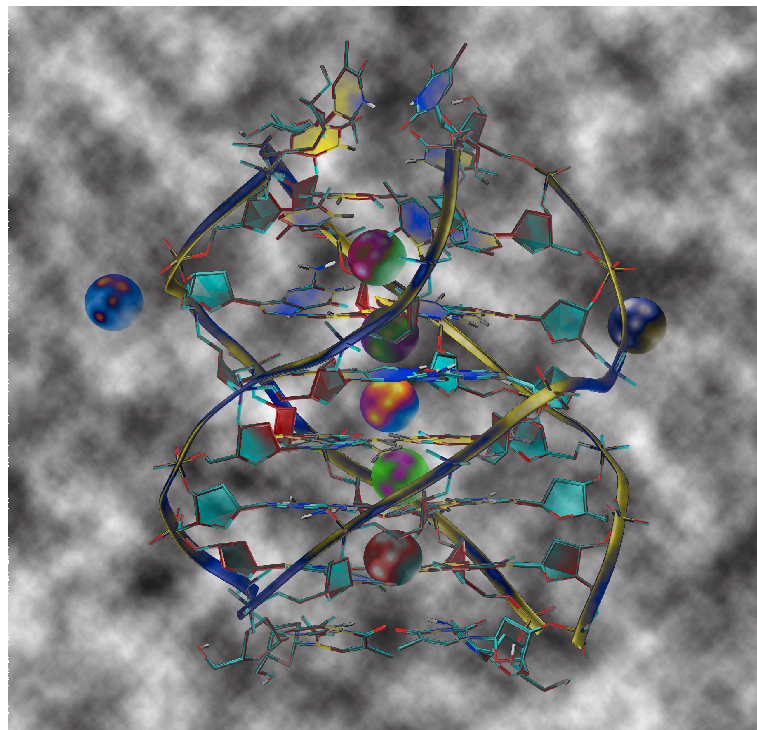

Telomere Quadruplexe in wässriger Lösung

Molekulardynamische Simulationen
zum Einfluss von Kationen
auf Struktur und Dynamik



Peter Kronshage, Bielefeld 2004

Telomere Quadruplexe in wässriger Lösung

Molekulardynamische Simulationen
zum Einfluss von Kationen
auf Struktur und Dynamik

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -
an der Fakultät für Chemie
der Universität Bielefeld

vorgelegt von
Peter Kronshage

Bielefeld 2004

Danksagung

Herrn PD. Dr. Wolfgang Eimer danke ich für die Überlassung des Themas und seine Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Für die freundliche Übernahme des Korreferats danke ich Herrn Prof. Dr. Wilhelm Knoche.

Frau Dr. Jutta Töhl schulde ich Dank für die Einarbeitung in das GROMOS-Programmpaket sowie für zahlreiche nützliche Hinweise.

Herrn Dr. Norbert Reneberg und Herrn Dr. Michael Buchner danke ich für ihre Hilfsbereitschaft bei der Bewältigung von Computerproblemen.

Außerdem möchte ich mich bei den Mitgliedern des Arbeitskreises für die freundliche und ungezwungene Arbeitsatmosphäre bedanken.

Für die kritische Durchsicht sowie die Korrektur der vorliegenden Arbeit im Rahmen der neuen deutschen Rechtschreibung danke ich Frau Dipl. Päd. Angela Kronshage, Herrn Dr. Mischa Bolton und Herrn Dr. Karl Kratz.

Mein besonderer Dank gilt aber meiner Frau Claudia, die mir ständig mit Verständnis und Hilfe zur Seite stand und mir die Kraft zur Fertigstellung meiner Dissertation gab.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	DNA und RNA	7
2.1	Das Guanin-Quartett	9
2.2	Polymorphismus	11
2.3	Die biologische Relevanz der Quadruplexe	13
2.3.1	Telomere	14
2.3.2	Die Rolle der Quadruplexe in der Krebstherapie	15
3	Grundlagen der Molekulardynamik (MD)	17
3.1	Das Kraftfeld als Modellfunktion	20
3.2	Die Durchsuchung des Phasenraums	23
3.3	Rahmenbedingungen	25
3.4	Die Algorithmenauswahl	26
3.5	Besonderheiten der MD-Simulation	29
3.5.1	Isotherme bzw. isobare MD-Verfahren	29
3.5.2	Einschränkung der Freiheitsgrade	30
3.5.3	Die Behandlung weitreichender Wechselwirkungen	33
3.5.4	Optimierung der Geometrie	35
3.5.5	Trajektorienanalyse	36
4	Simulationsdurchführung	39
4.1	Das Ablaufschema der MD-Simulation	40
4.2	Startstruktur und Topologie	41
4.2.1	Quadruplexe aus DNA- bzw. RNA-Strängen	41
4.2.2	Konvertierung des Formats und Topologieerzeugung	42
4.2.3	Spezielle Erweiterungen des Kraftfeldes	43
4.3	Platzierung der DNA/Ionen in der Wasserbox	44
4.4	Equilibrierungsphase	45
4.5	Übersicht der simulierten Systeme	46

5	Quadruplexe mit Erdalkaliionen	53
5.1	Stabilität der Quadruplex-DNA	54
5.1.1	rms-Werte	54
5.2	Visualisierung der Folgestrukturen	57
5.3	Ionenwanderung entlang der Kanalachse	60
5.4	Charakteristische geometrische Größen	65
5.4.1	Größe des Quadruplexkäfigs $\leftrightarrow$ Ebenenabstände	66
5.4.2	Größe des Quadruplexkäfigs $\leftrightarrow$ Breite der Quartettebenen	69
5.4.3	Verzerrung des Quadruplexkäfigs $\leftrightarrow$ Diederwinkel	73
5.4.4	Die „äußere“ Struktur	75
5.5	Wasserstoffbrückenbindungen	79
5.6	Energetische Betrachtungen	86
6	Der Einfluss äußerer Bedingungen	91
6.1	Die Startbedingungen	91
6.2	Der Temperatureinfluss	105
7	Gemischte Systeme	121
7.1	Stabilitäten und Folgestrukturen	121
7.2	Ionenwanderung	124
7.2.1	Ionenwanderungsprozesse entlang der helikalen Achse	125
7.2.2	Ionenwanderungsprozesse im „bulk“	127
7.3	Geometrische Auswirkungen	129
7.4	Wasserstoffbrückenbindungen	135
7.5	Energetische Betrachtungen	140
8	Die Rolle der umgebenden Hydrathülle	145
8.1	Solvatstrukturen	146
8.2	Hydratationsradien	155
8.3	Residenzzeiten	165
9	Quadruplex DNA - erweiterte Sequenzen	173
9.1	Stabilitäten, Ionenfluktuationen und Strukturen	174
9.1.1	rms-Werte	175
9.1.2	Ionenfluktuation entlang des Quadruplexkanals	177
9.1.3	Strukturbetrachtungen zu Beginn und Ende der Simulation	181
9.2	Die Geometrie der erweiterten Systeme	184
9.3	Wasserstoffbrückenbindungen	191
9.4	Die Hydratisierung der Tetraplexe	194

9.4.1	Die strukturelle Klassifizierung der Wassermoleküle	194
9.4.2	Residenzzeiten von Solvensmolekülen an exponierten System- positionen	203
9.5	Translationsdiffusion	206
10	Quadruplex RNA	211
10.1	Stabilität und Ionenwanderungsverhalten	212
10.2	Geometrische Größen	215
10.3	Die Hydrathülle	220
11	Zusammenfassung und Ausblick	225
A	Ergänzende Informationen	233
A.1	Allgemeine Angaben	233
A.1.1	Ionenradien	233
A.1.2	Systemimmanente Größen	234
A.2	Erdalkaliionen	237
A.2.1	Kationenfluktuation	237
A.2.2	Ebenenabstände	237
A.2.3	O6-O6-Abstände	239
A.2.4	Diederwinkel	240
A.2.5	Wasserstoffbrückenbindungen	240
A.2.6	Energiebetrachtungen	243
A.3	Startbedingungen	245
A.3.1	Kationenfluktuation	245
A.3.2	Geometrische Größen	246
A.3.3	Energien	247
A.4	Temperatureinfluss	248
A.4.1	Kationenfluktuation	248
A.4.2	Ebenenabstände	249
A.4.3	Diederwinkel	251
A.4.4	Wasserstoffbrückenmuster	251
A.4.5	Energetische Betrachtungen	254
A.5	Quadruplexe mit gemischten Ionentypen	255
A.5.1	Folgestrukturen	255
A.5.2	Ionenwanderungsprozesse in gemischten Systemen	256
A.5.3	O6-O6-Abstände	257
A.5.4	Diederwinkel	257
A.5.5	Wasserstoffbrückenmuster	257

A.6	Hydrathülle	261
A.7	Quadruplex-DNA mit erweiterten Basensequenzen	263
A.7.1	Kationenfluktuation und Strukturen	263
A.7.2	Trägheitsradius	265
A.7.3	Wasserstoffbrückenbindungen	265
A.7.4	Projektionsdichte	267
A.7.5	Hydratationsradien	268
A.8	Quadruplex RNA	270
A.8.1	Van-der-Waals-Oberfläche	270
A.8.2	Projektionsdichte	270
Literaturverzeichnis		271

*Nach unseren bisherigen Erfahrungen sind wir zum Vertrauen
berechtigt, dass die Natur die Realisierung des
mathematisch denkbar Einfachsten ist.*

Albert Einstein, 1879-1955

Kapitel 1

Einleitung

Die Entdeckung der doppelhelikalen Struktur der DNA im Jahre 1953 durch WATSON und CRICK stellte einen entscheidenden Meilenstein hinsichtlich der Entwicklung der modernen Molekularbiologie dar. Aufbauend auf dieser faszinierenden Grundstruktur entwickelte sich ein Forschungsgebiet, das dem Geheimnis der Grundlagen des Lebens in all seinen Facetten auf der Spur ist.

Dabei zeichnet sich die DNA nicht nur durch ihre beeindruckende Fähigkeit zur statischen Speicherung der genetischen Informationen aus [73]. Sie übernimmt vielmehr zusätzliche zentrale Funktionen innerhalb vielfältiger biologischer Abläufe, die eine hohe strukturelle Flexibilität voraussetzen. Diese, lange Zeit weitestgehend unverstandene Fähigkeit der DNA, hat besonders in der jüngeren Vergangenheit zu ausgeprägten Forschungsaktivitäten geführt, die sich insbesondere mit der Ausbildung spezieller Sekundärstrukturen im Hinblick auf ihre Verknüpfung zu biologisch relevanten Vorgängen innerhalb der Zelle beschäftigen. So werden der DNA zahlreiche zentrale Aufgaben im Bereich komplexer Regulations- und Steuermechanismen zugeordnet [14][126]. Gleichzeitig spielt sie eine Rolle als Schlüsselmolekül vielfältiger Erkennungsvorgänge auf zellulärer Ebene, für die die Ausbildung spezieller dreidimensionaler Strukturen eine unabdingbare Voraussetzung darstellt [14]. Diese mannigfaltigen konformativen Anforderungen erfüllt die DNA mit hoher Sensitivität, wobei neben intramolekularen auch intermolekulare Wechselwirkungen mit RNA-Fragmenten, Proteinstrukturen, umgebenden Wassermolekülen sowie Kationen eine wichtige Rolle spielen.

