befindet sich das MB in der Mitte zwischen den die Interkalationstasche flankierenden Basenpaaren. Deutlich wird das durch die mittleren Rise-Werte von 3,3 Å beim TpA-, 3,4 Å beim ApT, 3,3 Å beim CpG und 3,2 Å beim GpC-Basenschritt der in Abb. 7.1 c.) dargestellten Besetzungswahrscheinlichkeiten des Rise. Die vorübergehend von der symmetrischen Interkalation abweichende Orientierung des MB bei der Interkalation in den GpC-Basenschritt führt zu Schultern in der Verteilung des Y-Displacements bei 2 Å und des Rise bei 2,5 Å.

Die Orientierung des Liganden in der Bindungstasche wird durch die Inclination, den Tip und den Twist des MB charakterisiert. Die in Abb. 7.1 d.) dargestellten Verteilungen der Inclination führen zu Mittelwerten von -0,5° beim TpA-, 1,2° beim ApT, 2,0° beim CpG und 1,3° beim GpC-Basenschritt. Die Verteilungen der Inclination verdeutlichen wie die in Abb. 7.1 e.) ersichtlichen Besetzungswahrscheinlichkeiten des Tip die stärkere Bewegung des MB in den Interkalationstaschen 5'-TpA-5', 5'-ApT-3' und 5'-GpC-3' im Vergleich zur Bewegung des MB in der 5'-CpG-3'-Bindungstasche. Die Mittelwerte des Tip liegen mit 0,0° beim TpA-, 0,2° beim ApT, ebenfalls 0,2° beim CpG und -1,5° beim GpC-Basenschritt sehr nah beinander. Die verbreiterte Verteilung des Tip bei Interkalation in den GpC-Basenschritt kann wiederum mit einem Ausflug

## 7. Monte-Carlo-Simulationen von Methylenblau-DNA-Komplexen

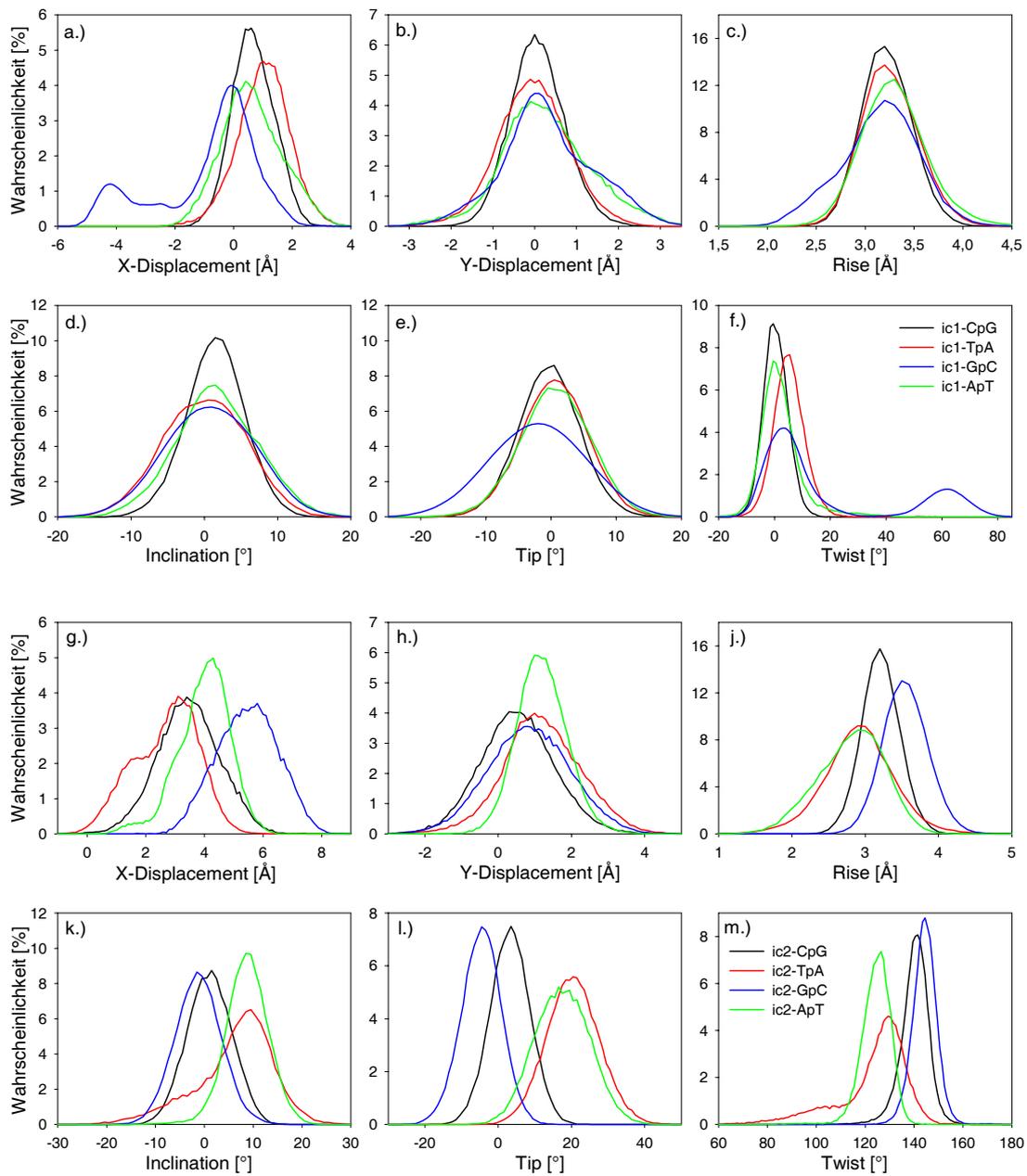


Abb. 7.1.: Besetzungswahrscheinlichkeiten der helikalen Parameter  $X$ -Displacement,  $Y$ -Displacement, Rise, Inclination, Tip und Twist des Methylenblau für die MB-DNA-Komplexe mit symmetrischer Interkalation  $ic1$ -TpA,  $ic1$ -ApT,  $ic1$ -CpG und  $ic1$ -GpC in den Abbn. a.)-f.) und für die MB-DNA-Komplexe mit gauche Interkalation  $ic2$ -TpA,  $ic2$ -ApT,  $ic2$ -CpG und  $ic2$ -GpC in den Abbn. g.)-m.). Die helikalen Parameter des MB sind auf das in Abb. 4.5 definierte körperfeste Achsensystem des MB relativ zu dem in 5'-Richtung des ersten Stranges benachbarten Basenpaar bezogen.

der Konformation zu einem Interkalationsmodus erklärt werden, der eine größere Beweglichkeit des MB zuläßt.

Eindeutiger fallen die Unterschiede bei den Mittelwerten der in Abb. 7.1 f.) dargestellten Besetzungswahrscheinlichkeiten des Twist mit  $4,8^\circ$  beim TpA-,  $1,8^\circ$  beim ApT,  $1,0^\circ$  beim CpG und  $18,5^\circ$  beim GpC-Basenschritt aus. Bei den Interkalationen in die Basenschritte TpA, ApT und CpG kann eingeschätzt werden, daß die symmetrische bzw. parallele Interkalation im wesentlichen während der MC-Simulationen erhalten bleibt und sich damit als sehr stabil erweist. Eine Bewegung des MB im Zentrum der Interkalationstasche kann beobachtet werden. Der Twist zeigt während der Simulation Fluktuationen von  $6,0^\circ$  beim TpA-,  $7,7^\circ$  beim ApT und  $4,4^\circ$  beim CpG-Basenschritt. Beim Vergleich der Interkalation in den CpG-Basenschritt mit den Interkalationen in den TpA- oder ApT-Basenschritt fällt wiederum die höhere Variabilität der Orientierung des Liganden in der Bindungstasche auf, die durch die größere Flexibilität des AT alternierenden Target-Dekamers verursacht wird.

Eine Ausnahme bildet die Interkalation des MB in den GpC-Basenschritt, bei der das MB im Bereich von  $6,45 - 7,93 \cdot 10^5$  Makrozyklen für  $1,48 \cdot 10^5$  Makrozyklen einen wahrscheinlich seltenen Ausflug zu einem Interkalationsmodus unternimmt, der weder der symmetrischen noch der gauche Interkalation entspricht und daher energetisch auch nicht stabil genug ist, um in der MC-Simulation über eine größere Zahl von Makrozyklen erhalten zu bleiben. Diese Konformation ist geprägt durch eine Vergrößerung des Twist auf Werte um  $60^\circ$  sowie eine Verringerung des X-Displacements auf Werte um  $-4,2 \text{ \AA}$  und des Tip auf Werte um  $-8^\circ$ . Das MB dreht sich somit in der Bindungstasche, und die Methylgruppen der einen Seite des Farbstoffs gelangen durch die flankierenden Basen hindurch in die kleine Furche, und zwar soweit daß das X-Displacement negativ wird. Dabei bleiben die Methylgruppen weiterhin in Richtung der großen Furche orientiert, wodurch sich dieser Interkalationsmodus von der gauche Interkalation unterscheidet, bei der die Methylgruppen des MB in Richtung der kleinen Furche orientiert sind. Dieser Unterschied spiegelt sich in den entgegengesetzten Vorzeichen des X-Displacements bei dem beschriebenen Ausflug zu dem modifizierten Interkalationsmodus im Vergleich zur gauche Interkalation wider. Ein Ausflug zu einer solchen seltenen Konformation beeinflußt die Mittelwerte und Fluktuationen der helikalen Parameter erheblich, da die Struktur während 24,7 % der Makrozyklen im equilibrierten Bereich der MC-Simulation von  $4 \cdot 10^5 - 10^6$  Makrozyklen in dieser Konformation verblieb. Der MC-Algorithmus stellt allerdings anhand dieses Beispiels seine Leistungsfähigkeit unter Beweis, auch seltene Konformationen aufzufinden und in der Lage zu sein, wieder zu energetisch günstigeren Konformationen zurückzukehren.

Die zentrale Lage des MB in der Bindungstasche bei den symmetrischen Interkalationen wird durch Stapelwechselwirkungen des MB mit den beiden flankierenden Basenpaaren energetisch stabilisiert. Für den equilibrierten Bereich der MC-Simulationen sind mittlere Strukturen durch Mittelwertbildung der kartesischen Koordinaten aller Atome jeder 10. Konformation berechnet worden. Diese in den Abb. 7.2 a.)-d.) dargestellten mittleren Strukturen für die symmetrischen Interkalationen verdeutlichen die zentrale Lage des MB in den jeweiligen Interkalationstaschen.

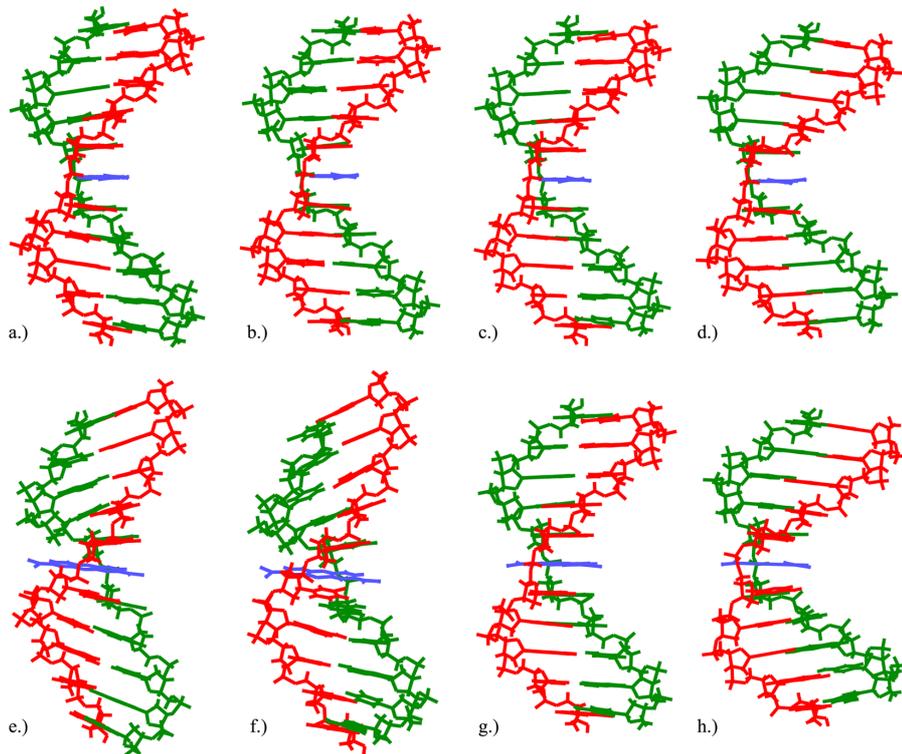


Abb. 7.2.: Für die equilibrierten Bereiche der MC-Simulationen von  $4 \cdot 10^5 - 10^6$  Makrozyklen berechnete mittlere Strukturen der MB-DNA-Komplexe a.) *ic1-TpA*, b.) *ic1-ApT*, c.) *ic1-CpG* und d.) *ic1-GpC* mit symmetrischer Interkalation sowie der MB-DNA-Komplexe e.) *ic2-TpA*, f.) *ic2-ApT*, g.) *ic2-CpG* und h.) *ic2-GpC* mit gauche Interkalation des blau gekennzeichneten MB.

### Gauche Interkalation des Methylenblau

Konformationen, bei denen die lange Achse des MB in der Bindungstasche um ca.  $140^\circ - 145^\circ$  um die helikale Achse gedreht ist, wurden in Kap. 6 als alternative Interkalationsmodi diskutiert, die gegenüber den symmetrischen Interkalationen aufgrund einer geringeren Stapelwechselwirkung und einer stärkeren Deformation der Target-DNA energetisch etwas benachteiligt sind, deren Auftreten aber dennoch realistisch ist. Die Besetzungswahrscheinlichkeiten der helikalen Parameter des MB bei gauche Interkalationen in die Bindungstaschen  $5'$ -TpA- $3'$ ,  $5'$ -ApT- $3'$ ,  $5'$ -CpG- $3'$  und  $5'$ -GpC- $3'$  werden in Abb. 7.1 geglättet veranschaulicht.

Bei den in Abb. 7.1 g.) dargestellten Besetzungswahrscheinlichkeiten des X-Displacements fällt auf, daß die Verteilungen mit mittleren X-Displacements von  $2,7 \text{ \AA}$  beim TpA- und  $4,0 \text{ \AA}$  beim ApT-Basenschritt Schultern bei ca.  $1,5 \text{ \AA}$  besitzen, wohingegen die Verteilungen mit mittleren X-Displacements von  $3,5 \text{ \AA}$  beim CpG- und  $5,5 \text{ \AA}$  beim GpC-Basenschritt diese Schultern nicht ausbilden. Vergleicht man die mittleren Strukturen für die gauche Interkalationen in den TpA- und den ApT-Basenschritt in den Abbn. 7.2 e.) und f.) mit den mittleren Strukturen für die gauche Interkalationen in den CpG- und den GpC-Basenschritt in den Abbn. 7.2 g.) und h.), wird ersichtlich, daß die helikale Struktur der AT alternierenden Target-Dekamere durch die gauche Interkalation während der MC-Simulation stark gestört worden ist, während die helikale

Struktur der GC alternierenden Target-Dekamere erhalten blieb. Dieser Unterschied kann auf die weit höhere Flexibilität der AT alternierenden Dekamere zurückgeführt werden, in deren Folge sich das MB in der Interkalationstasche weit stärker bewegen kann. Dreht sich das MB in der Bindungstasche, so daß seine lange Achse ungefähr senkrecht zur Achse der benachbarten Basenpaare orientiert ist, wird seine Bewegung entlang der  $\vec{v}$ -Achse des Referenzbasenpaares nur durch die Methylgruppen beschränkt. Ausflüge zu Konformationen, in denen das MB diese Orientierung einnimmt, generieren die Schultern in der Verteilung des X-Displacements. Die Verschiebung des mittleren X-Displacements bei der gauche Interkalation in den GpC-Basenschritt beruht auf einer starken Krümmung des Target-Dekamers, die das MB von der Seite der großen Furche zu umschließen versucht. Die Krümmung des Target-Dekamers ist auch in der mittleren Struktur in Abb. 7.2 h.) deutlich erkennbar. Eine solche Krümmung führt zu einer Verschiebung der besten helikalen Achse in Richtung der großen Furche. Da die Methylgruppen des MB bei der gauche Interkalation in Richtung der kleinen Furche orientiert sind, zeigt ein größeres positives X-Displacement eine stärkere Verschiebung in Richtung der kleinen Furche an. Insgesamt ist das MB bei den gauche im Vergleich zu den symmetrischen Interkalationen in Richtung der kleinen Furche verschoben.

Die Mittelwerte der in Abb.7.1 h.) dargestellten Verteilungen des Y-Displacements unterscheiden sich mit 1,2 Å beim TpA-, ebenfalls 1,2 Å beim ApT-, 0,6 Å beim CpG- und 0,9 Å beim GpC-Basenschritt nur wenig. Die gegenüber den symmetrischen Interkalationen etwas ins Positive verschobenen Y-Displacements beruhen auf der Definition des körperfesten Achsensystems im nicht in der Mitte des MB liegenden Zentrum des Schwefelatoms. Die in Abb.7.1 j.) dargestellten Verteilungen des Rise führen mit 3,0 Å beim TpA- und 2,9 Å beim ApT-Basenschritt zu etwas geringeren mittleren Rise-Werten im Vergleich zu 3,3 Å beim CpG- und 3,6 Å beim GpC-Basenschritt, die aus der in den mittleren Strukturen in den Abb. 7.2 e.) und f.) ersichtlichen Deformation der TpA- und ApT-Interkalationstaschen resultieren. Die größere Flexibilität der AT alternierenden Dekamere erklärt auch den Unterschied der Fluktuation des Rise des MB von 0,5 Å bei Interkalation in den TpA- oder ApT-Basenschritt gegenüber 0,3 Å bei Interkalation in den CpG- oder GpC-Basenschritt der GC alternierenden Dekamere. Genau diese Beobachtung einer sich auf die Beweglichkeit des MB auswirkenden größeren Flexibilität der AT alternierenden Dekamere wird durch die Besetzungswahrscheinlichkeiten der Inclination in Abb.7.1 k.) und des Tip in Abb.7.1 l.) bestätigt. Einerseits sind die Verteilungen für die gauche Interkalationen in den TpA- und den ApT-Basenschritt breiter, und andererseits liegen die mittleren Inclinationen mit 6,7° beim TpA- und 9,2° beim ApT-Basenschritt sowie die mittleren Tips mit 20,9° beim TpA- und 18,0° beim ApT-Basenschritt bei höheren Werten als die mittleren Inclinationen mit 1,5° beim CpG- und -0,7° beim GpC-Basenschritt bzw. die mittleren Tips mit 3,8° beim CpG- und -4,1° beim GpC-Basenschritt.

Schließlich illustriert die in Abb.7.1 m.) dargestellte Besetzungswahrscheinlichkeit des Twist die stabile gauche Interkalation des MB in den CpG- und den GpC-Basenschritt gegenüber der großen Flexibilität der AT alternierenden Dekamere und der dadurch bedingten hohen Beweglichkeit des MB bei der gauche Interkalation in den TpA- und den ApT-Basenschritt. Die mittleren Twists des MB liegen mit 123,8° beim TpA- und 124,9° beim ApT-Basenschritt unter den mittleren Twists des MB mit 140,8° beim CpG- und 144,8° beim GpC-Basenschritt. Die geringeren mittleren Twists bei der gauche Interkalation in die Bindungstaschen der AT alternierenden Dekamere beruhen auf den bereits

diskutierten Ausflügen zu Konformationen, bei denen die lange Achse des MB eine zu den Achsen der flankierenden Basenpaare senkrechte Orientierung einnimmt, wodurch Twist-Werte des MB um  $90^\circ$  erreicht werden. Diese Ausflüge manifestieren sich bei der gauche Interkalation in den TpA-Basenschritt in einer Schulter der Twist-Verteilung bei ca.  $100^\circ$ .

Die MC-Simulationen bestätigen die zwei alternativen Interkalationsmodi in jeder der möglichen Bindungstaschen. Sowohl die symmetrische als auch die gauche Interkalation zeichnen sich durch eine hohe Stabilität aus, denn während der  $10^6$  Makrozyklen umfassenden MC-Simulationen finden keine Übergänge zwischen der symmetrischen und der gauche Interkalation statt, obgleich von beiden Konformationen ausgehend Ausflüge zu seltenen Strukturen unternommen werden, die jedoch immer wieder zu den stabilen symmetrischen bzw. gauche Interkalationen zurückführen.

### 7.1.2. Konformationsänderungen der Target-Dekamere

Die Interkalation des MB erfordert eine starke Deformation des Target-Dekamers, deren Ziel in der Generierung einer Bindungstasche besteht. Die Deformation besteht im wesentlichen in einem Stretching und Unwinding der DNA an der zu generierenden Interkalationstasche. In den helikalen Parametern der Target-DNA wirkt sich diese Deformation durch eine Erhöhung des Rise und Verringerung des Twists an der Bindungstasche aus. Verbunden mit dieser Konformationsänderung der Target-Dekamere wechseln die Torsionswinkel ( $\alpha, \gamma$ ) an der Interkalationsstelle in einem  $\alpha/\gamma$ -Flip meist von der (-gauche,+gauche)- in die (trans,trans)-Konformation. Außerdem werden Übergänge der Zuckerfaltungsmodi einiger benachbarter Nukleotide von der C2'-endo- in die C3'-endo-Konformation beobachtet. Die Phasen der Zucker der die Bindungstasche flankierenden Nukleotide werden für den equilibrierten Bereich von  $4 \cdot 10^5 - 10^6$  Makrozyklen der MC-Simulationen der MB-DNA-Komplexe mit symmetrischen und gauche Interkalationen in Abb. 7.3 dargestellt. Die mittleren helikalen Parameter Rise und Twist sowie die mittleren Torsionswinkel  $\alpha$  und  $\gamma$  sind für die zentralen Bereiche der MB-DNA-Komplexe mit symmetrischer in Tab. 7.1 und gauche Interkalation in Tab. 7.2 angegeben.

#### Rise und Twist an der Interkalationsstelle

Bei einem Vergleich der mittleren Rise-Werte an der Interkalationstasche der symmetrischen Interkalationen fällt auf, daß die mittleren Rise-Werte der TpA- mit  $6,6 \text{ \AA}$  und der ApT-Bindungstasche mit  $6,7 \text{ \AA}$  über den mittleren Rise-Werten der CpG- mit  $6,5 \text{ \AA}$  und der GpC-Bindungstasche mit  $6,4 \text{ \AA}$  liegen. Die weiter geöffneten Interkalationstaschen der AT alternierenden Dekamere deuten auf eine stärkere Deformation dieser Target-Dekamere hin. Analog dazu besitzen auch bei den gauche Interkalationen die TpA- mit  $7,2 \text{ \AA}$  einen größeren Rise als die CpG-Bindungstasche mit  $6,8 \text{ \AA}$  und die ApT- mit  $6,8 \text{ \AA}$  einen größeren Rise als die GpC-Bindungstasche mit  $6,6 \text{ \AA}$ . Die mittleren Rise-Werte liegen damit bei den gauche Interkalationen immer höher als bei symmetrischen Interkalationen des MB in die jeweilige Bindungstasche. Die höheren Rise-Werte deuten eine stärkere Deformation der Target-Dekamere an, die, wie in Kap. 6 gezeigt worden ist, zur energetischen Benachteiligung der gauche gegenüber den symmetrischen Interkalationen beiträgt.

In Kap. 5 konnte gezeigt werden, daß der mittlere Twist beim AT und beim GC alternierenden Dekamer stark von der Basensequenz abhängig ist. Während bei AT alternierenden Sequenzen der Twist der TpA- über dem Twist der ApT-Basenschritte liegt, ist bei GC alternierenden Basensequenzen der Twist der GpC- größer als der Twist der CpG-Basenschritte. Bei der Interkalation beeinflusst diese Sequenzspezifität den Twist zwischen den das interkalierte MB flankierenden Basenpaaren. Der mittlere Twist liegt bei der symmetrischen Interkalation des MB in den TpA-Basenschritt bei  $9,5^\circ$  und bei der symmetrischen Interkalation in den ApT-Basenschritt bei  $6,6^\circ$ , so daß die  $3^\circ$  Differenz zwischen den  $35^\circ$ - $37^\circ$  für TpA- und  $32^\circ$ - $34^\circ$  für ApT-Basenschritte des freien Dekamers erhalten bleiben. Die der Interkalationstasche benachbarten Basenschritte versuchen, das starke lokale Unwinding zwischen den die Bindungstasche bildenden Basenpaaren etwas auszugleichen, so daß die mittleren Twist-Werte der einer TpA-Bindungstasche benachbarten ApT-Basenschritte auf ca.  $36^\circ$  und die mittleren Twist-Werte der einer ApT-Bindungstasche benachbarten TpA-Basenschritte auf ca.  $40^\circ$  steigen. Auch das Ausmaß der das Unwinding ausgleichenden Erhöhung der Twist-Werte benachbarter Basenpaarschritte erhält in etwa die Differenz zwischen den mittleren Twist-Werten der TpA- und ApT-Basenschritte des freien Dekamers.