Insbesondere das Verhalten von Guanosin-5'-monophosphat (5'-GMP), in Gegenwart von Alkaliionen Gele zu bilden, gab in den sechziger Jahren des letzten Jahrhunderts Anlass zu der Vermutung, dass diese Mononukleotide zur Ausformung selbstorganisierender Strukturen in der Lage sind.

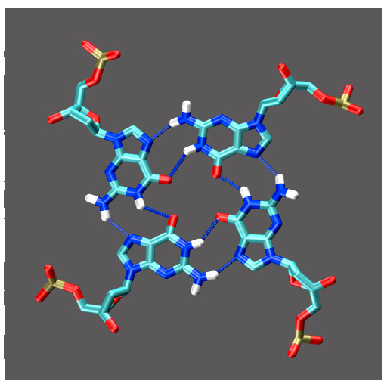


Abb. 1.1: Guanin-Quartett

Eingehende Studien zeigten, dass es dabei zur Ausbildung einer planaren Anordnung von vier Guaninbasen kommt, die über Wasserstoffbrücken miteinander verknüpft sind (siehe Abb. 1.1) [47] [93]. Diese als Guanin-Quartett bezeichnete Konformation¹ bildet in ihrem Zentrum einen Hohlraum durch die nach innen gerichteten Carbonylsauerstoffatome aus, der zur Komplexierung von Kationen geeignet ist. Die enorme Tragweite der Entdeckung dieses Strukturmusters in Bezug auf seine biologische Relevanz konnte zum damaligen

Zeitpunkt jedoch noch nicht abgeschätzt werden.

Mit der zunehmenden Entwicklung moderner Methoden zur Synthese von Oligonukleotid-Sequenzen wurde eine weitergehende Untersuchung des Verhaltens guaninreicher DNA-Stränge (G-DNA) ermöglicht, deren Schwerpunkte sich auf den Bereich der Konformationsanalyse konzentrierten.

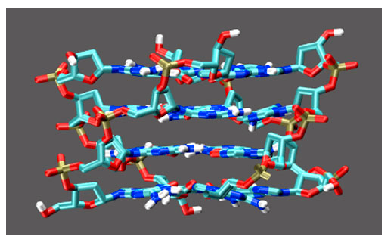


Abb. 1.2: G-Quadruplex

Dabei zeigte sich, dass G-DNA ebenfalls zur Bildung entsprechender Quartettkonformationen befähigt ist, die durch Stapelung hochgeordnete Strukturen entstehen lassen. Diese *Quadruplexe*² (siehe Abb. 1.2) werden durch interkalierte ein- bzw. zweiwertige Kationen stabilisiert [100][113][25].³ Zahlreiche NMR- und Röntgenstrukturuntersuchungen offenbarten, dass sich die

einzelnen Stränge in inter- bzw. intramolekularer Form mit paralleler oder antiparalleler Orientierung anordnen können, was zu einer ausgeprägten Polymorphie führt (siehe Kapitel 2.2) [3][2][99][118].

Die Entdeckung, dass in wichtigen Genombereichen guaninreiche Sequenzen vorliegen, die zur Bildung von G-Quadruplexen befähigt sein könnten [127], gab

¹In diesem Fall handelt es sich um eine Anordnung vom sogenannten *Hoogsteen-Typ*; andere Konformationen sind ebenfalls vorstellbar (siehe dazu Abb. 2.3).

²In diesem Zusammenhang spricht man auch von Tetraplexen.

³Wechselwirkungen zwischen Carbonylsauerstoffatomen und Kationen in einer zum G-Quartett vergleichbaren Form spielen eine zentrale Rolle bei der Wanderung von Ionen durch Zellmembranen, die durch Proteine gebildet werden. Die Verleihung des Nobel Preises im Jahre 2003 an Roderick MacKinnon [76], für seine wegweisenden Arbeiten hinsichtlich des Verständnisses des Eintritts von K^+ -Ionen in die Zelle, unterstreicht dabei die Relevanz der Untersuchung „strukturell verwandter“ DNA-Kation-Komplexe (Quadruplexe) im Hinblick auf konformative Besonderheiten und daraus resultierende Funktionen.

den Anstoß dazu, möglichen biologischen Funktionen der Tetraplexe nachzugehen. So entwickelte sich ein Forschungsgebiet, das vielfältige, substanzielle Rollen der Quadruplexe innerhalb von Zellvorgängen postulierte. Insbesondere vermutet man, dass sich an den Enden guaninreicher, linearer eukaryotischer Chromosomen, die als Telomere bezeichnet werden, diese ungewöhnliche quartäre Struktur (vergleiche dazu Kapitel 2.3.1) ausbildet, der hinsichtlich der Stabilisierung und Replikation eine maßgebliche Bedeutung zukommt [86]. Die Funktion der Quadruplexe als Inhibitoren der Telomerase [124][41], der HIV-Integrase [59] sowie als Trägermaterial für kleinere, biologisch aktive Moleküle [58][91] bildet den Gegenstand aktueller Forschung. Des weiteren könnten Quadruplexe in Blutgerinnungsprozessen eine Rolle spielen, da sie sich an das Schutzprotein Thrombin anlagern und damit die Blutgerinnungskaskade unterbrechen [18][111].

Die ausgeprägte Tendenz zur Selbstorganisation, die besondere Kinetik und steuerbare Temperaturabhängigkeit, verbunden mit der reproduzierbaren Beeinflussung durch Alkali- und Erdalkalitionen hinsichtlich Bildung und Struktur, lassen Tetraplexe zusätzlich als „intelligente“ Nanocluster für mögliche technische Anwendungen hochgradig interessant erscheinen [15].

Aufgrund der potenziellen Bedeutung, die **TELOMERE QUADRUPLEXE IN WÄSSRIGER LÖSUNG** bzgl. vielfältiger biologischer Prozesse sowie technischer Anwendungen besitzen, ist daher ein grundlegendes Verständnis für den **EINFLUSS VON KATIONEN AUF STRUKTUR UND DYNAMIK** unerlässlich.

Dazu liefern experimentelle Methoden, wie z.B. die Röntgenstrukturanalyse, NMR- sowie IR-Untersuchungen wertvolle Informationen hinsichtlich der sich ausbildenden Strukturen, die um dynamische Aspekte des Tetraplexverhaltens beispielsweise durch Streulichtuntersuchungen erweitert wurden [15].

Darüber hinaus bieten **MOLEKULARDYNAMISCHE SIMULATIONEN (MD)** die einzigartige Möglichkeit, die auf diesen Daten beruhenden Erkenntnisse zu ergänzen, indem sie einen Einblick in Vorgänge auf atomarer Ebene erlauben.

Biomoleküle können in ihrer physiologischen Umgebung mit einer räumlichen und zeitlichen Auflösung „beobachtet“ werden, die experimentellen Techniken kaum zugänglich ist. Zusätzlich lassen sich zahlreiche Simulationsparameter flexibel variieren und einer Wirkungsanalyse in Bezug auf interessante physikalische Größen (Trägheitsmomente, Diffusionskoeffizienten, ...) unterziehen, wobei im Gegensatz zum Experiment die Rahmenbedingungen (Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Atomen) genau bekannt sind.

Einen weiteren Vorteil stellt die Möglichkeit dar, gezielt Teilsysteme zu analysieren. So können Korrelationen zwischen strukturellen Systemeigenschaften und

dynamischen Vorgängen aufgezeigt werden. Diese sind für eine korrekte Beurteilung der Funktionalität biologischer Makromoleküle unumgänglich, da sie häufig ausgeprägten konformativen Änderungen im Zuge komplexer Wechselwirkungen mit ihrer Umgebung unterliegen.

Trotz der vielfältigen faszinierenden Möglichkeiten, die MD-Simulationen bieten, sollte man sich jedoch der zugrunde liegenden Modellannahmen (Kraftfelder, Wechselwirkungspotenziale) bewusst sein und den direkten Vergleich mit dem Experiment suchen, um zu einer realistischen Einschätzung der Simulationsergebnisse zu gelangen.

Bislang existieren in der Literatur erst wenige MD-Studien an G-DNA-Systemen, die sich mit der Wechselwirkung zwischen Kationen und DNA beschäftigen [108][109][35]. Darin wurden erste Erkenntnisse hinsichtlich Art und Verteilung der interkalierten Ionensorte sowie daraus resultierender struktureller Besonderheiten der untersuchten Tetraplexe beschrieben.

Besonders im Hinblick auf Mechanismen, Stabilitätsanalysen, interionische Wechselwirkungen (Unterschiede zwischen gleichartigen und verschiedenen Kationensorten innerhalb der Simulationsbox), detaillierte geometrische Analysen und ihre Korrelation zu dynamischen Vorgängen im Bereich des Quadruplexes sowie die unverzichtbare Betrachtung der Wechselwirkungen mit der umgebenden Hydrathülle blieben viele Fragen ungeklärt.

Eine vertiefende Untersuchung gerade dieser Aspekte bildet den Rahmen für die vorliegende Arbeit und ermöglicht somit, das grundlegende Verständnis des Verhaltens dieser speziellen DNA-Sekundärstruktur in der lebenden Zelle zu erweitern.⁴ Abb. 1.3 gibt einen Überblick über die simulierten Tetraplexsysteme sowie die grundlegenden Fragestellungen, die im weiteren Verlauf zu beantworten sind.

Zunächst werden G-DNA-Modellsysteme, die sich durch die Reduzierung auf die wesentliche Struktureinheit $d[GGGG]_4$ auszeichnen, hinsichtlich ihres Verhaltens gegenüber unterschiedlichen Kationensorten (Alkali-, Erdalkalitionen sowie gemischte Systeme mit verschiedenen Ionensorten innerhalb der Simulationsbox) studiert

⁴Im Rahmen von Vorarbeiten [68][113] konnte die Machbarkeit der Simulationen von G-Quadruplexen belegt werden, deren Schwerpunkt auf der Untersuchung von $d[GGGG]_4$ -Modellsystemen mit Alkaliionen lag. Dabei zeigte sich, dass die MD-Simulation wichtige Beiträge zur Aufklärung molekularer Mechanismen auf atomarer Ebene leisten kann. Neben Alkaliionen (K^+ (150 mM), Na^+ (5 mM)) findet man ebenso bestimmte Erdalkalikationen in „größerer“ Konzentration in den Kernen lebender Zellen (Mg^{2+} und Ca^{2+} (0,2 μ M)). Die anderen Alkali- und Erdalkalikationen liegen in normalen physiologischen Konzentrationen (subnanomolar) vor, beeinflussen jedoch die Bildung von Quadruplexen in individueller Art und Weise [104].

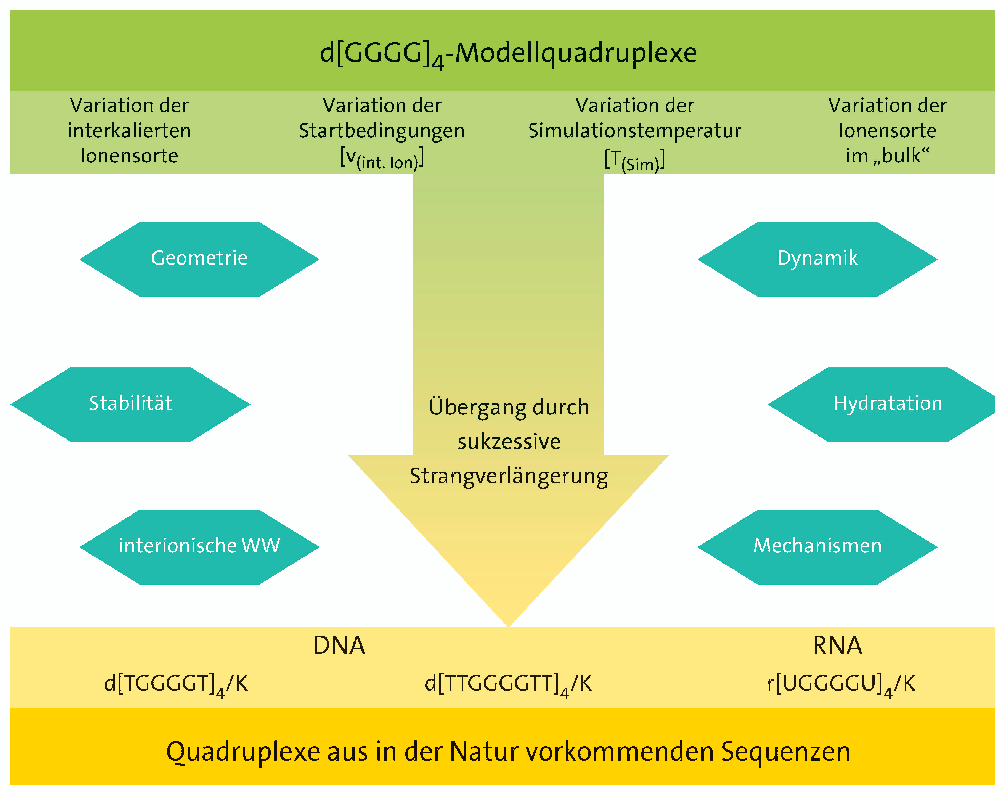


Abb. 1.3: Untersuchte Systeme und grundlegende Fragestellungen im Überblick

sowie die Auswirkungen der Variation von Startbedingungen und Simulationstemperaturen untersucht. Darauf aufbauend erfolgt der Schritt hin zu Simulationen von DNA-Tetraplexen, die auf „realen“, in der Natur vorkommenden Sequenzen beruhen. Den Abschluss bildet die Simulation eines RNA-Quadruplexes.

Im Einzelnen ergeben sich daraus folgende Untersuchungsaspekte:

- Anhand der Simulation von **d[GGGG]₄-Modellsystemen mit unterschiedlichen Erdalkalitionen** (Mn^{2+}) wird der individuelle Einfluss dieser Kationen auf die Stabilität des Quadruplexes sowie hinsichtlich möglicher Unterschiede in der Ionendynamik untersucht. Dabei werden charakteristische geometrische Merkmale der einzelnen Systeme miteinander verglichen und mit Hilfe von Energiebetrachtungen quantitative Aspekte der Wechselwirkung zwischen den einzelnen Systemkomponenten näher beleuchtet.
- Der Einfluss **veränderter Startbedingungen** auf die Entwicklung der jeweiligen Trajektorie wird durch die Simulation verschiedener $d[GGGG]_4/K$ -Systeme

untersucht, die sich in den anfänglichen Geschwindigkeiten der interkalierten Kationen unterscheiden.

- Der **Schmelzvorgang** von Quadruplexstrukturen wird an $d[GGGG]_4/Na$ -Systemen studiert, die sich durch differente Temperaturen in der Simulationsbox unterscheiden.
- $d[GGGG]_4/K$ -Systeme, die sich hinsichtlich der Erdalkaliionensorte im „bulk“ unterscheiden (**gemischte Systeme**), bilden die Untersuchungsgrundlage für die Auswirkungen eines nicht einheitlichen Ionentyps in der Simulationsbox auf die Stabilität, Struktur und Dynamik des zugrunde liegenden Quadruplexes.
- Die **Hydratation von Quadruplexen** wird an ausgesuchten Tetraplexsystemen eingehend untersucht. Hierbei sind die Ausdehnungen der Hydrathüllen um spezielle Atompositionen herum ebenso Forschungsgegenstand wie die Bestimmung entsprechender Residenzzeiten der Wassermoleküle in diesen Hydratationsvolumina.
- Der **Übergang von $d[GGGG]_4$ -Modellsystemen zu natürlich vorkommenden Systemen** wird durch die schrittweise Verlängerung der einzelnen Stränge durch Thyminbasen erreicht. Dabei werden zum einen die Auswirkungen differenter Stranglängen und inhomogener Basensorten ($d[TGGGGT]_4/K \leftrightarrow d[TTGGGGTT]_4/K$) auf die Konformation und Stabilität des Quadruplexes untersucht. Zum anderen erlaubt der Vergleich zwischen diesen und Systemen mit „restraints“ zwischen benachbarten Basen einer Ebene, den Einfluss eines bestimmten Wasserstoffbrückentyps auf das Ionenbesetzungsmuster sowie die Ionenfluktuationen abzuschätzen.
- Durch Simulation eines $r[UGGGGU]_4/K$ -Systems werden mögliche Unterschiede im Verhalten zwischen DNA- und **RNA-Quadruplexen** analysiert. Insbesondere soll an dieser Stelle der Einfluss der veränderten endständigen Basensorte sowie der zusätzlichen Hydroxygruppen sowohl hinsichtlich konformativer Veränderungen der Tetraplexstruktur als auch seiner Hydratisierung untersucht werden.

Aufgrund der ungewöhnlichen Konformation von Quadruplexen kann lediglich in begrenztem Umfang auf bestehende Software zurückgegriffen werden. Dementsprechend müssen für die Auswertung der Trajektorien spezielle Routinen entwickelt und programmiert werden, um die individuellen Fragestellungen eingehend untersuchen zu können.

Kapitel 2

DNA und RNA

Den Nukleinsäuren kommt bei der Weitergabe der Erbinformation sowie der Proteinsynthese, für die lange Ketten von Desoxyribonukleinsäure (DNA) innerhalb der Gene den Bauplan bilden, eine entscheidende biologische Bedeutung zu [74]. Die DNA ist ein Polymer aus Desoxyribonukleotiden, die ihrerseits aus einer stickstoffhaltigen Base sowie einem Zucker-Phosphat-Rückgrat („backbone“) bestehen (siehe Abb. 2.1). Das C-1-Atom der Desoxyribose ist dabei mit dem N-1-Atom eines Pyrimidins bzw. dem N-9-Atom eines Purins verbunden. Die Desoxyriboseeinheiten werden über Phosphatgruppen miteinander verknüpft, indem die 3'-Hydroxylgruppe des Zuckers mit der 5'-Hydroxylgruppe der Nachbarentose über eine Phosphodiesterbrücke verbunden ist. Daraus resultiert eine Polarität der DNA, in Form der Ausbildung eines 3'- und eines 5'-Endes.

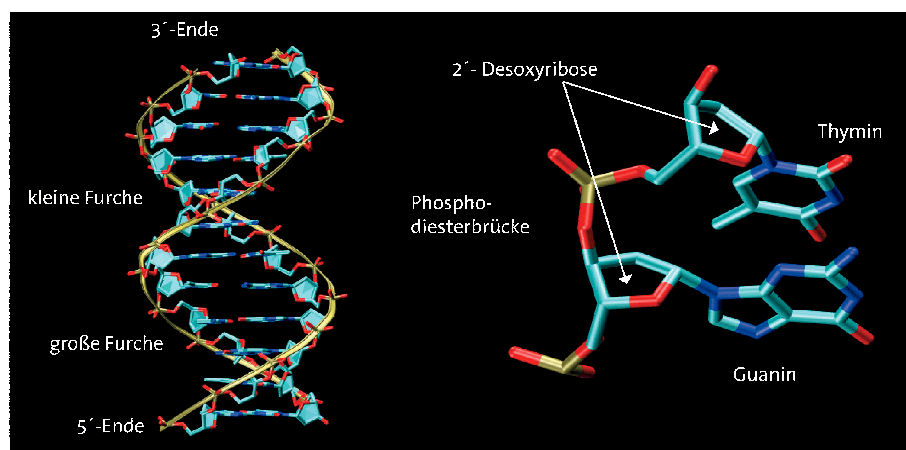


Abb. 2.1: Das Grundgerüst der DNA; links: B-DNA Doppelhelix (12 Basenpaare); rechts: Rückgrat („backbone“) der DNA mit den Basen Thymin und Guanin

In zellulärer Form bilden jeweils zwei lange DNA-Stränge eine helikale, um eine gemeinsame Achse verwundene Struktur aus. Der „backbone“-Bereich ist dabei nach außen gerichtet, wohingegen die Purin- bzw. Pyrimidinbasen nach innen angeordnet sind. Der Zusammenhalt zwischen beiden Ketten wird durch die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen den beteiligten Basen gewährleistet. Dabei erfolgt die Wechselwirkung komplementär, d.h. Adenin (A) paart immer mit Thymin (T), Guanin (G) immer mit Cytosin (C) (siehe Abb. 2.2). Durch die spezifische Abfolge (Sequenz) der Basen wird die genetische Information verschlüsselt.

Während der DNA-Replikation kommt es zu einer Auflösung der Spiralstruktur, die beiden Stränge trennen sich. Jeder der beiden Elternstränge fungiert dabei als Matrize für die Bildung einer neuen komplementären Desoxyribonukleinsäurekette. Dieser äußerst komplexe Vorgang wird durch bestimmte Enzyme (DNA-Polymerasen) unterstützt, die hochgradig selektiv die Anlagerung eines neuen Nukleotids steuern.

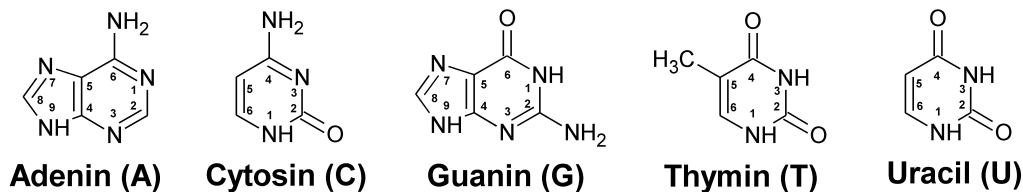


Abb. 2.2: Pyrimidinbasen (Cytosin, Thymin, Uracil) und Purinbasen (Adenin, Guanin)

Im Unterschied zur DNA tritt in der Ribonukleinsäure (RNA) die Ribose als Anknüpfungspunkt für die Phosphodiesterbrücken auf [111]. Neben den bekannten Bausteinen A, C, G als bevorzugte Basen findet ein Austausch der Pyrimidinbase Thymin (T) gegen Uracil (U) statt, die sich von der Erstgenannten lediglich durch die fehlende Methylgruppe unterscheidet.