Ein ganz analoges Verhalten des Twists wird bei der symmetrischen Interkalation des MB in die Interkalationstaschen des GC alternierenden Dekamers beobachtet. Der mittlere Twist der das MB flankierenden Basenpaare beträgt für den CpG-  $2,9^\circ$  und für den GpC-Basenschritt  $10,1^\circ$ . Die Differenz von  $7,2^\circ$  spiegelt sich zumindest tendenziell in den mittleren Twist-Werten von  $32,3^\circ$ -  $33,5^\circ$  für CpG- und von  $35,5^\circ$ - $36,5^\circ$  für GpC-Basenschritte des freien GC alternierenden Dekamers wider. Bei der Beurteilung der größeren Differenz der mittleren Twist-Werte des CpG- und des GpC-Basenschritts an der Bindungsstelle muß daran erinnert werden, daß bei der MC-Simulation der Interkalation in den GpC-Basenschritt die Struktur während 24,7 % der bei der Mittelwertbildung berücksichtigten Makrozyklen einen Ausflug zu einer stark von der symmetrischen Interkalation abweichenden Konformation unternommen hat, die sich mit Sicherheit auf die mittleren strukturellen Parameter auswirkt. Auch bei den symmetrischen Interkalationen des MB in den CpG- bzw. den GpC-Basenschritt gleichen die der Bindungstasche benachbarten Basenschritte mit erhöhten Twist-Werten das lokale Unwinding zwischen den das MB flankierenden Basenpaaren etwas aus. Die mittleren Twists der der CpG-Interkalationstasche benachbarten GpC-Basenschritte steigen auf  $40,9^\circ$ , während sich die mittleren Twists der der GpC-Interkalationstasche benachbarten GpC-Basenschritte auf  $37,7^\circ$  erhöhen. Damit bleiben auch bei der interkalativen Bindung des MB mit den GC alternierenden Dekamern in den mittleren Twist-Werten der der Bindungsstelle benachbarten Basenschritte die Differenzen der Twist-Werte von ca.  $3^\circ$  zwischen den CpG- und GpC-Basenschritten freier Dekamere erhalten. Eine Beobachtung der MC-Simulationen der Interkalationskomplexe kann in der Feststellung zusammengefaßt werden, daß die Differenzen der mittleren Twists von YpR- und RpY-Basenschritten in MB-DNA-Interkalationskomplexen konserviert sind.

Auch die Analyse der in Tab. 7.2 angegebenen mittleren Twist-Werte bei der gauche Interkalation bestätigt die Beobachtung tendenziell konservierter Differenzen in den Twist-Werten von YpR- und RpY-Basenschritten. Der mittlere Twist zwischen den das MB flankierenden Basenpaaren liegt bei der gauche Interkalation in den TpA- bei  $26,0^\circ$ , in den ApT- bei  $20,1^\circ$ , in den CpG- bei  $7,9^\circ$  und in den GpC-Basenschritt bei  $9,1^\circ$ . Bei den gauche Interkalationen wird damit ein geringeres Unwinding an der In-

7. Monte-Carlo-Simulationen von Methylenblau-DNA-Komplexen

Basenschritt	$dZ$ [Å]	$\sigma$ [Å]	$\Omega$ [°]	$\sigma$ [°]	$\alpha$ [°]	$\sigma$ [°]	$\gamma$ [°]	$\sigma$ [°]
a.) TpA3	3,68	0,46	34,48	4,74	-73,5	10,0	50,7	8,7
ApT4	3,62	0,35	34,82	4,14	-76,8	10,1	51,9	8,5
TpA5	6,63	0,39	9,44	6,84	-173,4	17,6	-167,3	11,2
ApT6	3,28	0,35	36,36	4,27	-66,6	9,1	59,2	8,3
TpA7	3,65	0,46	34,23	4,76	-71,2	10,0	52,9	9,1
TpA12	3,66	0,49	34,69	4,69	-71,0	9,9	53,1	9,3
ApT13	3,30	0,36	36,39	4,22	-65,5	9,1	59,4	8,1
TpA14	6,66	0,39	9,57	6,83	-174,5	17,2	-167,3	10,4
ApT15	3,59	0,38	34,66	4,36	-76,0	10,4	51,9	8,5
TpA16	3,67	0,47	34,56	4,79	-73,4	10,1	50,4	8,7
b.) ApT3	3,26	0,39	31,39	4,54	-69,0	9,6	56,0	8,0
TpA4	3,38	0,43	41,72	5,73	-81,6	11,9	50,1	9,0
ApT5	6,72	0,40	6,45	7,84	-172,2	15,6	-169,3	10,1
TpA6	3,26	0,36	38,45	5,55	-73,3	28,7	57,9	28,4
ApT7	3,20	0,34	33,19	4,11	-67,5	8,9	58,2	8,0
ApT12	3,21	0,34	32,11	4,32	-67,2	8,8	58,0	8,0
TpA13	3,33	0,37	40,73	5,36	-68,3	10,0	56,2	9,0
ApT14	6,71	0,40	6,73	8,12	176,8	22,2	-167,7	10,4
TpA15	3,29	0,38	38,56	5,87	-79,2	12,5	50,0	9,5
ApT16	3,31	0,37	32,76	4,01	-68,0	9,3	56,5	8,0
c.) CpG3	3,24	0,35	31,74	3,72	-72,4	9,9	51,6	8,6
GpC4	3,54	0,30	41,29	3,76	-82,1	10,5	49,2	8,6
CpG5	6,55	0,34	2,88	5,09	-172,5	18,5	-168,9	15,9
GpC6	3,39	0,31	40,61	3,68	-69,1	9,3	56,9	8,1
CpG7	3,37	0,34	31,91	3,71	-72,4	9,7	53,3	8,7
CpG12	3,32	0,33	31,64	3,74	-72,6	9,6	52,4	8,7
GpC13	3,40	0,31	40,90	3,68	-68,8	9,4	57,2	8,2
CpG14	6,53	0,34	2,96	5,09	-179,5	20,1	-167,0	11,0
GpC15	3,56	0,29	40,87	3,87	-80,1	11,0	49,9	8,6
CpG16	3,30	0,36	31,85	3,84	-71,6	9,6	52,1	8,7
d.) GpC3	3,07	0,42	35,71	4,28	-69,6	9,1	56,2	8,0
CpG4	3,28	0,45	37,38	4,71	-80,0	13,3	50,8	9,5
GpC5	6,36	0,51	10,25	6,04	164,8	36,0	-168,9	10,4
CpG6	3,23	0,40	38,23	4,47	-71,0	10,2	55,0	8,9
GpC7	3,23	0,35	34,84	4,14	-68,5	8,9	57,1	8,1
GpC12	3,19	0,40	35,26	4,22	-68,1	8,9	57,5	8,2
CpG13	3,19	0,45	37,25	4,98	-72,1	10,0	53,4	8,7
GpC14	6,45	0,40	9,91	5,72	-173,6	18,1	-171,1	13,9
CpG15	3,30	0,42	37,99	4,40	-88,5	14,5	48,7	9,2
GpC16	3,05	0,43	35,77	4,62	-69,6	9,1	56,0	8,0

Tabelle 7.1.: Mittlere helikale Parameter Rise  $dZ$  und Twist  $\Omega$  sowie mittlere Torsionswinkel  $\alpha$  und  $\gamma$  einschließlich der Fluktuationen  $\sigma$  der 5 zentralen Basenschritte der MB-DNA-Komplexe a.) *ic1-TpA*, b.) *ic1-ApT*, c.) *ic1-CpG* und d.) *ic1-GpC*. Die Mittelung der strukturellen Parameter bezieht jede 10. Konformation nach der Equilibrierung ( $4 \cdot 10^5 - 10^6$  Makrozyklen) ein.

terkalationsstelle beobachtet, das im Vergleich zur symmetrischen Interkalation nicht notwendig ist, weil das MB keine perfekte Stapelwechselwirkung mit beiden flankierenden Basenpaaren eingeht. Auch bei den gauche Interkalationen tendieren die Twists der der Interkalationstasche benachbarten Basenschritte zu einem Ausgleich des lokalen Unwindings zwischen den die Bindungstasche bildenden Basenpaaren. Tendenziell bleibt auch dabei der Unterschied der mittleren Twist-Werte von YpR- gegenüber RpY-Basenschritten erhalten.

### $\alpha/\gamma$ -Flips an der Interkalationsstelle

In den Startkonfigurationen zeichnen sich die 8 MB-DNA-Komplexe mit symmetrischer bzw. gauche Interkalation durch  $\alpha/\gamma$ -Flips zwischen den die Interkalationstasche bildenden Basenpaaren in beiden Nukleinsäuresträngen aus. In den Komplexen mit symmetrischer Interkalation des MB bleiben die  $\alpha/\gamma$ -Flips während der gesamten MC-Simulation erhalten. Die Fluktuationen der Torsionswinkel  $\alpha$  und  $\gamma$  deuten daraufhin, daß die Werte dieser beiden Torsionswinkel während der MC-Simulationen in der Regel stärker variieren als die Werte der Torsionswinkel  $\alpha$  und  $\gamma$  zwischen den übrigen Nukleotiden. Die symmetrischen Interkalationen in die unterschiedlichen Bindungstaschen führten zu keinen qualitativen Unterschieden in den mittleren Torsionswinkeln. Allerdings bestätigen die MC-Simulationen die Notwendigkeit von  $\alpha/\gamma$ -Flips für die Ausbildung einer für eine symmetrische Interkalation geeigneten Bindungstasche.

Bei den gauche Interkalationen in den TpA- und den ApT-Basenschritt wird im Gegensatz zu den symmetrischen Interkalationen mit stabilisierten  $\alpha/\gamma$ -Flips beobachtet, daß ein in der (trans,trans)-Konformation befindliches Torsionswinkelpaar ( $\alpha, \gamma$ ) in einem der beiden Nukleinsäurestränge in die gewöhnlichere (-gauche,+gauche)-Konformation zurückkehrt. In den Komplexen mit gauche Interkalationen in den TpA- und den ApT-Basenschritt geschieht das bereits in der Equilibrierungsphase der MC-Simulationen. In dem Komplex mit gauche Interkalation in den GpC-Basenschritt ereignet sich nur ein vorübergehender und unvollständiger Übergang, und bei der gauche Interkalation in den CpG-Basenschritt bleibt der  $\alpha/\gamma$ -Flip während der gesamten MC-Simulation in beiden Nukleinsäuresträngen erhalten. Es kann also davon ausgegangen werden, daß der  $\alpha/\gamma$ -Flip in GC alternierenden Dekameren stärker stabilisiert wird. In den mittleren Strukturen der Abbn. 7.2 e.)-h.) wird erkennbar, daß die helikale Konformation bei gauche Interkalationen in Basenschritte GC alternierender Dekamere weitgehend erhalten bleibt, während sie bei gauche Interkalationen in Basenschritte AT alternierender Dekamer gestört wird. Detaillierte Auswertungen der Trajektorien ergeben, daß die Erhaltung der Symmetrie einer Interkalationstasche vom Bestehen der  $\alpha/\gamma$ -Flips in beiden Nukleinsäuresträngen abhängig ist. Die Bindungstaschen in den Komplexen mit gauche Interkalation in den TpA- bzw. ApT-Basenschritt verengen sich einseitig, so daß auf einer Seite die die Interkalationstasche bildenden Basen eine reduzierte Stapelwechselwirkung eingehen können und das MB auf die Seite der Bindungstasche gezwungen wird, auf der der  $\alpha/\gamma$ -Flip erhalten geblieben ist. Verglichen mit den symmetrischen Interkalationen verstärkt die gauche Interkalation des MB die Asymmetrie der MB-DNA-Komplexe, die sich besonders stark bei den in den Abbn. 7.2 e.) und f.) dargestellten mittleren Strukturen der MB-DNA-Komplexe auf die Konformationen der Target-Dekamere auswirkt, in denen die  $\alpha/\gamma$ -Flips nur in einem der beiden Nukleinsäurestränge bestehen bleiben.