Die Replikation der RNA wird durch RNA-Telomerase gesteuert, wobei wiederum ein DNA-Strang als Matrize fungiert (Transkription). Meist findet man RNA als Einzelstrang, der die genetische Information der DNA hin zu Proteinen überträgt (Translation).¹ Die Proteinsynthese findet in den Ribosomen statt, die in großer Zahl innerhalb einer Zelle vorhanden sind. Hierin wird die Information aus der DNA auf so genannte m-RNA („messenger“) übertragen. Die Codierung der Aminosäure erfolgt durch jeweils drei Basen (Codons), deren Information an eine

¹Teilweise beobachtet man die Ausbildung von Doppelhelixstrukturen, die durch die Ausbildung einer Haarnadelschleife („hairpin“) entstehen, wobei die Basenpaarung jedoch häufig unvollständig ist.

t-RNA („transfer“) weitergegeben wird, die drei komplementäre Basen (Anticodons) enthält. Am 3'-Ende dieser t-RNA werden nun entsprechend des genetischen Codes Aminosäuresequenzen gebildet.

Die hier dargestellten vereinfachten Vorgänge im Bereich der Replikation der DNA sowie der Proteinsynthese stellen sich, ebenso wie die Morphologie der zugrunde liegenden Strukturen, bei genauer Betrachtung weitaus komplexer dar. Insbesondere biologische Funktionalitäten der DNA, die weit über die reine Speicherung der Erbinformation hinausgehen, sind eng mit der Ausbildung spezieller dreidimensionaler Strukturen verknüpft, die erhebliche Unterschiede zu den bekannten doppelhelikalen Strangkonformationen aufweisen [104]. So kommen der DNA maßgebliche Aufgaben in zahlreichen Regulations- Erkennungs- und Steuervorgängen innerhalb der Zelle zu [14][126]. Dabei werden so genannte Quadruplexe, die Sekundärstrukturen der DNA darstellen, als zentrale Struktureinheiten diskutiert. In den folgenden Abschnitten werden daher die grundlegenden Merkmale dieser außergewöhnlichen DNA-Konformation sowie ihre biologische Relevanz eingehender vorgestellt.

2.1 Das Guanin-Quartett

Bereits seit dem Anfang des letzten Jahrhunderts ist bekannt, dass Guanin und seine Derivate zur Ausbildung viskoser Gele in wässriger Umgebung neigen. Eine Erklärung für dies Verhalten konnte jedoch erst durch Röntgenstrukturuntersuchungen im Jahre 1962 gefunden werden [47]. Dabei zeigte sich, dass die Guaninbasen eines Guanosin-5'-Monophosphat-Gels (GMP) eine tetramere Anordnung einnehmen, die als Guanin-Quartett bezeichnet wird und die Ursache dieser Gelbildung darstellt. Abb. 2.3 verdeutlicht die quadratisch planare Anordnung von vier Guaninbasen mit einem eingelagerten zentralen Kation [126]. Dabei spielen so genannte Hoogsteen-Wasserstoffbrücken, die sich zwischen den Purinbasen ausbilden, eine wesentliche Rolle hinsichtlich der Stabilität dieser Anordnung.

Im Zentrum des G-Quartetts befindet sich ein Hohlraum, der durch die nach innen gerichteten vier Carbonylsauerstoffatome begrenzt wird. Aufgrund der negativen Polarisierung dieser Teilchen eignet sich die „Tasche“ potenziell zur Komplexierung von Kationen. Experimentell konnte gezeigt werden, dass GMP in Gegenwart von Alkaliionen eine hohe Tendenz zur Selbstorganisation aufweist [93][25].

Betrachtet man Ketten von Guaninbasen, die durch Phosphodiesterbindungen miteinander verbunden sind, so kann es in Gegenwart von Kationen zur „Stapelung“

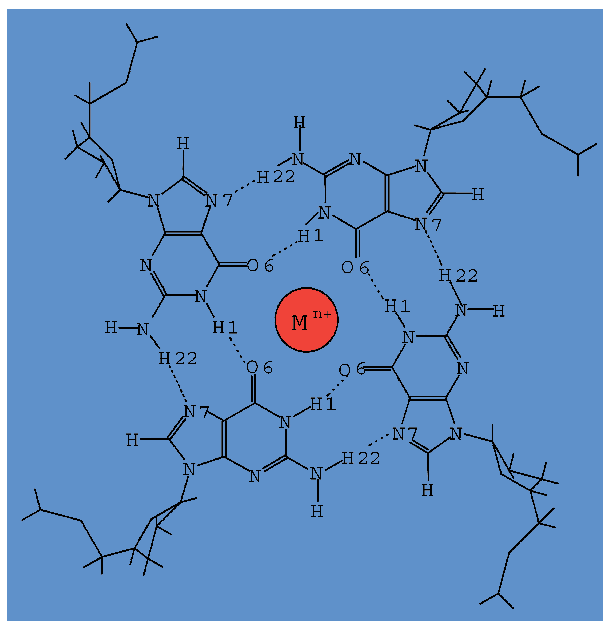
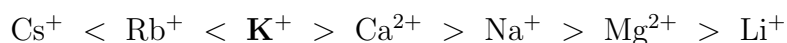


Abb. 2.3: Guanin-Quartett mit eingelagertem zentralen Kation

von G-Quartetts kommen. Die Abb. 2.4 zeigt die Struktur² eines $d[GGGG]_2$ -Systems mit einem eingelagerten Mg^{2+} , in dem durch acht Carbonylsauerstoffatome gebildeten Käfig. Die Anordnung der O6-Atome ist nahezu oktaedrisch³, was durch die gegeneinander verdrehten Guaninebenen hervorgerufen wird. Die anziehenden Wechselwirkungen zwischen Kationen und Purinbasen stabilisieren den Quadruplex zusätzlich [63][106][54].

Zahlreiche Röntgenstrukturuntersuchungen [70][63][52][92] sowie NMR-Experimente [100][106] der letzten Jahre haben maßgeblich dazu beigetragen, charakteristische strukturelle Eigenschaften der Quadruplexe zu erkennen. Insbesondere wurde die Reihenfolge, mit der Kationen Quadruplexstrukturen zu stabilisieren vermögen, experimentell untersucht [54][127][101]:



Dabei zeigte sich, dass Kaliumionen eine starke Affinität gegenüber guaninreichen Sequenzen besitzen und so zur Ausbildung und Erhaltung der o.g. Strukturen maßgeblich beitragen.

²Hierbei handelt es sich um einen Ausschnitt aus der Gesamtstruktur des Systems $d[GGGG]_4/Mg$.

³Das Ausmaß der Verzerrungen wird durch die Sorte der interkalierten Ionen bestimmt.

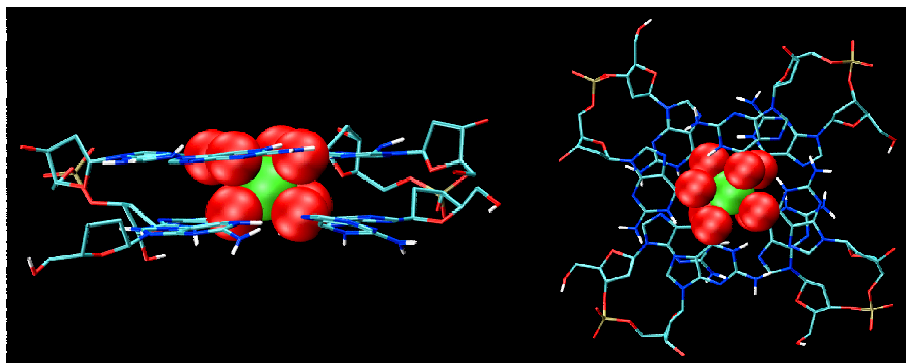


Abb. 2.4: Käfig aus Carbonylsauerstoffatomen (rot) mit einem interkaliertem Kation (grün) im Zentrum eines $d[GGGG]_2$ -Systems.

2.2 Polymorphismus

Bedingt durch den Richtungssinn von DNA-Strängen sowie der Position der Guaninbasen innerhalb der Sequenzen ergibt sich für Quadruplexe eine ausgeprägte Polymorphie [126][85]. Die Synthese spezieller Tetraplexkonformationen lässt sich dabei gezielt durch die Variation der Konzentration der DNA bzw. Ionenstärke beeinflussen [125][126][81][66][65][77][118].

So können sich sowohl intramolekulare als auch dimere („hairpin“) oder tetramere Quadruplexe ausbilden (siehe Abb. 2.6; mit Vereinfachungen entsprechend Abb. 2.5).

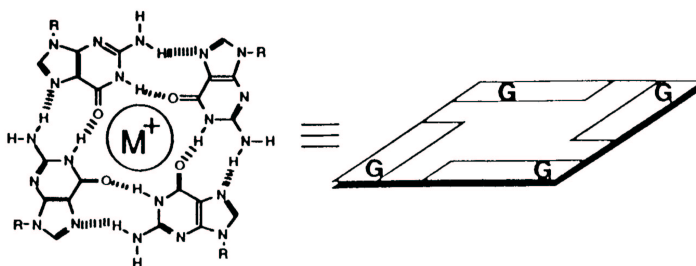


Abb. 2.5: Schematische Darstellung einer Quadruplexebene [126][68] (zur Vereinfachung der Quadruplexstrukturen werden die planar angeordneten G-Basen durch ein Quadrat dargestellt; das Rückgrat der DNA-Stränge (Phosphat und Ribose) wird im Folgenden durch einen Pfeil symbolisiert)

Dimere verfügen dabei über drei Permutationsmöglichkeiten ihrer Schleifenanordnung (siehe Abb. 2.7).

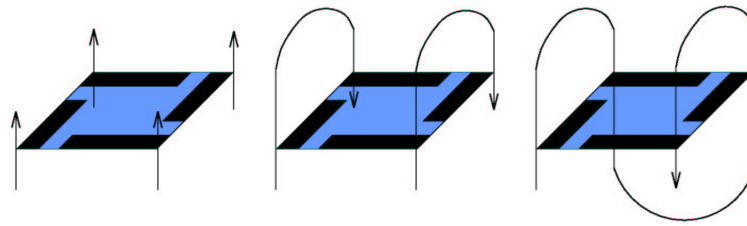


Abb. 2.6: Strang-Stöchiometrie

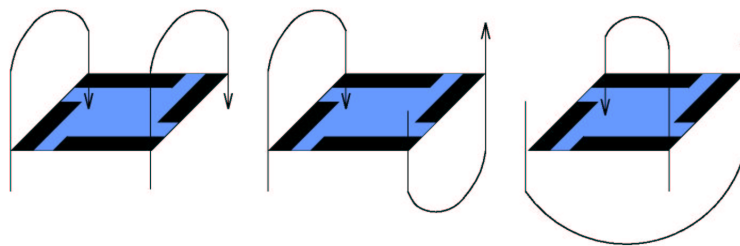


Abb. 2.7: Schleifenanordnungsmöglichkeiten des Dimers

Betrachtet man Systeme, die aus vier Strängen⁴ bestehen, so ergeben sich drei verschiedene Anordnungsmöglichkeiten hinsichtlich der Strangorientierung, wie Abb. 2.8 zu entnehmen ist. Eine zeichnet sich durch die parallele Anordnung aller Stränge aus, wohingegen die beiden anderen aus zwei parallelen sowie zwei antiparallelen Strängen bestehen. Bislang sind weniger symmetrische Anordnungen (z.B. drei parallele und eine antiparallele) nicht beobachtet worden.