7. Monte-Carlo-Simulationen von Methylenblau-DNA-Komplexen

Basenschritt	$dZ$ [Å]	$\sigma$ [Å]	$\Omega$ [°]	$\sigma$ [°]	$\alpha$ [°]	$\sigma$ [°]	$\gamma$ [°]	$\sigma$ [°]
a.) TpA3	3,59	0,49	35,72	6,57	-72,3	10,4	53,0	8,9
ApT4	3,53	0,51	35,58	5,91	-70,5	10,2	57,7	8,7
TpA5	7,25	0,51	25,84	8,35	-151,5	44,6	174,6	43,8
ApT6	3,40	0,42	33,82	4,57	-62,7	9,3	61,1	8,6
TpA7	3,19	0,39	38,41	5,86	-71,6	9,8	53,5	9,4
TpA12	3,43	0,45	36,98	5,91	-70,6	9,8	53,3	9,0
ApT13	3,69	0,43	35,31	5,52	-65,2	9,5	59,0	9,4
TpA14	7,08	0,58	26,11	8,36	-62,4	33,9	82,7	32,4
ApT15	3,32	0,41	36,07	5,94	-67,7	9,4	59,2	8,2
TpA16	3,33	0,43	36,58	5,46	-69,8	10,3	54,0	9,1
b.) ApT3	3,14	0,39	31,88	4,95	-68,5	9,5	57,2	8,1
TpA4	3,69	0,46	45,66	4,74	-81,7	11,0	52,9	8,4
ApT5	6,99	0,41	16,45	5,31	-161,5	14,7	-169,8	10,6
TpA6	2,97	0,36	46,42	6,48	-65,5	9,6	63,1	10,1
ApT7	3,43	0,39	33,89	5,12	-66,1	8,9	59,8	8,5
ApT12	3,37	0,39	30,22	4,95	-67,0	9,0	57,9	8,0
TpA13	3,46	0,44	44,13	5,17	-67,7	10,2	55,2	10,2
ApT14	6,67	0,43	23,69	5,71	-58,7	9,4	62,4	8,8
TpA15	3,13	0,40	39,30	5,36	-64,1	9,5	59,9	8,9
ApT16	3,72	0,53	33,91	4,98	-64,9	9,4	58,9	8,2
c.) CpG3	3,21	0,36	31,69	3,94	-72,4	9,7	51,6	8,5
GpC4	3,53	0,31	41,04	3,73	-80,8	10,3	50,3	8,3
CpG5	6,80	0,36	7,69	6,00	-161,1	39,6	-178,4	37,1
GpC6	3,46	0,34	37,51	4,18	-70,3	9,5	55,7	8,2
CpG7	3,19	0,36	32,72	4,10	-71,4	9,7	53,6	8,7
CpG12	3,26	0,34	31,93	4,10	-71,6	9,6	53,3	8,7
GpC13	3,59	0,36	40,40	3,78	-68,1	9,8	56,2	8,4
CpG14	6,75	0,42	8,10	5,92	170,9	27,8	-169,7	11,7
GpC15	3,37	0,32	37,62	4,30	-74,7	11,2	53,5	9,1
CpG16	3,24	0,38	32,57	4,08	-71,4	9,7	52,6	8,7
d.) GpC3	3,19	0,40	34,67	3,96	-73,8	10,2	53,5	8,0
CpG4	2,99	0,39	35,46	4,40	-84,9	13,0	50,7	8,5
GpC5	6,63	0,37	8,48	4,65	-175,3	12,7	-170,2	9,9
CpG6	2,95	0,35	32,84	4,31	-71,2	10,0	53,7	8,8
GpC7	3,12	0,37	36,50	4,48	-68,2	8,9	57,6	8,1
GpC12	3,14	0,35	34,59	4,09	-68,3	9,0	56,7	8,1
CpG13	2,92	0,36	33,65	5,64	-63,7	10,2	58,7	8,8
GpC14	6,62	0,41	9,68	4,70	127,9	29,6	-167,6	11,4
CpG15	3,00	0,36	33,20	4,28	-71,7	10,4	54,7	9,0
GpC16	3,12	0,39	36,66	4,37	-69,3	9,2	56,1	8,1

Tabelle 7.2.: Mittlere helikale Parameter Rise  $dZ$  und Twist  $\Omega$  sowie mittlere Torsionswinkel  $\alpha$  und  $\gamma$  einschließlich der Fluktuationen  $\sigma$  der 5 zentralen Basenschritte der MB-DNA-Komplexe a.) *ic2-TpA*, b.) *ic2-ApT*, c.) *ic2-CpG* und d.) *ic2-GpC*. Die Mittelung der strukturellen Parameter bezieht jede 10. Konformation nach der Equilibrierung ( $4 \cdot 10^5 - 10^6$  Makrozyklen) ein.

### Zuckerfaltung der die Bindungstasche flankierenden Nukleotide

Die geglätteten Verteilungen der die Zuckerfaltungsmodi charakterisierenden Phasen sind für die jeweils vier, die Interkalationstaschen flankierenden Nukleotide in Abb. 7.3 dargestellt. Bei der Betrachtung der Besetzungswahrscheinlichkeiten fällt zunächst auf, daß sowohl bei den symmetrischen als auch den gauche Interkalationen im wesentlichen die C2'-endo-Zuckerfaltung mit Phasen von 144°-180° und die C3'-endo-Zuckerfaltung mit 0°-36° vorherrschen. Das Auftreten der C3'-endo-Zuckerfaltung entspricht einer durch Bildung der Interkalationstasche verursachten Konformationsänderung, die bereits in Kap. 6 diskutiert worden ist.

Die MC-Simulationen bestätigen die unterschiedlichen Zuckerkonformationen bei Ausbildung einer YpR- im Vergleich zu einer RpY-Bindungstasche. In den Abbn. 7.3 a.) und b.) ähneln sich die Verteilungen der Phasen für die symmetrische Interkalation in den TpA- bzw. den CpG-Basenschritt sehr deutlich. Die Phasenspektren der Zucker der Pyrimidinbasen enthaltenden Nukleotide T5 und T16 in Abb. 7.3 a.) besitzen Maxima bei 24° und 26°, die wie die Maxima der Phasenspektren der Pyrimidinbasen enthaltenden Nukleotide C5 und C16 in Abb. 7.3 b.) mit 18° eine C3'-endo-Zuckerkonformation aufweisen. Die Phasenspektren der Zucker der Pyrimidinbasen enthaltenden Nukleotide weisen Nebenmaxima im Bereich der C2'-endo-Zuckerfaltung auf, wobei sich die wiederholten Ausflüge in die C2'-endo-Konformation der Nukleotide T16 und C16 insgesamt über mehr Makrozyklen erstrecken als dies bei den Zuckerkonformationen der Nukleotide T5 und C5 der Fall ist. Im Vergleich zu den Pyrimidinbasen enthaltenden Nukleotiden, verbleiben die Zuckerkonformationen der Purinbasen enthaltenden Nukleotide A6 und A15 mit Maxima der Phasenspektren bei 155° und 154° sowie G6 und G15 mit Maxima der Phasenspektren bei 149° im wesentlichen in der C2'-endo-Zuckerkonformation.

Genau zu den Verhältnissen der Zuckerfaltung bei symmetrischen Interkalationen in YpR-Basenschritte entgegengesetzt verhalten sich die Zuckerkonformationen bei symmetrischen Interkalationen in RpY-Basenschritte. In den Phasenspektren in den Abbn. 7.3 c.) und d.) für die symmetrische Interkalation in den ApT- bzw. GpC-Basenschritt wird ersichtlich, daß bei diesen Interkalationen die Zucker der Purinbasen enthaltenden Nukleotide vermehrt in einer C3'-endo-Konformation vorliegen, während die Zucker der Pyrimidinbasen enthaltenden Nukleotide die C2'-endo-Konformation bevorzugen. Die Hauptmaxima der Verteilungen der Phasen der Pyrimidinbasen enthaltenden Nukleotide T6 und T15 liegen mit 148° und 142° wie die Hauptmaxima der Phasenverteilungen der Nukleotide C6 und C15 mit 144° und 150° weitestgehend im Bereich der C2'-endo-Zuckerfaltung. Dagegen befinden sich die Hauptmaxima der Phasenverteilungen der Purinbasen enthaltenden Nukleotide A5 und A16 mit 5° und 6° wie die Hauptmaxima der Phasenverteilungen der Purinbasen enthaltenden Nukleotide G5 und G16 mit 4° und 3° im Bereich der C3'-endo-Zuckerfaltung. Allerdings bilden die Phasenspektren der Purinbasen enthaltenden Nukleotide deutliche Nebenmaxima im Bereich der C2'-endo-Zuckerfaltung aus, wohingegen die Zucker der Pyrimidinbasen enthaltenden Nukleotide zwar in Richtung der C3'-endo-Konformation variiert werden, dort allerdings keine Besetzungen zeigen. Dagegen prägen sie Nebenmaxima oder Schultern durch die Besetzung von O1'-endo-Zuckerfaltungen mit Phasen von 72°-108° aus. Insgesamt unterscheiden sich somit die symmetrischen Interkalationen durch im Mittel C2'-endo-Zuckerfaltungen der Pyrimidinbasen und C3'-endo-Zuckerfaltungen der Pu-

## 7. Monte-Carlo-Simulationen von Methylenblau-DNA-Komplexen

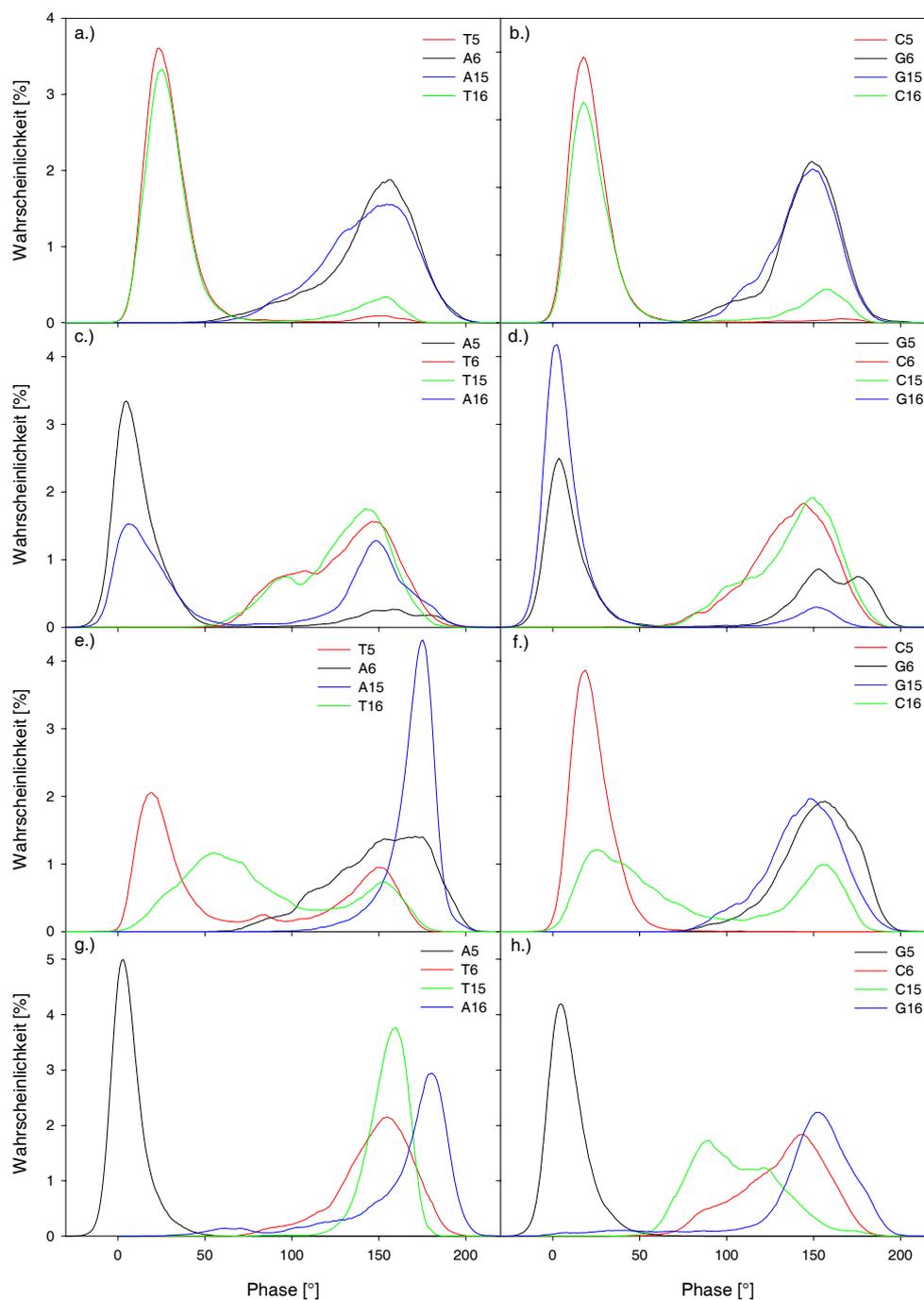


Abb. 7.3.: Besetzungswahrscheinlichkeiten der Phasen der die Interkalationstasche flankierenden Zucker für die equilibrierten Bereiche der MC-Simulationen von  $4 \cdot 10^5 - 10^6$  Makrozyklen der MB-DNA-Komplexe a.) *ic1-TpA*, b.) *ic1-CpG*, c.) *ic1-ApT* und d.) *ic1-GpC* mit symmetrischer Interkalation sowie der MB-DNA-Komplexe e.) *ic2-TpA*, f.) *ic2-CpG*, g.) *ic2-ApT* und h.) *ic2-GpC* mit gauche Interkalation des MB.

rinbasen enthaltenden Nukleotide bei Interkalationen in YpR-Basenschritte und umgekehrt C3'-endo-Zuckerfaltungen der Pyrimidinbasen und C2'-endo-Zuckerfaltungen der Purinbasen enthaltenden Nukleotide bei Interkalationen in RpY-Basenschritte. Die Hauptmaxima der Phasenspektren von Purinbasen enthaltenden Nukleotiden liegen dabei im Bereich der C3'-endo-Konformation bei Phasen von 3°-6°, während sich die Hauptmaxima der Phasenspektren von Pyrimidinbasen enthaltenden Nukleotiden im jeweils anderen Interkalationsmodus bei 18°-26° befinden. Dagegen liegen die Hauptmaxima der Phasenverteilungen der Purinbasen enthaltenden Nukleotide bei Interkalationen in YpR-Basenschritte im Bereich der C2'-endo-Konformation bei Phasen von 149°-155° und im jeweils anderen Interkalationsmodus die Hauptmaxima der Phasenverteilungen der Pyrimidinbasen enthaltenden Nukleotide bei nur 142°-150°. Bestätigung findet diese strukturelle Klassifizierung der Zuckerkonformationen bei symmetrischen Interkalationen in YpR- und RpY-Basenschritte in der Beobachtung, daß die Maxima in den Phasenspektren der beiden jeweils gleichen Nukleotide sehr nah beieinander liegen. Dadurch spiegelt sich die Symmetrie der symmetrischen Interkalationen in den Zuckerkonformationen der die Bindungstasche flankierenden Nukleotide wider.

Die Zuckerkonformationen der gauche Interkalationen zeichnen sich dadurch aus, daß der Zucker nur eines der vier die Interkalationstasche flankierenden Nukleotide stabil in der C3'-endo-Zuckerkonformation verbleibt. Das sind bei den in den Abbn. 7.3 e.) und f.) dargestellten Phasenspektren der gauche Interkalationen in die YpR-Basenschritte die eine Pyrimidinbase enthaltenden Nukleotide T5 bzw. C5. Die Zucker der jeweils zweiten, eine Pyrimidinbase enthaltenden Nukleotide T16 bzw. C16 befinden sich nahezu mit gleicher Wahrscheinlichkeit abwechselnd in der C3'-endo- und C2'-endo-Konformation. Eine detaillierte Auswertung der Trajektorie liefert dabei die Bestätigung, daß Übergänge zwischen diesen beiden Zuständen zahlreich in beiden Richtungen stattfinden. Die Zucker der Purinbasen enthaltenden Nukleotide nehmen dagegen eine stabile C2'-endo-Konformation ein. In Analogie zu den symmetrischen Interkalationen befindet sich bei den in den Abbn. 7.3 g.) und h.) dargestellten Phasenspektren der gauche Interkalationen in die RpY-Basenschritte jeweils ein Zucker der eine Purinbase enthaltenden Nukleotide in der C3'-endo-Konformation. Die Zucker der übrigen drei die Bindungstasche flankierenden Nukleotide befinden sich in der C2'-endo- oder teilweise auch in der O1'-endo-Konformation.

Zusammenfassend kann eingeschätzt werden, daß in den MC-Simulationen häufige Übergänge zwischen der C2'-endo- und der C3'-endo-Zuckerfaltung stattfinden und daß im wesentlichen diese beiden Zuständen besetzt werden. Außerdem wird die weitgehende Symmetrie der symmetrischen Interkalationen wie die vollständige Asymmetrie der gauche Interkalationen auch in den Besetzungswahrscheinlichkeiten der Phasen der die Bindungstasche flankierenden Zucker sichtbar.

## 7.2. Komplexbildung durch Bindung des Methylenblau in den Furchen der DNA-Dekamere

Die Flexibilität der MB-DNA-Komplexe mit Furchenbindung wird durch MC-Simulationen der in Kap. 6 diskutierten Strukturen AT-ming, GC-ming, AT-majg und GC-majg untersucht, bei denen MB in der kleinen bzw. großen Furche der beiden DNA-Dekamere mit alternierenden AT bzw. GC Basensequenzen gebunden ist. In die statistische Analyse der Konformationen wurde jede 10. Konformation der MB-DNA-Komplexe im equilibrierten Bereich der MC-Simulationen von  $4 \cdot 10^5 - 10^6$  Makrozyklen einbezogen.

### 7.2.1. Lage und Orientierung des Methylenblau in den Furchen

Die Lage und Orientierung des MB in der kleinen bzw. großen Furche der DNA-Dekamere wird mit den in Kap. 4 definierten helikalen Parametern des Liganden 4.25-4.30 beschrieben. Besetzungswahrscheinlichkeiten für Werte dieser helikalen Parameter des MB sind in den Abbn. 7.4 a.)-f.) für die Bindung in der kleinen Furche und in den Abbn. 7.4 g.)-m.) für die Bindung in der großen Furche der beiden Dekamere geglättet dargestellt. Bedeutsam für die Interpretation dieser Daten ist die Definition des in Abb. 4.5 dargestellten körperfesten Achsensystems des MB.

#### Bindung des MB in der kleinen Furche

In den MB-DNA-Komplexen AT-ming und GC-ming ist das MB in der kleinen Furche der beiden Dekamere derart gebunden, daß das Schwefelatom und das Stickstoffatom des mittleren heterozyklischen Ringes in der Ebene eines Basenpaares liegen und die Methylgruppen auf der Seite des Schwefelatoms aus der Furche hinausweisen. In dem Komplex GC-ming wird dem Stickstoffatom so ermöglicht, eine Wasserstoffbrücke mit dem Proton der Aminogruppe eines Guanins der DNA auszubilden und dadurch die Bindung zusätzlich zu stabilisieren. Die Architektur dieser Bindung bleibt in den MC-Simulationen für die Bindung des MB mit beiden Dekameren im wesentlichen erhalten. So liegen die Mittelwerte des in Abb. 7.4 a.) dargestellten X-Displacements bei der Bindung des MB in der kleinen Furche des AT alternierenden Dekamers bei  $8,6 \text{ \AA}$  und bei der Bindung in der kleinen Furche des GC alternierenden Dekamers bei  $9,7 \text{ \AA}$ . In beiden Fällen ist das X-Displacement positiv, obwohl die  $\vec{v}$ -Achse des Referenzbasenpaares von der kleinen in die große Furche zeigt, weil die  $\vec{x}$ -Achse des MB in entgegengesetzter Richtung zur  $\vec{v}$ -Achse aus der kleinen Furche hinauszeigt. Das positive Vorzeichen des X-Displacements charakterisiert somit eine Orientierung des MB in der kleinen Furche mit aus der Furche weisenden Methylgruppen, einem nach außen gerichteten Schwefelatom und einem in die Furche gerichtetem zentralen Stickstoffatom. Der Wert des X-Displacements ist relativ groß, weil der Ursprung des körperfesten Achsensystems des MB im nach außen gerichteten Schwefelatom liegt. Das um  $1,1 \text{ \AA}$  geringere mittlere X-Displacement bei Bindung in der kleinen Furche des AT alternierenden Dekamers beruht auf der höheren Flexibilität dieses Dekamers und des daher möglichen, tieferen Eindringens des MB in die Furche.

Die Mittelwerte des in Abb. 7.4 b.) dargestellten Y-Displacements deuten mit Werten von  $0,7 \text{ \AA}$  für die Bindung mit dem AT und  $0,1 \text{ \AA}$  für die Bindung mit dem GC alter-

nierenden Dekamer auf eine zentrale Positionierung des MB in der kleinen Furche hin. Wie die Besetzungswahrscheinlichkeiten des X- und Y-Displacements besitzen auch die in den Abb. 7.4 d.) und e.) dargestellten Besetzungswahrscheinlichkeiten der Inclination und des Tip eindeutige Maxima. Die Mittelwerte der Inclination liegen bei  $30,0^\circ$  für die Bindung mit dem AT und bei  $33,6^\circ$  für die Bindung mit dem GC alternierenden Dekamer. Die Inclination charakterisiert damit die Orientierung der langen Achse des MB parallel zu den beiden, die Furche bildenden Nukleinsäuresträngen. Diese stabile Orientierung des MB hinsichtlich Rotationen um seine kurze Achse zeichnet sich durch geringe Fluktuationen der Inclination von  $4,1^\circ$ - $4,6^\circ$  aus. Fluktuationen des Tip von  $8,1^\circ$ - $8,3^\circ$  deuten auf eine etwas variabelere Orientierung des MB hinsichtlich Rotationen um seine lange Achse hin.

Der in Abb. 7.4 c.) dargestellte Rise spezifiziert die Basenpaare, mit denen das MB in Wechselwirkung tritt, und damit die Bindungsstellen in der kleinen Furche. Im Gegensatz zu den Verteilungen der bisher diskutierten helikalen Parameter unterscheiden sich die Verteilungen der Rise-Werte für die Bindung des MB in den kleinen Furchen der beiden Dekamere grundlegend. Die Besetzungswahrscheinlichkeit des Rise besitzt für die Bindung des MB mit dem AT alternierenden Dekamer 4 verschiedene Maxima bei etwa  $-3,4 \text{ \AA}$ ,  $0,0 \text{ \AA}$ ,  $3,0 \text{ \AA}$  und  $6,2 \text{ \AA}$ . Die Differenz zwischen diesen Maxima entspricht ungefähr dem Rise zwischen zwei benachbarten Basenpaaren. Eine detaillierte Untersuchung der Trajektorie liefert die Bestätigung, daß das MB während der MC-Simulation entlang der kleinen Furche wandert, wobei die Achse zwischen dem Schwefel- und dem zentralen Stickstoffatom in wenigen Makrozyklen von der Ebene eines Basenpaares zur Ebene des nächsten Basenpaares wechselt, dort aber eine größere Zahl von Makrozyklen verweilt, wodurch sich die Maxima in der Besetzungswahrscheinlichkeit des Rise ausbilden. Die verschiedenen Maxima in der Besetzungswahrscheinlichkeit des Rise identifizieren unterschiedliche Bindungsstellen. Die Auswertung der Trajektorie deutet auf einen mehrfachen Wechsel der Bindungsstellen des MB und damit ein mehrfaches Wandern des MB in der kleinen Furche in beiden Richtungen hin. Schnappschüssen entsprechende Konformationen sind in Abb. 7.5 dargestellt. In der Startkonfiguration ist MB mit einem Rise von  $0,0 \text{ \AA}$  an das Referenzbasenpar T5/A15 gebunden. Nach  $5,5 \cdot 10^5$  Makrozyklen ist MB, wie in Abb. 7.5 a.) dargestellt, mit einem Rise von  $6,3 \text{ \AA}$  am Basenpaar T7/A17 lokalisiert. Diese Bindung geht nach  $6,5 \cdot 10^5$  Makrozyklen, wie in Abb. 7.5 b.) dargestellt, wieder in eine Lokalisation des MB am Basenpaar T5/A15 mit einem Rise von  $0,1 \text{ \AA}$  über, wobei das MB zwischen diesen Konformationen auch für wenige Makrozyklen am Basenpaar A4/T14 gebunden war. In Abb. 7.5 c.) ist die Bindung des MB am Basenpaar T3/A13 nach  $8,9 \cdot 10^5$  Makrozyklen dargestellt. Mit einem Rise von  $-4,6 \text{ \AA}$  liegen in diesem Schnappschuß das Schwefel- und das zentrale Stickstoffatom allerdings noch nicht in der Ebene des Basenpaares T3/A13. Die Besetzungswahrscheinlichkeit des Rise weist beim Twist von  $0,0 \text{ \AA}$  aufgrund der endlichen Ausdehnung des Dekamers ihr größtes Maximum auf, während die Höhe der Maxima nach den Enden hin abnimmt. Bei einer MC-Simulation mit einer größeren Zahl von Makrozyklen kann eine Symmetrisierung der Besetzungswahrscheinlichkeit in Abb. 7.4 c.) erwartet werden.

Das mehrfache Wechseln der Bindungsstelle des MB in der kleinen Furche des AT alternierenden Dekamers kann bei der Bindung in der kleinen Furche des GC alternierenden Dekamers nicht beobachtet werden. In Abb. 7.4 c.) wird ersichtlich, daß die Besetzungswahrscheinlichkeit des Rise ein ausgeprägtes Maximum bei ca.  $-3,0 \text{ \AA}$  und