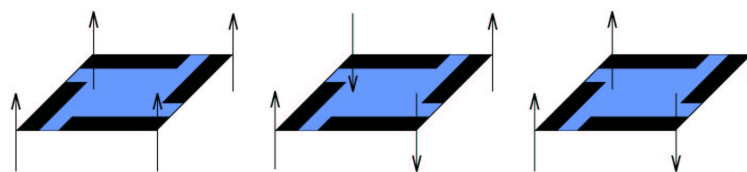


Abb. 2.8: Verschiedene Strangorientierungen

Eine weitere Variationsmöglichkeit bildet die konformative Stellung der Ribose zum Guaninrest. Sie wird durch den glykosylischen Torsionswinkel χ bestimmt, der in parallelen und antiparallelen Strängen differieren kann. Diesbezüglich kann zwischen einer syn- und einer anti-Konformation unterschieden werden (siehe Abb. 2.9).

⁴Im Rahmen dieser Arbeit werden ausschließlich intermolekulare, parallele, viersträngige Tetraplexe untersucht.

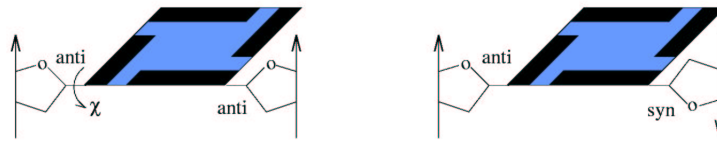


Abb. 2.9: Mögliche glykosylische Konformationen

Bei einer parallelen Anordnung der Stränge müssen die Basen bzgl. des Torsionswinkels Gleichheit zeigen. Eine antiparallele Konformation wird lediglich in zurückgefalteten Strukturen beobachtet.

2.3 Die biologische Relevanz der Quadruplexe

In vitro wird die Bildung von Quadruplexen unter physiologischen Konzentrationen bestimmter Alkali- bzw. Erdalkalitionen beobachtet, wohingegen die komplexen Mechanismen zur Ausbildung solcher Strukturen *in vivo* noch nicht vollständig geklärt werden konnte. Zum einen stellen auch für guaninreiche Genomregionen doppelhelikale Sequenzen nach dem Watson-Crick-Prinzip innerhalb eines Zellzyklus die bevorzugte Konformation dar. Zum anderen erfordert die Ausbildung intermolekularer Tetraplexe *in vitro* „hohe“ Konzentrationen an DNA.⁵

Eine Lösung für die Problematik der Entstehung von Quadruplexen innerhalb der lebenden Zelle könnte eng verknüpft sein mit der Entdeckung spezieller Eiweiße, die mit G-Tetraplexen in Wechselwirkung treten. So ließen sich zahlreiche Proteine von Einzellern und Hefebakterien identifizieren, die mit G-Quadruplexen interagieren und die Ausbildung dieser Struktureinheiten erleichtern [34][39][40]. Zusätzlich beobachtete man, dass die doppelhelikale Form der B-DNA bei Ionenkonzentrationen (Na^+ , K^+) von ca. 150 mM in einen intermolekularen G-Tetraplex übergeht [21][81]. Dies könnte die Entstehung von G-Quadruplexen aus doppelhelikaler DNA innerhalb der Zelle erklären.

Demgegenüber existieren unterschiedliche Enzyme, die das Aufwinden speziell von Tetraplexstrukturen beschleunigen. Diese so genannten Helicasen wurden in Hefebakterien, speziellen Viren sowie pathologisch veränderten Zellen (Bloom-, Werner-Syndrom) nachgewiesen [32][29][46]. Dies kann als Indiz dafür gewertet werden, dass es spezielle Mechanismen innerhalb der Zelle gibt, die das Aufwinden von Quadruplexstrukturen ermöglichen. Zusammen mit der durch Proteine und

⁵Hohe Konzentrationen an DNA treten *in vivo* nicht auf, dementsprechend werden sie voraussichtlich für die Bildung von G-Quadruplexen nicht benötigt.

Kationen gesteuerten Bildung entsprechender Strukturen stellen Quadruplexe möglicherweise „gewöhnliche“ Assoziate dar, deren Entstehung und Trennung durch ihre jeweiligen Umgebungsparameter „geschaltet“ wird.

Dabei besteht die Möglichkeit, dass innerhalb bestimmter Zellvorgänge (Replikation, Rekombination, Transkription aber auch der Verlängerung von Telomeren) doppelhelikale DNA aufgetrennt wird und sich zeitweilig guaninreiche Sequenzen zu Quadruplexen zusammenschließen [111].

2.3.1 Telomere

Die Enden linearer eukaryotischer Chromosomen werden als Telomere bezeichnet, die einem allgemeingültigen Aufbauprinzip folgen und in allen Organismen recht ähnlich aufgebaut sind. Sie bestehen aus einem Komplex sich wiederholender $d[T_{(1-3)} - (T/A) - G_{(3-4)}]_n$ -Sequenzen und assoziierten Proteinen, wobei die DNA zum überwiegenden Teil dem doppelhelikalen Aufbauprinzip folgt [130][126].⁶ An dem äußeren 3'-Ende findet man jedoch einen einzelsträngigen Überhang in der Größenordnung von ca. 200 Nucleotiden [80]. Die Erhaltung der Vollständigkeit dieses Einzelstrangs ist dabei lebenswichtig für die Zelle, da ansonsten aus der Verkürzung der Telomerenden eine Instabilität des Genoms resultiert, die zu Zellalterung führt [75]. Dementsprechend wird nach molekularen Mechanismen gesucht, die den Schutz dieses Überhangs gewährleisten.

Durch Elektrophorese-Experimente konnte gezeigt werden, dass das einzelsträngige Ende keine lineare Anordnung einnimmt [73][4], da sich die Wanderungsgeschwindigkeiten isolierter Fragmente des Telomerendes deutlich von der einzelsträngiger DNA-Sequenzen gleicher Nukleotidanzahl unterscheiden. Als denkbare Strukturen werden G-Quadruplexe vorgeschlagen, die sich in unterschiedlicher Weise ausbilden könnten (Abb. 2.10).

Eine Möglichkeit besteht darin, dass sich der guaninreiche Einzelstrang zurückfaltet und eine „hairpin“-Struktur formt, wie im linken Teil der Abb. 2.10 dargestellt. Zwei dieser „Schlaufen“ verschiedener Chromosomen könnten so unter Ausbildung einer Tetraplexstruktur dimerisieren und den Zusammenhalt von Geschwister-Chromatinen gewährleisten (vergleiche dazu ebenfalls Abb. 2.6) [112].⁷ Ebenso wäre die Bildung einer intramolekularen Tetraplexstruktur unter Zurückfaltung des 3'-Überhangs denkbar (Abb. 2.10, Mitte). Diese Konformation ist zeitweise während der Re-

⁶Hochgradig konservierte Sequenzen sind in der Regel mit unabdingbaren Vital-Funktionen verknüpft.

⁷Untersuchungen mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie an Makronuklei des Wimpertierchens *Stylonychia lemnae*, die mit speziellen Antikörpersonden für die Markierung von Tetraplexstrukturen präpariert wurden, deuten auf die Ausbildung von „hairpin“-Strukturen zwischen den Enden einzelner Telomere hin [98].

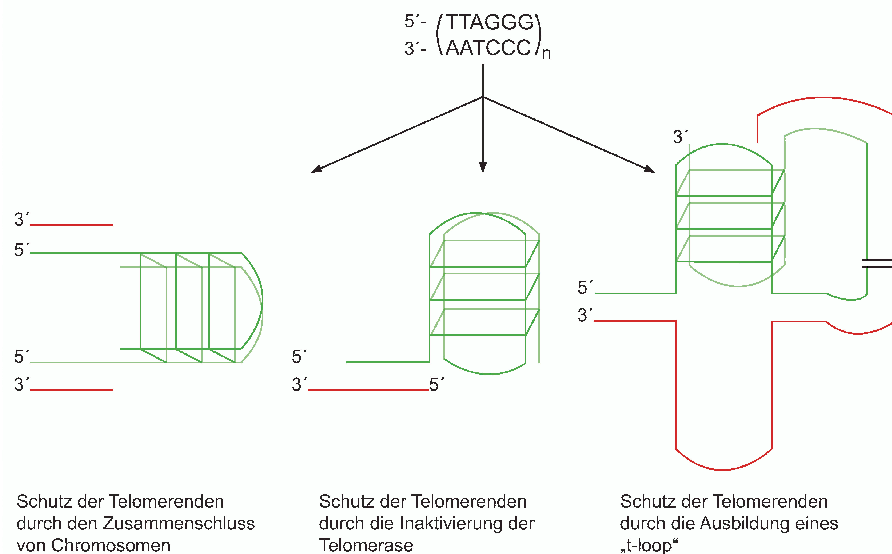


Abb. 2.10: Mögliche Modelle zum Schutz der Telomerenden durch die Ausbildung von Quadruplexstrukturen

plikation sehr wahrscheinlich, wenn lange G-reiche Einzelstränge vorliegen [36]. Ebenso könnten sich die Telomerenden unter Ausbildung eines „t-loops“ guaninreichen, doppelhelikalen Bereichen annähern (Abb. 2.10, rechts). Dies wurde *in vitro* elektronenmikroskopisch beobachtet, wobei Proteine steuernde Funktionen übernehmen [49][48].

Neben den möglichen Schutzfunktionen der Telomerenden durch Quadruplexe, wird dieser Sekundärstruktur zusätzliche Bedeutung hinsichtlich der Verlängerung von Telomer-DNA durch Telomerase beigemessen [129]. Telomerase ist ein spezielles Enzym, das Teile seiner RNA-Komponenten als Schablone benutzt, um die Telomerenden zu verlängern [26]. Dabei wird vermutet, dass ein sich ausbildender G-Quadruplex für die korrekte Basenpaarung zwischen DNA-Substrat und RNA-Schablone verantwortlich ist. Dieser Quadruplex muss sich anschließend wieder „auflösen“, um einen weiteren Verlängerungszyklus zu ermöglichen (die Bildung und die Auflösung von Tetraplexstrukturen muss also „schaltbar“ sein). Dabei könnten Kationen wie z.B. K^+ eine Rolle spielen, die Quadruplexe stabilisieren und damit Telomerase inhibieren.

2.3.2 Die Rolle der Quadruplexe in der Krebstherapie

In normalen Zellen unterliegen Telomere einer stetigen Verkürzung mit jeder Zellteilung. Ab einer „kritischen“ Telomerlänge führt dies zu einer Instabilität der

Chromosomenenden (Zellalterung), wie bereits oben beschrieben wurde. Der Mechanismus der Telomerverkürzung schränkt die Teilungsfähigkeit der menschlichen Zelle und damit ihre Lebensspanne ein. Demgegenüber sind Krebszellen durch die Expression von Telomerase in der Lage, ihre Telomerenden zu stabilisieren und so „unbegrenzt“ zu überleben. Daraus resultiert, dass diesem Enzym wahrscheinlich maßgebliche Funktionen bei der Tumorentstehung zukommen.

Bedingt durch die Fähigkeit der Quadruplexe, die Telomerase zu inhibieren, stellt die Tetraplexstabilisierung einen viel versprechenden Ansatz zur Bekämpfung von Krebstumoren dar. Neben der bereits mehrfach erwähnten Stabilisierung dieser Sekundärstruktur durch Kationen (Alkali, Erdalkali), besitzen spezielle, „kleine organische Moleküle“ ebenfalls die Fähigkeit, sich an Quadruplexe anlagern zu können und diese zu festigen.