## 7. Monte-Carlo-Simulationen von Methylenblau-DNA-Komplexen

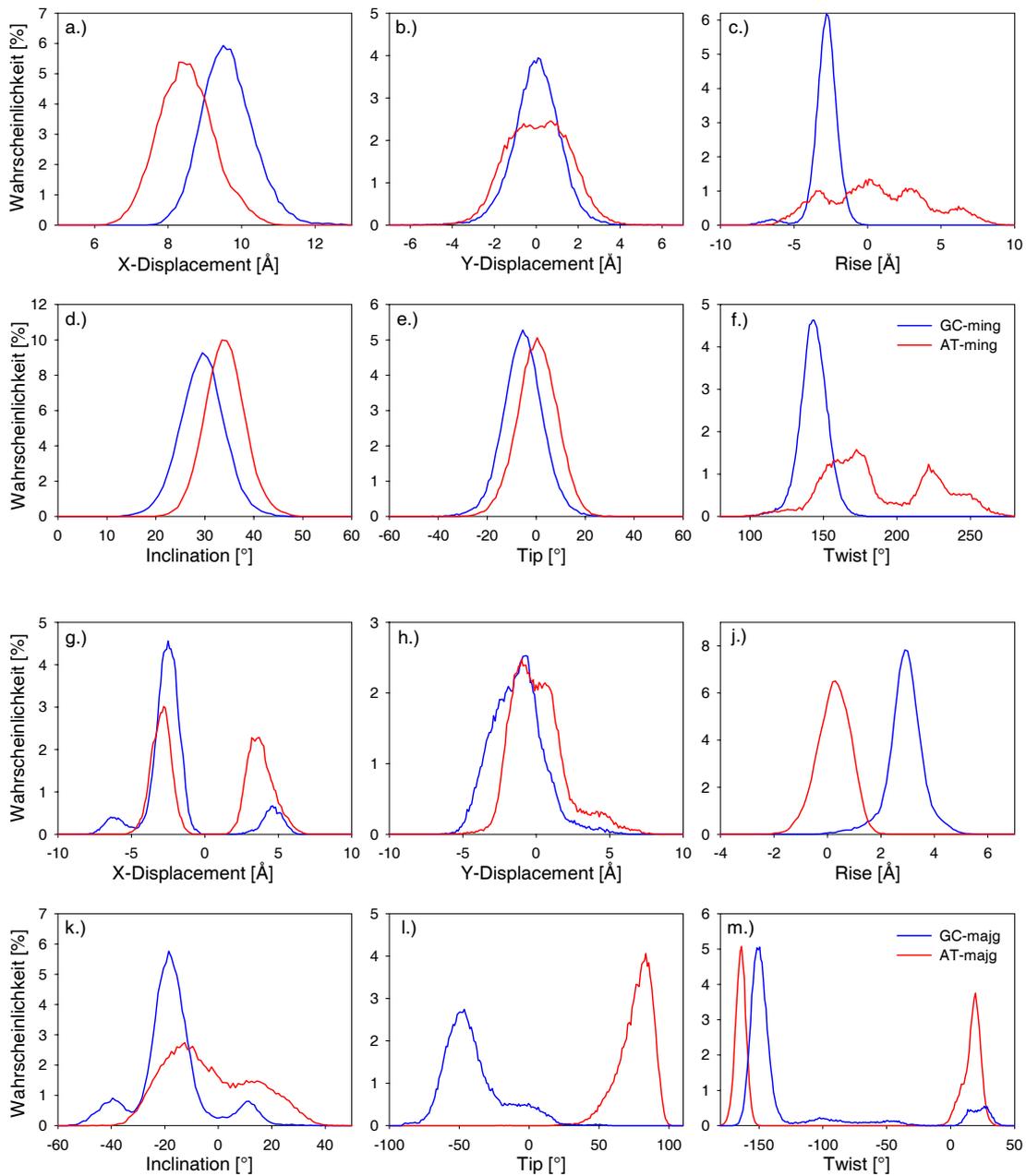


Abb. 7.4.: Besetzungswahrscheinlichkeiten der helikalen Parameter  $X$ -Displacement,  $Y$ -Displacement, Rise, Inclination, Tip und Twist des Methylenblau für die MB-DNA-Komplexe AT-ming und GC-ming mit Bindung des MB in der kleinen Furche in den Abb. a.)-f.) und für die MB-DNA-Komplexe AT-majg und GC-majg mit Bindung des MB in der großen Furche in den Abb. g.)-m.). Die helikalen Parameter des MB sind auf das in Abb. 4.5 definierte körperfeste Achsensystem des MB relativ zu dem in 5'-Richtung des ersten Stranges benachbarten Basenpaar bezogen.

nur ein kleines Nebenmaximum bei ca.  $-6,2 \text{ \AA}$  besitzt. Das MB ist somit stabil am Basenpaar C4/G14 gebunden, wobei es während der Equilibrierungsphase viele Makrozyklen am Basenpaar G5/C15 gebunden war. Die Bindung am Basenpaar C4/G14 wird auch in der in Abb. 7.5 d.) dargestellten, einem Schnappschuß nach  $6 \cdot 10^5$  Makrozyklen entsprechenden Konformation ersichtlich. Das Nebenmaximum bei einem Rise von ca.  $-6,2 \text{ \AA}$  weist auf eine Bindung am Basenpaar G3/C16 hin. Das MB bewegt sich somit während der MC-Simulation der Bindung des MB in der kleinen Furche des GC alternierenden Dekamers nur in Richtung negativer Rise-Werte. Eine MC-Simulation mit weit mehr Makrozyklen könnte somit ein mit der Bindung in der kleinen Furche des AT alternierenden Dekamers vergleichbares Wandern des MB ergeben. Resultat des Vergleiches beider Simulationen ist allerdings, daß das MB in der kleinen Furche des GC alternierenden Dekamers weit stärker lokalisiert ist als in der kleinen Furche des AT alternierenden Dekamers. Diese stärkere Lokalisation des MB in der kleinen Furche des GC alternierenden Dekamers kann auf die zusätzliche Stabilisierung der Bindung durch die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zwischen dem zentralen Stickstoffatom des MB und dem Proton der Aminogruppe eines Guanins der DNA zurückgeführt werden. Trotz unterschiedlich starker Lokalisation der Bindung besitzt das MB definierte Bindungsstellen in der kleinen Furche beider Dekamere.

Der in Abb. 7.4 f.) dargestellte Twist ist mit dem Rise korreliert und identifiziert ebenfalls die Bindungsstellen des MB in der kleinen Furche. Ist das MB an das Referenzbasenpaar gebunden und weisen die Methylgruppen aus der kleinen Furche hinaus, liegt der Twist des MB bei Werten um  $180^\circ$ . In Abb. 7.4 f.) sind negative Twist-Werte im Bereich zwischen  $180^\circ$  und  $360^\circ$  dargestellt, um die Besetzungswahrscheinlichkeit des Twist mit der des Rise unmittelbar vergleichen zu können. Das bei ca.  $180^\circ$  liegende Hauptmaximum der Verteilung des Twists bei der Bindung des MB in der kleinen Furche des AT alternierenden Dekamers entspricht der Bindung des MB am Referenzbasenpaar T5/A14. Weitere Nebenmaxima befinden sich bei ca.  $150^\circ$ ,  $220^\circ$  und  $250^\circ$ . Die Abstände zwischen den 4 Maxima der Besetzungswahrscheinlichkeit des Twists entsprechen mit  $30^\circ$ - $40^\circ$  ungefähr Twist-Werten zwischen Basenpaaren, so daß Twists des Liganden um die  $150^\circ$  der Bindung am Basenpaar A6/T16,  $180^\circ$  der Bindung am Basenpaar T5/A15,  $220^\circ$  der Bindung am Basenpaar A4/T14 und  $250^\circ$  der Bindung am Basenpaar T3/A13 zugeordnet werden können. Aufgrund der hohen Flexibilität des AT alternierenden Dekamers nimmt die klare Ausprägung der Maxima der Besetzungswahrscheinlichkeit des Twists mit zunehmender Entfernung vom Zentrum des Dekamers ab. Daher sind die den Bindungen an den beiden zentralen Basenpaaren T5/A15 und A6/T16 zuzuordnenden Maxima am deutlichsten voneinander separiert. Die Verteilung des Twists des MB bei Bindung in der kleinen Furche des GC alternierenden Dekamers weist wie die Verteilung des Rise ein ausgeprägtes Maximum auf, das sich bei ca.  $145^\circ$  befindet und auf eine stabile Bindung des MB am Basenpaar C4/G14 hindeutet. Eine kleine Schulter bei ca.  $115^\circ$  weist auf eine Bindung des MB am Basenpaar G3/C13 während weniger Makrozyklen hin. Damit zeigt auch die Verteilung des Twists eindeutige Bindungsstellen des MB in der kleinen Furche, die mit den bereits diskutierten Konformationen korrespondieren. Allerdings ist der Twist im Vergleich zum Rise weit mehr von der Flexibilität des Target-Dekamers abhängig, so daß in der Verteilung des Twists die Bindungsstellen etwas weniger eindeutig identifizierbar sind als in der Verteilung des Rise.

### Bindung des MB in der großen Furche

Die Bindungsenergien in Kap. 6 deuten wie die experimentellen Daten [100] nicht auf eine stabile Bindung des MB in der großen Furche von Polynukleotiden mit AT bzw. GC alternierenden Basensequenzen hin, so daß von einer großen Beweglichkeit des MB in der großen Furche ausgegangen werden kann. Ziel der MC-Simulationen ist es, eventuell dabei energetisch bevorzugte Bindungszustände beschreiben zu können.

Die in Abb. 7.4 g.) dargestellte Verteilung des X-Displacements gliedert sich für die Bindung des MB in der großen Furche des AT und des GC alternierenden Dekamers in Besetzungswahrscheinlichkeiten für negative und für positive Werte des X-Displacements. Bei der Bindung des MB in der großen Furche des AT alternierenden Dekamers besitzen 50,1 % der Konformationen ein negatives X-Displacement mit einem mittleren Wert von  $-2,9 \text{ \AA}$ . Das mittlere X-Displacement der übrigen 49,9 % der Konformationen mit positivem X-Displacement beträgt  $3,8 \text{ \AA}$ . Das unterschiedliche Vorzeichen des X-Displacements kommt durch einen Wechsel zwischen einer Orientierung des MB mit aus der Furche gerichteten Methylgruppen bei positivem und in die Furche gerichteten Methylgruppen bei negativem X-Displacement zustande. Dieser Vorzeichenwechsel des X-Displacements ereignet sich im Verlaufe der MC-Simulation sehr häufig. In der in Abb. 7.5 e.) dargestellten, einem Schnappschuß nach  $4,3 \cdot 10^5$  Makrozyklen entsprechenden Konformation wird ersichtlich, daß Orientierungen des MB mit positivem und negativem X-Displacement sich strukturell nicht unbedingt stark unterscheiden müssen. Liegt das planare  $\pi$ -Elektronensystem tief in der Furche eng an der Oberfläche der DNA an, ist die kurze Achse des MB in etwa parallel zur helikalen Achse orientiert. Eine Bewegung um die lange Achse des MB führt dann dazu, daß in der Projektion auf die in die große Furche zeigende  $\vec{v}$ -Achse des Referenzbasenpaares die Methylgruppen abwechselnd aus der Furche hinaus oder in die Furche hinein zeigen. Diese Bewegung führt zu der in Abb. 7.4 g.) ersichtlichen Aufspaltung des X-Displacements in positive und negative Werte.

Auch die Besetzungswahrscheinlichkeit des X-Displacements für die Bindung in der großen Furche des GC alternierenden Dekamers diskriminiert positive und negative Werte. Allerdings besitzen hier 89,4 % der Konformationen negative Werte mit einem mittleren X-Displacement von  $-2,8 \text{ \AA}$  und nur 10,5 % der Konformationen positive Werte mit einem mittleren X-Displacement von  $4,6 \text{ \AA}$ . Der deutliche Unterschied in den Beträgen der beiden mittleren Werte von  $1,8 \text{ \AA}$  ergibt sich aus der Definition des körperfesten Achsensystems des MB im Zentrum des Schwefelatoms, denn bei positivem X-Displacement und damit aus der Furche gerichteten Methylgruppen ist das Schwefelatom ebenfalls nach außen orientiert, während es bei negativem X-Displacement tief in die Furche eindringen kann. Das Zentrum des MB befindet sich aber nicht im Schwefelatom, sondern auf der  $3,13 \text{ \AA}$  langen Achse zwischen dem Schwefel- und dem zentralen Stickstoffatom. Im Gegensatz zur Verteilung des X-Displacements bei Bindung des MB in der großen Furche des AT alternierenden Dekamers besitzt die Verteilung des X-Displacements bei Bindung des MB in der großen Furche des GC alternierenden Dekamers ein Nebenmaximum bei ca.  $-6,4 \text{ \AA}$ , dem eine Bindung des MB am Rückgrat des Dekamers durch Orientierung der langen Achse des MB entlang eines der Phosphodiester-Stränge entspricht. In Abb. 7.5 h.) ist diese Bindung in einer Struktur dargestellt, die einem Schnappschuß nach  $10^6$  Makrozyklen entspricht.

Die in Abb. 7.4 h.) dargestellte Besetzungswahrscheinlichkeit des Y-Displacements deu-

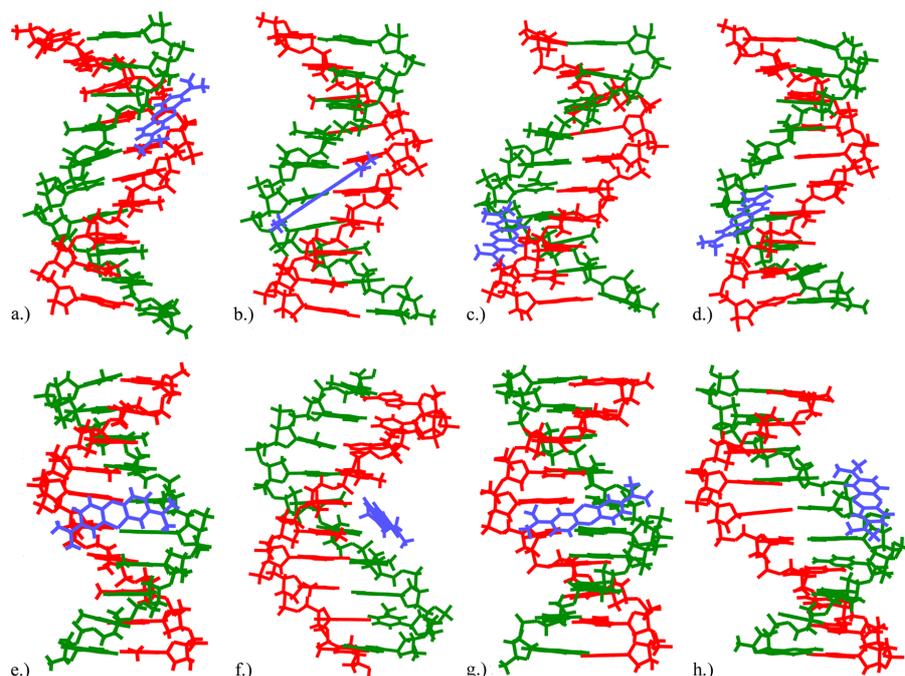


Abb. 7.5.: Schnappschüssen entsprechende Konformationen der MB-DNA-Komplexe AT-ming nach a.)  $5,5 \cdot 10^5$ , b.)  $6,5 \cdot 10^5$  und c.)  $8,9 \cdot 10^5$  Makrozyklen sowie d.) GC-ming nach  $6 \cdot 10^5$  Makrozyklen mit Bindung des MB in der kleinen Furche bzw. der MB-DNA-Komplexe AT-majg nach e.)  $4,3 \cdot 10^5$  und f.)  $9,4 \cdot 10^5$  Makrozyklen sowie GC-majg nach g.)  $6 \cdot 10^5$  und h.)  $10^6$  Makrozyklen mit Bindung des MB in der großen Furche.

tet mit einem Mittelwert von  $0,2 \text{ \AA}$  für die Bindung des MB in der großen Furche des AT und mit einem Mittelwert von  $-1,2 \text{ \AA}$  für die Bindung des MB in der großen Furche des GC alternierenden Dekamers auf eine relativ zentrale mittlere Lage des MB in der großen Furche hin. Fluktuationen des Y-Displacements von  $1,7\text{-}1,9 \text{ \AA}$  charakterisieren allerdings die recht starke Bewegung des MB in der großen Furche. Die in Abb. 7.4 j.) dargestellte Verteilung des Rise ist für die Bindung des MB mit beiden Dekameren dagegen mit Fluktuationen von  $0,6\text{-}0,7 \text{ \AA}$  relativ stabil, so daß seitliche Verschiebungen und Rotationen um die lange Achse des MB energetisch günstiger als notwendige Umorientierungen bei Bewegung entlang der großen Furche erscheinen. Schließlich verbleibt das MB mit einem mittleren Rise von  $0,3 \text{ \AA}$  in der Nähe des Basenpaares A5/T15 des AT alternierenden Dekamers bzw. mit einem mittleren Rise von  $3,0 \text{ \AA}$  in der Nähe des Basenpaares C6/G16 des GC alternierenden Dekamers, obwohl es mehrfach in die Umgebung des Basenpaares G5/C16 zurückkehrt, so daß von einer Bindung zwischen den beiden zentralen Basenpaaren gesprochen werden kann.

Die in Abb. 7.4 k.) dargestellten Besetzungswahrscheinlichkeiten der Inclination zeigen eine deutliche Korrelation mit dem X-Displacement, indem Maxima bei positiven und negativen Inclinationen auftreten, die wiederum die Orientierung des MB durch in die Furche oder aus der Furche weisende Methylgruppen charakterisieren. Veranschaulicht werden die unterschiedlichen Orientierungen des MB durch die Schnappschuß-Konformationen in den Abbn. 7.5 e.)-h.), denn in den meisten Strukturen liegt das MB so in der Furche, daß es der großen Furche mit seiner lange Achse folgt, wobei

die Orientierung der Methylgruppen dabei unwesentlich ist. Energetisch stabilisierend scheint ein enger Kontakt des  $\pi$ -Elektronensystems des MB an der Oberfläche der DNA innerhalb der Furche. In Abb. 7.5 e.) ist eine solche, relativ häufig auftretende, einem Schnappschuß nach  $4,3 \cdot 10^5$  Makrozyklen entsprechende Struktur für die Bindung des MB in der großen Furche des AT alternierenden Dekamers mit einer Inclination von  $-15,6^\circ$  dargestellt. Eine vergleichbare Konformation mit einer Inclination von  $-16,9^\circ$ , die einem Schnappschuß nach  $6 \cdot 10^5$  Makrozyklen entspricht, ist für die Bindung des MB in der großen Furche des GC alternierenden Dekamers in Abb. 7.5 g.) dargestellt. In beiden Konformationen sind die Inclinationen negativ, weil die Methylgruppen in die Furche hinein orientiert sind. Bewegt sich das MB etwas weiter weg von der DNA-Oberfläche und folgt mit seiner langen Achse nicht mehr streng der Furche, sind auch geringe Inclinationen möglich. In der in Abb. 7.5 f.) dargestellten, einem Schnappschuß nach  $9,4 \cdot 10^5$  Makrozyklen entsprechenden Konformation mit einer Inclination von  $0,4^\circ$  hat sich das MB etwas von der DNA-Oberfläche in der Furche entfernt. Das in Abb. 7.4 k.) ersichtliche Nebenmaximum der Besetzungswahrscheinlichkeit der Inclination bei  $-40^\circ$  entspricht einer in dem Schnappschuß in Abb. 7.5 h.) dargestellten Bindung des MB an einem der Phosphodiesterstränge.

Die aus der Abb. 7.4 l.) ersichtlich werdenden Maxima der Besetzungswahrscheinlichkeiten des Tip liegen für die Bindung des MB in der großen Furche des AT alternierenden Dekamers bei ca.  $85^\circ$  und für die Bindung des MB in der großen Furche des GC alternierenden Dekamers bei ca.  $-48^\circ$ . Diesen relativ stabilen Tip-Werten entsprechen die in Abb. 7.5 e.) dargestellte, einem Schnappschuß nach  $4,3 \cdot 10^5$  Makrozyklen entsprechende Struktur mit einem Tip von  $80,5^\circ$  bei Bindung des MB in der großen Furche des AT alternierenden Dekamers und die in Abb. 7.5 g.) dargestellte, einem Schnappschuß nach  $6 \cdot 10^5$  Makrozyklen entsprechende Struktur mit einem Tip von  $-43,2^\circ$  bei Bindung des MB in der großen Furche des GC alternierenden Dekamers. Beide Konformationen unterscheiden sich im wesentlichen durch die Orientierung der Methylgruppen in Richtung des 5'-Endes oder in Richtung des 3'-Endes des 1. Stranges der Target-Dekamere. Diese Orientierungen bleiben im wesentlichen während der Simulation erhalten, wobei bei MC-Simulationen mit einer höheren Zahl von Makrozyklen eine Richtungsumkehr erwartet werden kann. Nur bei Bindung in der großen Furche des GC alternierenden Dekamers nimmt das MB auch eine Lage ein, in der das  $\pi$ -Elektronensystem zur helikalen Achse senkrecht orientiert ist und das Dekamer durch eine starke Krümmung das MB einhüllt. Diese Konformation führt zu einem Nebenmaximum in der Besetzungswahrscheinlichkeit des Tip bei ca.  $0^\circ$ .

Ebenfalls korreliert mit der Verteilung des X-Displacements ist die in Abb. 7.4 m.) dargestellte Besetzungswahrscheinlichkeit des Twists. Auch hier erfolgt eine Aufspaltung in negative und positive Twist-Werte. Bei einer Bindung in der großen Furche des AT alternierenden Dekamers besitzt das MB in 50,9 % der Strukturen einen negativen Twist mit einem mittleren Wert von  $-161,7^\circ$  und in 49,9 % der Konformationen einen positiven Twist mit einem mittleren Wert von  $16,8^\circ$ . Dagegen besitzt das MB bei einer Bindung in der großen Furche des GC alternierenden Dekamers in 89,5 % der Strukturen einen negativen Twist mit einem Mittelwert von  $-141,6^\circ$  und in den übrigen 10,5 % der Konformationen mit einem mittleren Wert von  $21,6^\circ$  einen positiven Twist. Auch hier unterscheiden sich die Konformationen mit Twists unterschiedlichen Vorzeichen nicht sehr stark voneinander, da die Orientierung der Methylgruppen ins Innere bzw. ins Äußere der großen Furche den Vorzeichenwechsel bewirken und die

Differenz der negativen Twists zu  $-180^\circ$  ungefähr der Differenz der positiven Twists zu  $0^\circ$  entspricht. Eine Ausnahme bilden die negativen Twists bei Bindung des MB in der großen Furche des GC alternierenden Dekamers, da in deren Mittelwert zwei Nebenmaxima bei ca.  $-100^\circ$  und  $-50^\circ$  eingehen. Das Nebenmaximum bei  $-100^\circ$  entsteht während des schrittweisen Konformationsüberganges von der Bindung tief in der Furche zum Phosphodiester-Rückgrat, wohingegen das Nebenmaximum bei  $-50^\circ$  der Bindung des MB am Phosphodiester-Rückgrat entspricht, die in der Konformation des in Abb. 7.5 h.) dargestellten Schnappschusses nach  $10^6$  Makrozyklen ausgebildet ist.

### 7.2.2. Konformationsänderungen der Target-Dekamere

Im Vergleich zu der für eine Interkalation des MB notwendigen sehr starken Deformation der Struktur der Target-DNA zeigen die Konformationen der beiden Target-Dekamere bei einer Bindung des MB in der kleinen oder der großen Furche deutlich geringere Konformationsänderungen gegenüber den in Kap. 5 ausführlich diskutierten Strukturen der freien Dekamere mit alternierenden AT bzw. GC Basensequenzen. Die mittleren helikalen Parameter Rise und Twist sowie die mittleren Phasen der Zucker des zentralen Bereichs der Dekamere sind in Tab. 7.3 angegeben.

Die Rise-Werte des AT alternierenden Dekamers sind bei der Bindung des MB in der kleinen Furche beeinflusst, während die Rise-Werte des GC alternierenden Dekamers bei der Bindung des MB in der großen Furche gegenüber den in Tab. 5.3 angegebenen Werten der freien Dekamere variiert sind. In Tab. 7.3 a.) wird ersichtlich, daß bei Bindung des MB in der kleinen Furche des AT alternierenden Dekamers der Rise des zentralen Basenschritts reduziert und die Rise-Werte etwas weiter vom Zentrum des Dekamers entfernter Basenschritte erhöht sind. Bei Bindung des MB in der großen Furche des GC alternierenden Dekamers sind in Tab. 7.3 d.) im Mittel die Rise-Werte aller Basenschritte verringert. Diese Veränderungen der Rise-Werte gegenüber den freien Dekameren deuten, da sie sich auf die beste lineare Achse beziehen, auf Krümmungen der Target-Dekamere hin, die durch die Wechselwirkung mit dem MB hervorgerufen werden. Nimmt das Dekamer eine Konformation ein, in der es das MB einzuhüllen versucht, sinken die Rise-Werte. Die deutliche Reduktion der mittleren Rise-Werte infolge einer das MB einhüllenden Nukleinsäurekonformation bei der Bindung des MB in der großen Furche des MB korrespondiert mit ebenfalls starken einhüllenden Krümmungen des Target-Dekamers bei Interkalationen des MB in den 5'-GpC-3'-Basenschritt.

Ebenfalls auf Krümmungen infolge der Furchenbindungen des MB können Veränderungen der mittleren Twist-Werte der Target-Dekamere gegenüber den freien Konformationen zurückgeführt werden. Die mittleren Twists der TpA-Basenschritte steigen bei der Bindung des MB in der kleinen Furche des AT alternierenden Dekamers auf Werte von  $37,5^\circ$ - $41,8^\circ$  und bei der Bindung in der großen Furche auf Werte von  $36,2^\circ$ - $39,9^\circ$ , womit der mittlere Twist teilweise deutlich über den  $35^\circ$ - $37^\circ$  für TpA-Basenschritte des freien Dekamers liegt. Die mittleren Twists der ApT-Basenschritte liegen dagegen wie bei den freien Dekameren zwischen  $32^\circ$ - $34^\circ$ . In Analogie dazu steigen die mittleren Twists der CpG-Basenschritte auf  $33,5^\circ$ - $36,8^\circ$  gegenüber  $32,3^\circ$ - $33,5^\circ$  der freien Dekamere. Die mittleren Twists der GpC-Basenschritte liegen dagegen mit  $35^\circ$ - $37,9^\circ$  nur wenig über den mittleren Twists der GpC-Basenschritte der freien Dekamere mit  $35,5^\circ$ - $36,5^\circ$ . Insgesamt führen die Krümmungen infolge der Bindung des MB in der kleinen oder der großen Furche somit zu größeren Twists der YpR-Basenschritte, während die Twists