Derivate der Antrachinone weisen eine hohe Tetraplexaffinität auf, verbunden mit cytotoxischen Eigenschaften gegenüber einer Reihe von Tumorzelllinien [31]. Anhand von MD-Simulationen wurde beispielsweise vorausgesagt, dass sich 2,6-Diamido-Anthrachinone zwischen die Tetramerebenen von Quadruplexen einlagern und die Gesamtkonfiguration dadurch festigen [27]. Einige dieser Derivate stellen die effektivsten Telomeraseinhibitoren dar, die bislang entdeckt wurden [90].

Eine weitere viel versprechende Stoffklasse bilden die kationischen Porphyrine, die bereits seit längerer Zeit im Interesse der Krebsforschung stehen. Sie sammeln sich bevorzugt in Tumorgewebe an, was ihren Einsatz als minimalinvasive Medikamente ermöglicht [30]. Spezielle Derivate sind dabei in der Lage, sowohl parallele als auch antiparallele G-Quadruplexstrukturen zu stabilisieren, was eine breitere Anwendbarkeit als Therapeutikum in Aussicht stellt [33].

Wie sich gezeigt hat, besitzen Perylene ebenfalls eine ausgeprägte Affinität zu G-Tetraplexen sowie eine geringe Neigung zu Wechselwirkungen mit einzelsträngiger bzw. doppelhelikaler DNA [41]. Entgegen der „passiven“ Bindung der anderen, zuvor diskutierten Spezies zu Quadruplexen, konnte bei Perylenen zusätzlich eine Erhöhung der Bildungsgeschwindigkeit von Tetraplexen beobachtet werden, die ihnen damit eine induktive Rolle in relevanten Zellvorgängen zukommen lässt [28].

Wie die vorausgegangenen Beispiele zeigen, stellt die Untersuchung der Mechanismen, die zur Bildung und Stabilisierung von Quadruplexstrukturen beitragen, ein viel beachtetes, aktuelles Forschungsgebiet dar. Dabei leistet die *Molekulardynamische Simulation* flankierend zu experimentellen Untersuchungen wichtige Beiträge, um ein breiteres Verständnis der Struktur und Dynamik auf atomarer Ebene zu gewinnen. Im Folgenden werden daher die Grundlagen dieser modernen Methode, Ansätze, Vorteile aber ebenso Grenzen eingehender vorgestellt.

Kapitel 3

Grundlagen der Molekulardynamik (MD)

Molekulardynamische Simulationen basieren auf den Elementen der klassischen Mechanik. Ausgehend von einem equilibrierten System werden die Folgekonfigurationen durch Integration der Newtonschen Bewegungsgleichungen bestimmt. Dabei können zahlreiche Simulationsparameter wie Druck, Temperatur, Potenzialverstärkungen, etc. flexibel variiert und hinsichtlich ihrer Wirkung analysiert werden. Dies macht die MD-Simulation zu einem „universell“ einsetzbaren Werkzeug.

Hinsichtlich des grundlegenden Verständnisses ergeben sich faszinierende Möglichkeiten, experimentell zugängliche Grenzen zu überschreiten und neue Erkenntnisse hinzugewinnen zu können. Insbesondere ermöglichen die Simulationsergebnisse, mikrostrukturelle bzw. -dynamische Aussagen über das untersuchte System zu treffen. Darüber hinaus öffnet die *Statistische Mechanik* den Zugang zu experimentell bestimmbaren Systemeigenschaften, indem sie es gestattet, durch Ensemble- oder Zeitmittelwertberechnungen aus mikroskopischen Größen auf makroskopische schließen zu können.

Das Ergebnis einer Simulation hängt jedoch in starkem Maße von der Güte des benutzten Kraftfeldes ab. Dabei werden zahlreiche zweckmäßige Vereinfachungen vorgenommen, um die Rechenzeit in einem verträglichen Rahmen halten zu können.¹ Des weiteren stellt die Rechenleistung moderner Computersysteme ein nicht unerhebliches Problem dar. Da man die zeitliche Entwicklung eines Systems in

¹Relativistische bzw. quantenmechanische Effekte werden nicht berücksichtigt, da sie die Dimensionalität des Problems drastisch erhöhen. Bisherige Erfahrungen an MD-Simulation belegen, dass diese Steigerung des Rechenaufwands nicht zwingend erforderlich ist, um die Bildung molekularer Komplexe sowie daraus resultierende strukturelle und dynamische Systemeigenschaften in zufrieden stellender Übereinstimmung mit experimentellen Daten korrekt zu beschreiben [114].

Form von Trajektorien der Atomkoordinaten verfolgt, ist lediglich für „schnelle“ Prozesse (10^{-12} - 10^{-9} s) die Bildung von Gleichgewichtsmittelwerten möglich. Die Beschreibung langsamer Prozesse sollte dementsprechend eher als eine Stichprobe verstanden werden, die einen ersten Eindruck über das Systemverhalten liefert.²

Ist man an der Beschreibung von Gleichgewichtszuständen interessiert, so reicht es aus, ein statistisches Ensemble zu erzeugen, dem zeitlich nicht miteinander verknüpfte Größen zugrunde liegen. Dies Verfahren wird im Bereich der Computersimulation als *Monte-Carlo-Verfahren* bezeichnet, in Anlehnung an die Durchsuchung des Phasenraumes mit Hilfe von Stichproben. Es bietet den Vorteil, für die beteiligten Atome keinerlei Impulse berechnen zu müssen, lediglich die Atompositionen werden unter Verwendung von Zufallszahlen bestimmt.

Steht jedoch nicht die Sammlung einzelner statischer Eindrücke im Vordergrund, sondern die Beobachtung der zeitlichen Entwicklung eines Systems, so müssen Trajektorien im Phasenraum mit Hilfe *dynamischer Methoden* erzeugt werden.

Die Grundlagen der MD-Simulation beruhen auf Pionierarbeiten von ALDER, WAINRIGHT (1957) und RAHMAN (1964) [5][94], die mit ihren theoretischen Ansätzen den Startschuss für die virtuelle Behandlung dynamischer Vorgänge auf molekularer Ebene gaben. Die Gesetzmäßigkeiten der klassischen Mechanik werden dabei auf atomare Systeme übertragen, indem die Newtonschen Bewegungsgleichungen für jedes Atom unter Berücksichtigung vorgegebener Randbedingungen gelöst werden. Die Bewegung der Teilchen wird bestimmt durch ihre Wechselwirkungen untereinander, wobei, ausgehend von einer Startstruktur, mit Hilfe spezieller Algorithmen und geeigneter Potenzialfunktionen die zeitliche Entwicklung des Systems realisiert wird. Eine breite Akzeptanz dieser Methodik konnte erst einige Jahrzehnte später durch den Einsatz leistungsfähiger Computersysteme geschaffen werden, die auch die wichtige Einbeziehung der Wechselwirkungen mit dem umgebenden Lösungsmittel erlaubte.

Zur vollständigen Beschreibung eines solchen Systems, bestehend aus N Teilchen mit f Freiheitsgraden, benötigt man nach den Gesetzen der klassischen Mechanik $2f$ Größen. Der daraus resultierende Phasenraum ist also $2f$ -dimensional. Er wird aufgespannt durch f Ortskoordinaten q_i mit ihren zugehörigen f Impulskoordinaten p_i ($i = 1, 2, \dots, f$). Der Phasenraum besteht aus Punkten $\Gamma(t)$, die durch Vektoren $\mathbf{r} = \{q_1, q_2, \dots, q_f, p_1, p_2, \dots, p_f\}$ definiert werden (siehe Abb. 3.1).

²Bedingt durch die zugrunde liegenden Modellannahmen weisen Ergebnisse aus MD-Simulationen immer eine Diskrepanz zum Experiment auf. Insofern sind resultierende Detailinformationen mit einer nötigen kritischen Distanz zu beurteilen. Dies schränkt jedoch die Bedeutung des MD-Verfahrens als ernstzunehmender Bestandteil der modernen Struktur- und Funktionsanalytik nicht ein.

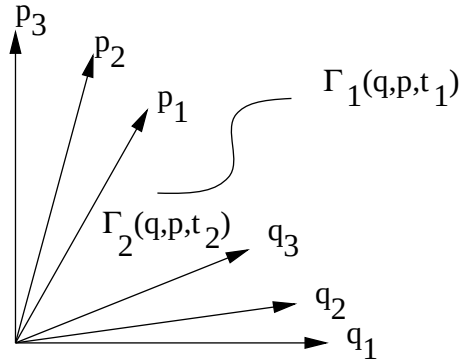


Abb. 3.1: Sechsdimensionaler Phasenraum für ein System aus einem freien Massepunkt [68]

Jede dieser „Momentaufnahmen“ beinhaltet den Ort und Impuls sämtlicher beteiligter Atome und determiniert dementsprechend die Gesamtkonfiguration zu einem bestimmten Zeitpunkt (t). Eine Trajektorie stellt dementsprechend den Weg dar, den der mechanische Zustand eines Systems durch diesen Phasenraum beschreitet, quasi eine „Filmsequenz von Momentaufnahmen“.

Für ein ergodisches System entspricht die beobachtete makroskopische Größe A_{beo} dem zeitlichen Mittelwert, der durch Grenzwertbildung des in Gl. (3.1) beschriebenen Integrals zugänglich ist.

$$A_{beo} = \langle A \rangle_{zeit} = \langle A(\Gamma(t)) \rangle_{zeit} = \lim_{t_{beo} \rightarrow \infty} \frac{1}{t_{beo}} \int_0^{t_{beo}} A(\Gamma(t)) dt \quad (3.1)$$

Untersucht man als zu beobachtende Größe z.B. die potenzielle Energie, so ist es in der Realität nicht möglich, über einen unendlich langen Zeitbereich zu integrieren. Vielmehr erfordert die Praxis die Mittelung über einen langen, jedoch endlichen Zeitraum, der näherungsweise eine Übereinstimmung zwischen dem Zeitmittel und dem Scharmittel liefert. Hierfür wird der Beobachtungszeitraum t_{beo} in viele diskrete Zeitschritte n_{beo} der Länge $\delta t = t_{beo}/n_{beo}$ aufgeteilt und das Integral aus Gl. (3.1) durch eine Summe angenähert (siehe Gl. (3.2)).

$$E_{beo} = \langle E \rangle_{zeit} \approx \frac{1}{n_{beo}} \sum_{n=1}^{n_{beo}} E(\Gamma(n)) \quad (3.2)$$

Um die potenzielle Energie zu bestimmen, muss ihre Funktion im Phasenraum bekannt sein. Man greift auf Modelle (Kraftfelder) zurück, die das System in angemessener Form beschreiben und für die Konfigurationen zu bestimmten Zeitpunkten entsprechende Werte liefern.