7. Monte-Carlo-Simulationen von Methylenblau-DNA-Komplexen

	Basenschritt	$dZ$ [Å]	$\sigma$ [Å]	$\Omega$ [°]	$\sigma$ [°]	Nukleotid	$P$ [°]	$\sigma$ [°]
a.)	TpA3	3,69	0,57	39,15	5,82	A4	153,9	23,4
	ApT4	3,48	0,39	32,96	4,45	T5	149,4	16,5
	TpA5	3,07	0,38	40,78	5,03	A6	168,7	19,4
	ApT6	3,31	0,34	33,14	4,69	T7	145,8	15,8
	TpA7	3,60	0,55	38,27	5,20			
	TpA12	3,50	0,66	38,88	4,98	T14	146,9	17,4
	ApT13	3,31	0,33	33,13	4,93	A15	165,4	20,4
	TpA14	3,16	0,39	41,83	5,74	T16	146,5	21,4
	ApT15	3,48	0,38	33,06	4,19	A17	152,2	24,0
	TpA16	3,68	0,50	37,47	5,48			
b.)	GpC3	3,36	0,34	37,11	3,98	C4	147,8	18,2
	CpG4	3,24	0,31	34,78	4,38	G5	170,4	13,9
	GpC5	3,42	0,29	36,95	3,81	C6	155,7	14,8
	CpG6	3,34	0,32	33,96	4,16	G7	156,4	15,0
	GpC7	3,32	0,32	36,48	4,13			
	GpC12	3,32	0,30	35,35	3,92	G14	153,2	17,6
	CpG13	3,16	0,29	36,85	4,39	C15	150,2	20,8
	GpC14	3,50	0,30	36,95	3,88	G16	157,0	15,5
	CpG15	3,32	0,35	33,71	4,25	C17	151,0	18,2
	GpC16	3,38	0,31	36,29	4,15			
b.)	ApT3	3,49	0,48	32,64	4,19	T4	147,2	15,7
	TpA4	3,19	0,42	36,22	4,44	A5	161,7	25,7
	ApT5	3,24	0,32	32,14	4,01	T6	144,5	18,2
	TpA6	3,36	0,42	39,90	5,70	A7	151,0	20,8
	ApT7	3,31	0,40	32,67	4,63			
	ApT12	3,27	0,40	33,62	4,69	A14	151,3	19,7
	TpA13	3,36	0,39	38,29	5,12	T15	138,5	23,4
	ApT14	3,20	0,29	32,55	3,86	A16	167,3	27,6
	TpA15	3,25	0,44	36,22	4,49	T17	144,1	21,5
	ApT16	3,47	0,47	33,21	4,47			
d.)	GpC3	3,25	0,32	37,87	3,72	C4	160,1	13,4
	CpG4	3,08	0,30	33,37	4,07	G5	156,3	21,4
	GpC5	3,20	0,28	35,04	3,91	C6	156,0	22,9
	CpG6	3,13	0,31	35,20	3,83	G7	150,6	14,0
	GpC7	3,27	0,34	36,42	3,94			
	GpC12	3,24	0,31	37,92	3,68	G14	155,3	14,5
	CpG13	3,09	0,31	33,23	4,23	C15	137,6	22,9
	GpC14	3,18	0,28	35,83	4,05	G16	170,7	15,1
	CpG15	3,11	0,32	34,47	3,67	C17	149,5	20,8
	GpC16	3,20	0,34	36,59	4,05			

Tabelle 7.3.: Mittlere helikale Parameter Rise  $dZ$  und Twist  $\Omega$  einschließlich der Fluktuationen  $\sigma$  der zentralen Basenschritte sowie mittlere Phasen  $P$  der Zucker und deren Fluktuationen  $\sigma$  der zentralen Nukleotide der MB-DNA-Komplexe a.) AT-ming, b.) GC-ming, c.) AT-majg und d.) GC-majg. Die Mittelung der strukturellen Parameter bezieht jede 10. Konformation nach der Equilibrierung ( $4 \cdot 10^5 - 10^6$  Makrozyklen) ein.

der RpY-Basenschritte nahezu nicht beeinflusst werden.

Mit Ausnahme der mittleren Phasen der Zuckerfaltung der die Pyrimidinbasen T15 und C15 enthaltenden Nukleotide bei der Bindung des MB in der großen Furche liegen die in Tab. 7.3 angegebenen mittleren Phasen der Zucker der jeweils 8 zentralen Nukleotide der Target-Dekamere über den mittleren Phasen der Zucker der freien Dekamere. Die Phasen der Nukleotide, in deren unmittelbarer Umgebung das MB in der kleinen oder der großen Furche gebunden ist, werden also durch die Bindung bzw. die Konformationsänderung der Target-Dekamere beeinflusst. Erhalten bleibt die Rangfolge größerer Phasen der Purinbasen enthaltenden Nukleotide gegenüber den Phasen der Pyrimidinbasen enthaltenden Nukleotide bei der Bindung in der kleinen und in der großen Furche unabhängig von der Sequenz.

Auch wenn die Furchenbindung die Konformation der Target-Dekamere weniger stark als eine Interkalation beeinflusst, kann doch eine Deformation der Target-Dekamere infolge der Furchenbindung festgestellt werden. Diese Deformation ergibt sich im wesentlichen aus Krümmungen der Target-Dekamere, die das MB stärker zu umschließen versuchen. Diese Krümmung fällt besonders stark bei der Bindung des MB in der großen Furche des GC alternierenden Dekamers aus.

### 7.3. Diskussion der Resultate, Teil III

Über die Flexibilität und Dynamik der DNA-Liganden-Bindung liegen bisher nur sehr wenige Erkenntnisse vor. Experimentell sind die Flexibilität und Dynamik der DNA-Liganden-Bindung schwer zugänglich. Spektroskopische Daten lassen sich hinsichtlich der Flexibilität der MB-DNA-Bindung und der Beweglichkeit des Liganden nicht eindeutig interpretieren [100]. MD-Simulationen sind entweder auf sehr kleine Systeme bzw. auf Simulationen über sehr kurze Zeitskalen beschränkt [183]. So wurde in MD-Simulationen die Wechselwirkung des MB mit nur einer Guaninbase untersucht [184]. Eine MD-Simulation eines Proflavin-DNA-Komplexes mit einem Dodekamer als Target-DNA erstreckt sich nur über ein Zeitintervall von 90 ps und erreicht damit längst nicht die notwendige Equilibrierung [84]. Da die Equilibrierung der MD-Simulationen von DNA-Liganden-Komplexen auch mit heute verfügbaren Rechnerleistungen schwer erreichbar ist, sind theoretische Untersuchungen der Flexibilität der DNA-Liganden-Bindung oft auf die Analyse von Normalmoden [75] oder harmonischen Moden [79] beschränkt. Bisher ermöglichten theoretische Methoden bei der Untersuchung von DNA-Liganden-Komplexen nur sehr eingeschränkte Aussagen über die Flexibilität und Dynamik der Bindung [185].

Die in diesem Kapitel dargestellten Resultate liefern die ersten detaillierten Daten über die Flexibilität der MB-DNA-Bindung und auch über Konformationsübergänge zwischen alternativen Bindungsstellen bei einer Bindung des MB in der kleinen Furche und alternativen Interkalationsmodi bei einer Bindung des MB durch Interkalation. Die Anwendung des in Kap. 4 vorgestellten MC-Algorithmus ermöglicht die Equilibrierung der MC-Simulationen der MB-DNA-Komplexe und ein effektives Konformations-sampling der Bindung des MB mit den Target-Dekameren. Sowohl über die Beweglichkeit des MB in den jeweiligen Bindungsmodi als auch über die Konformationsänderungen der Target-Dekamere infolge der Bindung konnten in den MC-Simulationen detaillierte Resultate erzielt werden.

Die Interkalationen des MB erweisen sich als stabile Bindungsmodi. Bei der symmetrischen Interkalation bleibt das MB im Zentrum der jeweiligen Interkalationstasche mit seiner langen Achse parallel zu den flankierenden Basenpaaren orientiert. Nur bei der symmetrischen Interkalation in den 5'-GpC-3'-Basenschritt dreht sich das MB in der Interkalationstasche mit seiner langen Achse um ca. 60° um die helikale Achse, kehrt aber wieder in die Konformation der symmetrischen Interkalation zurück. Bei der gauche Interkalation bewegt sich das MB in der Interkalationstasche etwas stärker. Die höhere Flexibilität AT alternierender Dekamere im Vergleich zu GC alternierenden Dekameren wirkt sich bei den symmetrischen und gauche Interkalationen auf die Bewegung des MB in der Bindungstasche aus, so daß die Lage und Orientierung des MB bei den interkalativen Bindungen mit AT alternierenden Dekameren variabler ist. Darin könnte ein Grund für die experimentell nachgewiesene, stabilere interkalative Bindung mit GC alternierenden Dekameren liegen [100, 173]. Da Übergänge zwischen den symmetrischen und den gauche Interkalationen nicht beobachtet werden, wird allerdings von einer relativ hohen Stabilität beider Interkalationsmodi ausgegangen. Zur Bestätigung dieser Beobachtung sollten MC-Simulationen mit noch deutlich mehr Makrozyklen erwogen werden.

Die Interkalation des MB führt zu einer starken Deformation der Target-Dekamere. In Kap. 6 war die energetische Benachteiligung der gauche gegenüber der symmetrischen Interkalation auf eine stärkere Deformation der MB-DNA-Komplexe mit gauche Interkalation zurückgeführt worden. Die MC-Simulationen bestätigen die stärkeren Deformationen der Komplexe mit gauche Interkalation des MB durch die größeren mittleren Rise-Werte an der Interkalationsstelle. Der Betrag des Unwindings an der Interkalationsstelle erweist sich als sequenzspezifisch, indem die Differenzen der mittleren Twist-Werte von YpR- und RpY-Basenschritten freier Dekamere auch für Bindungstaschen generierende Basenschritte tendenziell erhalten bleiben. Die die Interkalationstaschen flankierenden Basenschritte wirken dem Unwinding an der Bindungsstelle durch eine Erhöhung ihrer Twist-Werte entgegen, wobei auch dabei die Differenzen zwischen YpR- und RpY-Basenschritten freier Dekamere zumindest tendenziell erhalten bleiben. Es kann also von einer Konservierung sequenzspezifischer Twist-Differenzen gesprochen werden.

Die Bildung von Interkalationstaschen wird durch  $\alpha/\gamma$ -Flips stabilisiert, wobei in den MB-DNA-Komplexen mit gauche Interkalationen nur ein  $\alpha/\gamma$ -Flip in einem der beiden Nukleinsäurestränge stabilisiert wird. Die Sequenzspezifität der Interkalationen in die YpR- bzw. RpY-Basenschritte wirkt sich auf die Zuckerkonformationen der die Bindungstasche flankierenden Nukleotide aus. Dabei befinden sich bei den symmetrischen Interkalationen in den TpA- oder CpG-Basenschritt die Pyrimidinbasen enthaltenden Nukleotide in einer Mehrzahl der Makrozyklen in der C3'-endo-Konformation, während dies bei den symmetrischen Interkalationen in den ApT- oder GpC-Basenschritt nur für die Purinbasen enthaltenden Nukleotide zutrifft. Außerdem spiegelt sich die weitgehende Symmetrie der symmetrischen Interkalationen auch in den Phasen-Verteilungen der Zuckerfaltung der flankierenden Nukleotide wider, wohingegen diese Phasen-Verteilungen bei den gauche Interkalationen von der Asymmetrie der Bindungen geprägt sind.

Bei der Bindung des MB in der kleinen Furche des GC alternierenden Dekamers verbleibt das MB in der Mehrzahl der Makrozyklen an einer Bindungsstelle. Dagegen wechselt das MB bei der Bindung in der kleinen Furche des AT alternierenden Dekamers

wiederholt die Bindungsstelle und bewegt sich während der MC-Simulation nahezu die gesamte kleine Furche entlang. Dabei weisen Maxima in der Besetzungswahrscheinlichkeit des Rise auf diskrete Bindungsstellen hin, in denen das Schwefel- und das zentrale Stickstoffatom des MB in den Ebenen der Basenpaare liegen. Auch bei der Bindung in der kleinen Furche des GC alternierenden Dekamers befindet sich das MB in einer solchen Bindung, die aber im Vergleich zum AT alternierenden Dekamer zusätzlich durch eine Wasserstoffbrücke zwischen dem zentralen Stickstoffatom und einem Proton der Aminogruppe des Guanins stabilisiert wird. Diese nur in der kleinen Furche des GC alternierenden Dekamers mögliche zusätzliche Stabilisierung kann als Grund für die relativ stabile Bindung des MB im Gegensatz zum beobachteten häufigen Wechsel der Bindungsstelle bei der Bindung des MB in der kleinen Furche des AT alternierenden Dekamers interpretiert werden.

In der großen Furche beider DNA-Dekamere zeigt das MB die höchste Beweglichkeit und auch nur relativ unspezifische Bindungsstellen im Vergleich zu den Interkalationen und der Bindung in den kleinen Furchen. Verbunden mit der Bindung in der großen Furche ist eine teilweise signifikante Krümmung der Target-Dekamere, die für das GC alternierende Dekamer im Mittel stärker ausgeprägt ist. Die Krümmungen der Target-Dekamere äußern sich in kleineren mittleren Rise-Werten und größeren mittleren Twists der YpR-Basenschritte gegenüber den Konformationen der freien Dekamere. Die MB-DNA-Komplexe müssen jedoch mit der Einschränkung diskutiert werden, daß für AT und GC alternierende Basensequenzen keine experimentellen Daten existieren, die die Existenz dieser Bindung bestätigten [100, 173].

Insgesamt zeigen die Besetzungswahrscheinlichkeiten der helikalen Parameter des MB für die MB-DNA-Komplexe in den drei unterschiedlichen Bindungsmodi ausgeprägte Maxima in ihren Verteilungen, die mit diskreten Bindungsstellen und Orientierungen des MB korrespondieren. Ebenfalls erweisen sich die durch die Bindung des MB verursachten Deformationen der Target-Dekamere als sequenzspezifisch. Die MC-Simulationen liefern detaillierte Daten über die Beweglichkeit des MB in den unterschiedlichen Bindungszuständen, über Konformationsübergänge des MB von einer zur anderen Bindungsstelle und über die sequenzspezifische Flexibilität und Deformation der Target-DNA. Es kann erwartet werden, daß diese Resultate die Interpretationen experimenteller Daten über die Dynamik der MB-DNA-Bindung erleichtern und konkretisieren helfen.