Die Komplexität des Phasenraums erlaubt in der Praxis nicht dessen vollständige Durchsuchung nach Zuständen minimaler Energie. Vielmehr ist es in einer MD-Simulation unerlässlich, dass vor Beginn eine geeignete Startstruktur generiert wird, die bereits „möglichst gut“ mit der Gleichgewichtskonfiguration übereinstimmt. Die Veränderungen dieser Ausgangskonfiguration werden im Anschluss mit Hilfe eines geeigneten Algorithmus berechnet. Dieser muss in der Lage sein, die Dynamik des Systems, also die zeitliche Entwicklung richtig zu beschreiben und damit repräsentative Ergebnisse zu liefern. Dabei sucht der Algorithmus während der Simulation Minima auf der komplexen Energiehyperfläche. Man sollte sich jedoch bei der Interpretation der Ergebnisse verdeutlichen, dass es sich vornehmlich um lokale Minima handelt. Eine Aussage bzgl. des absoluten Minimums lässt sich durch eine MD-Simulation nach heutigem Stand nicht treffen.

Da die Simulationsgüte in entscheidendem Maße von den verwendeten Kraftfeldern (Potenzialen) und Algorithmen abhängt, werden diese Parameter im weiteren Verlauf dieses Kapitels eingehender vorgestellt.

3.1 Das Kraftfeld als Modellfunktion für die potenzielle Energie

Das Kraftfeld beschreibt die Wechselwirkungen aller beteiligten Atome innerhalb des simulierten Systems als Näherung für die Funktion der potenziellen Energie. Viele der momentan für die Simulation von Biopolymeren verwendeten Kraftfelder basieren auf den von ALLINGER et al. gestalteten „molecular mechanics types“-Kraftfeldern [7]. Das in dieser Arbeit verwendete Kraftfeld für Biosysteme wurde von VAN GUNSTEREN und BERENDSEN an der Universität Groningen entwickelt [117]. Es besitzt die in Gl. (3.3) dargestellte Form und beschreibt die Wechselwirkungen von N Atomen der Masse m_i mit den zugehörigen Ortskoordinaten $\mathbf{r}_i$:

$$\begin{aligned}
 V(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \dots, \mathbf{r}_N) = & \sum_{\text{Bind.}} \frac{1}{2} k_b (b - b_0)^2 \\
 & + \sum_{\substack{\text{Bind.} \\ \text{Winkel}}} \frac{1}{2} k_\theta (\theta - \theta_0)^2 \\
 & + \sum_{\substack{\text{uneigentl.} \\ \text{Diederw.}}} \frac{1}{2} k_\xi (\xi - \xi_0)^2 \\
 & + \sum_{\substack{\text{Dieder-} \\ \text{winkel}}} \frac{1}{2} k_\phi [1 + \cos(n\phi - \phi_0)] \\
 & + \sum_{\substack{\text{nichtbind.} \\ \text{Paare } i,j}} \left[\frac{C_{12}(i,j)}{r_{ij}^{12}} - \frac{C_6(i,j)}{r_{ij}^6} + \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r r_{ij}} \right]
 \end{aligned} \tag{3.3}$$

Die bindenden Wechselwirkungen werden durch die ersten vier Terme beschrieben. Sie berücksichtigen die inneren Freiheitsgrade des Moleküls in folgender Weise:

- *2-Körperbewegung*

Streckschwingung (harmonisches Potential)

b = Bindungslänge

b_0 = Gleichgewichts-Bindungslänge

k_b = Kraftkonstante

- *3-Körperbewegung*

Biegeschwingung (harmonisches Potential)

θ = Winkel

θ_0 = Gleichgewichts-Winkel

k_θ = Kraftkonstante

- *4-Körperbewegung*

”Out-of-plane”-Schwingung (harmonisches Potential)

ξ = uneigentliche Diederwinkel

ξ_0 = Gleichgewichts-Winkel

k_ξ = Kraftkonstante

Torsionsschwingung (sinusförmiges Potential)

ϕ = Diederwinkel

ϕ_0 = Gleichgewichts-Diederwinkel

k_ϕ = Winkelrichtgröße

n = Periodizität des Winkels

Die notwendigen Parameter wie Kraftkonstanten oder auch Gleichgewichtsbindungslängen und -winkel sind durch theoretische Arbeiten (ab-initio-Rechnungen) an kleinen Systemen, spektroskopischen Analysen oder auch Röntgenstrukturuntersuchungen zugänglich.

Der letzte Term in Gl. (3.3) berücksichtigt die nichtbindenden Wechselwirkungen, die von eminenter Bedeutung für die korrekte Beschreibung der Systemeigenschaften sind, in folgender Form [95]:

$$V = V_{\text{Überlapp}} + V_{\text{Dispersion}} + V_{\text{Elektrostatik}} \quad (3.4)$$

Die Van-der-Waals-Wechselwirkungen, die die ersten beiden Terme berücksichtigen, werden durch ein Lennard-Jones-Potenzial angenähert. Aus Gl. (3.3) ist ersichtlich,

dass der repulsive Term für kleine Abstände überwiegt, wohingegen attraktive Wechselwirkungen für große Abstände dominant werden. Die entsprechenden Lennard-Jones-Parameter werden aus Gitterenergien bzw. Kristallstrukturen berechnet [121][55].

Durch die Reduktion auf Punktladungen können die elektrostatischen Wechselwirkungen in Form eines Coulomb-Terms dargestellt werden. Die entsprechenden Ladungen q werden durch quantenmechanische Rechnungen bestimmt [55][121][105]. Unterschiede beobachtet man in den verschiedenen Kraftfeldern insbesondere für die relative Dielektrizitätskonstante. Dabei werden Werte von $\epsilon_r = 1$ [62][116] bis $\epsilon_r = 8$ [56] verwendet.³

Alternativ zum Coulomb-Term lässt sich das Lösungsmittel als Kontinuum durch eine abstandsabhängige Dielektrizitätskonstante annähern, die dem dämpfenden Einfluss des Wassers Rechnung trägt. Dies gilt für den Fall, dass die Solvensmoleküle nicht eigenständig berücksichtigt werden [122].

Aufgrund der Komplexität polymerer Biosysteme, verbunden mit den daraus resultierenden hohen Rechenanforderungen, beschränkt man sich häufig auf die Berücksichtigung von Paarwechselwirkungen. In der vorliegenden Arbeit werden induzierte Dipole sowie Polarisierbarkeiten daher nicht berücksichtigt.

Eine Übersicht der am häufigsten benutzten Kraftfelder erhält man unter [1]. Diese sind auf die Verwendung innerhalb bestimmter Bereiche chemischer Fragestellungen optimiert (z.B. AMBER [121][122], CHARMM [16], MM+ [7] oder OPLS [62]). Für die korrekte Beschreibung der Dynamik von Biomolekülen ist die explizite Berücksichtigung der Wechselwirkungen mit dem umgebenden Lösungsmittel unerlässlich. Zu diesem Zweck ist eine Vielzahl von Modellen entwickelt worden, die die Potenzialfunktionen des Wassers beschreiben. Verschiedene TIP-Modelle⁴[60][61], das MCY-Modell [78] oder die SPC- und SPC/E-Modelle [13][10][107] (siehe dazu Kapitel 4.2.3 auf Seite 43) stehen für die Simulation von Molekülen in wässriger Umgebung zur Verfügung.

Das in dieser Arbeit verwendete Simulationspaket GROMOS wurde speziell für die Simulation von Biopolymeren im Lösungsmittel Wasser optimiert. Das zugehörige Kraftfeld entspricht in seiner Form der in Gl. (3.3) dargestellten Funktion. Zusätzlich besteht die Möglichkeit durch die Addition von Potenzialen, Abstände und Positionen sowie Bindungswinkel gezielt zu verstärken oder komplett zu fixieren (*distance-, position- or angle-restraining*). Diese Funktionalitäten spielen insbesondere bei der Equilibrierung des Systems eine Rolle, die der eigentlichen Simulationsphase vorausgeht (vgl. dazu Kapitel 4.4 auf Seite 45). Des Weiteren

³Das Gromos-Kraftfeld verwendet $\epsilon_r = 1$

⁴**T**ransferable **I**nteraction function **P**arameter

bietet das Programmpaket zahlreiche FORTRAN-Routinen an, die nach entsprechender Anpassung an die individuellen Systemeigenschaften zur Trajektorienanalyse herangezogen werden können (z.B. Bestimmung von Wasserstoffbrückenbindungen, Beschreibung des Diffusions- und Fluktuationsverhaltens, ...).

Durch die Wahl einer relativ einfachen Form der potenziellen Energie (Gl. (3.3)) ergeben sich deutliche Vorteile hinsichtlich der Simulationsgeschwindigkeit. Die Vertretbarkeit dieser Vereinfachungen wird durch frühere Arbeiten gerechtfertigt [117][114]. Wie sich an dieser Stelle gezeigt hat, ist man in der Lage, experimentelle Befunde wie z.B. Strukturinformationen (Lagen, Abstände, Orientierungen) aus NMR- und Röntgenbeugungsuntersuchungen oder dynamische Eigenschaften (Schwingungsfrequenzen, Diffusionskonstanten) aus IR- bzw. Lichtstreuexperimenten mit spezifischen Simulationsergebnissen zu vergleichen bzw. diese zu erweitern.⁵

3.2 Die Durchsuchung des Phasenraums

Die Durchsuchung des Phasenraums stellt in der Praxis für Biomoleküle ein komplexes Problem dar. Aufgrund ihrer Größe besitzen sie sehr viele Freiheitsgrade, die es in der Praxis unmöglich machen, den kompletten Konfigurationsraum nach Zuständen möglichst geringer potenzieller Energie zu durchsuchen. Es besteht daher die Notwendigkeit, alternative Verfahren einzusetzen, die repräsentative Punkte des Phasenraums erfassen.

Wie im vorhergehenden Kapitel erwähnt, besteht die Möglichkeit nach dem Zufallsprinzip (*random sampling*) bestimmte Konformationen zu generieren und hinsichtlich ihrer Relevanz zu beurteilen. Dies, als *Monte-Carlo-Simulation* bezeichnete Vorgehen, erzeugt ein kanonisches Ensemble. In einem ersten Schritt erfolgt dabei die zufällige Verschiebung eines oder mehrerer Atome aus einer Startstruktur $\mathbf{r}_s$, sodass eine neue Konfiguration $\mathbf{r}_{s+1} = \mathbf{r}_s + \Delta\mathbf{r}$ entsteht. Im Anschluss wird dann anhand eines Energiekriteriums beurteilt, ob diese Anordnung angenommen oder verworfen wird. Mit $\Delta E = V(\mathbf{r}_{s+1}) - V(\mathbf{r}_s)$ gilt für den Fall einer Annahme:

- $\Delta E \leq 0$ oder
 - $\Delta E \geq 0$ und $e^{-\Delta E/kT} > R$
- ($R \equiv$ Zufallszahl aus gleichförmiger Verteilung im Intervall (0,1))

⁵Um eine realistische Einschätzung der Ergebnisse von MD-Simulationen zu erhalten, müssen die zugrunde liegenden Modellannahmen in die abschließende Beurteilung einbezogen werden. Insbesondere eine zu starke Entfernung von den eigentlichen Systemen, die der Parametrisierung dienen, führt zu einer falschen Beschreibung der Systemeigenschaften. So kann z.B. ein für die Wechselwirkung kleiner, ungeladener Moleküle optimiertes Kraftfeld nicht plötzlich für die Simulation von Biopolymeren herangezogen werden.

Die Wahrscheinlichkeit für das Beschreiten des Weges von einer Konfiguration r_2 zu einer Konfiguration r_1 ($E_{r_1} < E_{r_2}$) ist gleich eins. Die umgekehrte Richtung ist mit einer Wahrscheinlichkeit von $e^{-(E_2-E_1)/kT}$ behaftet.

Betrachtet man die Besetzung beider Konfigurationen im Gleichgewicht, so ergibt sich folgendes Verhältnis:

$$p_2 \cdot 1 = p_1 \cdot e^{-(E_2-E_1)/kT} \quad (3.5)$$

$$\frac{p_1}{p_2} = \frac{e^{-E_1/kT}}{e^{-E_2/kT}} \quad (3.6)$$

Die Gewichtung der Häufigkeit, mit der bestimmte Anordnungen auftreten, erfolgt durch einen Boltzmannfaktor. Dadurch wird sichergestellt, dass ein statistisch repräsentativer Satz von Konfigurationen (Ensemble) entsteht.

Für die Untersuchung großer Systeme muss die Schrittweite sehr klein gewählt werden. Da die Auswahl der Richtung zufällig erfolgt, werden häufig Energieniveaus erreicht, die sich von ihrem Vorgänger durch höhere Werte unterscheiden. Dadurch ergibt sich ein schlechtes Akzeptanzverhältnis, das die Anwendung des *Monte-Carlo-Verfahrens* für die Untersuchung von Biopolymeren erheblich einschränkt.

Eine Alternative zu dem gerade beschriebenen Verfahren besteht in einer gezielten Auswahl der Schrittrichtung, die der Methode der *MD-Simulation* zugrunde liegt. Wie bereits auf S. 18 ausgeführt, beruht diese auf der Integration der Newtonschen Bewegungsgleichungen (Gl. (3.7)) für alle beteiligten Atome i ($i = 1, \dots, N$).

$$\frac{d^2 \mathbf{r}_i(t)}{dt^2} = m_i^{-1} \mathbf{F}_i \quad (3.7)$$

$$\text{mit} \quad \mathbf{F}_i = - \frac{\partial V(\mathbf{r}_1, \dots, \mathbf{r}_N)}{\partial \mathbf{r}_i} \quad (3.8)$$

Die Bewegungen der als Punktmassen betrachteten Atome werden durch die Kräfte, die aus der wechselseitigen Beziehung der restlichen Teilchen resultieren, bestimmt. Da es auch während einer MD-Simulation z.Zt. unmöglich ist, den gesamten Phasenraum zu durchsuchen, muss die Annahme getroffen werden, dass die erzeugte Trajektorie statistisch repräsentativ ist. Dies setzt voraus, dass eine ausreichend lange Simulationsdauer vorliegt. Zudem muss ein für das untersuchte System geeignetes Modell gewählt werden, das die Eigenschaften korrekt wiedergibt. Vor dem Hintergrund der vorhandenen Rechenkapazitäten reduziert sich das in dieser Arbeit benutzte Modell auf die Berücksichtigung der drei Ortsfreiheitsgrade jedes Atoms. Quantenmechanische Effekte, wie mögliche Bindungsbrüche oder auch Elektronenwechselwirkungen, werden ebenso vernachlässigt wie Polarisierungseffekte, die auf Wechselwirkungen induzierter Dipole beruhen.

3.3 Rahmenbedingungen

Gleichung (3.7) stellt eine Differenzialgleichung 2. Ordnung dar, deren Lösung durch die Wahl entsprechender Start- bzw. Randbedingungen terminiert wird. Durch eine Maxwellsche Geschwindigkeitsverteilung, die die äußeren Parameter wie Druck und Temperatur berücksichtigt, wird jedem Atom eine individuelle Geschwindigkeit zugeordnet. Die so spezifizierten Orts- und Impulskoordinaten bilden die Startbedingungen.

Reale Biosysteme bestehen aus einer extrem großen Anzahl gleichartiger Makromoleküle und Solvensteilchen. Die komplette Simulation eines solchen Systems ist in der Praxis gegenwärtig unmöglich. Man betrachtet daher ein isoliertes Makromolekül in einer Umgebung, die möglichst physiologischen Bedingungen entspricht. Die bei der Verwendung einer einzelnen Elementarzelle auftretenden Oberflächeneffekte können durch die Einführung periodischer Randbedingungen umgangen werden [6][79]. Zu diesem Zweck werden die zu untersuchenden Spezies in einer Simulationsbox platziert, die durch eine geeignete dreidimensionale Anordnung den gesamten Raum fortlaufend auszufüllen vermag. Dies können Quader, abgekappede Oktaeder oder auch Dodekaeder sein. Anhand eines Quaders soll im Folgenden das Prinzip exemplarisch veranschaulicht werden.

Um das zentrale kubische Volumen werden entlang der Koordinatenachsen identische Boxen der Kantenlänge L angeordnet, die jeweils durch die Verschiebung um ein Vielfaches von L entstanden sind (siehe Abb. 3.2).

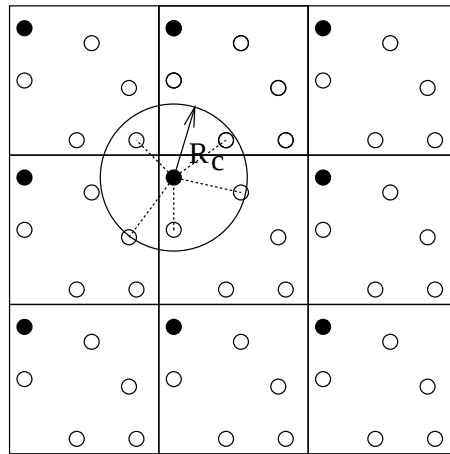


Abb. 3.2: Periodische Randbedingungen für die *minimum-image*-Konvention [68] (mit *cutoff*-Radius R_c)

So ergibt sich ein unendlich ausgedehntes System, ohne dass Oberflächenmoleküle berücksichtigt werden müssen. In allen Kopien der ursprünglichen Box besitzen die Atome i stets die gleichen internen Ortskoordinaten und Geschwindigkeiten. Die auf ein spezifisches Atom wirkenden Kräfte sind innerhalb aller Boxen identisch. Der Vorteil dieser Vorgehensweise liegt darin, dass Veränderungen jeweils nur einmal berechnet werden müssen. Die Koordinaten eines jeden Teilchens liegen zwischen 0 und L . Sobald ein Teilchen den Bereich der Elementarzelle verlässt, tritt eines seiner Abbilder an der entgegengesetzten Seite der Box wieder ein, was zu einer konstanten Anzahl an Teilchen in der Simulationsbox führt.

Prinzipiell sollten die periodischen Randbedingungen dazu führen, dass die wechselseitigen Krafteinflüsse entsprechend der unendlichen Ausdehnung der gesamten Systemgrenzen berücksichtigt werden müssten. Dies ist jedoch nicht praktikabel und kann aufgrund des schnellen Abfalls der anziehenden und abstoßenden Lennard-Jones-Wechselwirkungen der Teilchen untereinander auf einen bestimmten Abstand begrenzt werden. Diese, als *cutoff*-Radius R_c ($R_c < L/2$) bezeichnete Distanz, beschreibt die Umgebung, in der Paar-Wechselwirkungen berücksichtigt werden [117]. Die Anisotropie, die aus den zumeist kubischen Geometrien der Simulationsbox resultiert, kann durch eine sphärische Form der Wechselwirkungsumgebung vermieden werden, indem jenseits des *cutoff*-Radius die wirkenden Kräfte auf Null reduziert werden.

Mit Hilfe der so genannten *minimum-image*-Konvention erreicht man, dass ein Teilchen i nicht mit einem seiner Abbilder i' in Wechselwirkung tritt.⁶ Da die Teilchenpotenziale lediglich bis zu einer Distanz R_c wirksam sind, kann man eine zur Elementarzelle identische Simulationsbox um jedes Teilchen i legen. Daraus resultiert, dass zu jedem Zeitpunkt lediglich die Wechselwirkung zu den anderen $N - 1$ berücksichtigt werden muss.

3.4 Die Algorithmenauswahl

Die in den Gl. (3.7) und (3.8) beschriebenen Newtonschen Bewegungsgleichungen bilden ein Differenzialgleichungssystem, das nur numerisch unter Einbeziehung der im vorangehenden Kapitel beschriebenen Randbedingungen zu lösen ist. Zur Lösung dieses Problems existiert eine Vielzahl verschiedener Algorithmen, die sich hinsichtlich des Rechenaufwands und ihrer Genauigkeit unterscheiden [6]. In der vorliegenden Arbeit wird der *leap-frog*-Algorithmus benutzt, der sich durch einen einfachen Aufbau, große Genauigkeit und hohe Stabilität auszeichnet [117].

⁶Dies wäre lediglich für die Simulation von Kristallen wünschenswert.

Die N Differentialgleichungen 2. Ordnung bzgl. $\mathbf{r}$ werden in $2N$ 1. Ordnung bzgl. $\mathbf{r}$ und $\mathbf{v}$ aufgeteilt:

$$m_i \frac{d\mathbf{v}_i(t)}{dt} = \mathbf{F}_i(\mathbf{r}) \quad i = 1, \dots, N \quad (3.9)$$

$$\frac{d\mathbf{r}_i(t)}{dt} = \mathbf{v}_i(t) \quad (3.10)$$

Daraus ergibt sich nach der Integration:

$$m_i \frac{\mathbf{v}_i(t + \Delta t/2) - \mathbf{v}_i(t - \Delta t/2)}{\delta t} = \mathbf{F}_i \quad (3.11)$$

$$\frac{\mathbf{r}_i(t + \Delta t) - \mathbf{r}_i(t)}{\delta t} = \mathbf{v}_i(t + \Delta t/2) \quad (3.12)$$

Unter der Voraussetzung, dass die Werte $\mathbf{r}_i(t)$ und $\mathbf{v}_i(t - \Delta t/2)$ bekannt sind, können die Orts- und Geschwindigkeitskoordinaten der Atome berechnet werden. Sie unterscheiden sich durch die zugrunde liegenden Zeitpunkte. Die Funktionen für die Geschwindigkeiten $\mathbf{v}_i(t)$ werden in eine Taylorreihe um $t = t_n$ entwickelt, die Funktionen für die Orte $\mathbf{r}_i(t)$ in eine Taylorreihe um $t = t_n + \Delta t/2$, also um Positionen deren Funktionswerte unbekannt sind, sich aber jeweils nur um $\Delta t/2$ von einem bekannten Funktionswert entfernt befinden.

$$\mathbf{v}_i(t) = \mathbf{v}_i(t_n) + \frac{(t - t_n)}{1!} \frac{d\mathbf{v}_i(t_n)}{dt} + \frac{(t - t_n)^2}{2!} \frac{d^2\mathbf{v}_i(t_n)}{dt^2} + \dots \quad (3.13)$$

$$\begin{aligned} \mathbf{r}_i(t) = \mathbf{r}_i(t_n + \Delta t/2) &+ \frac{(t - (t_n + \Delta t/2))}{1!} \frac{d\mathbf{r}_i(t_n + \Delta t/2)}{dt} \\ &+ \frac{(t - (t_n + \Delta t/2))^2}{2!} \frac{d^2\mathbf{r}_i(t_n + \Delta t/2)}{dt^2} + \dots \end{aligned} \quad (3.14)$$

Mit $t = t_n + \Delta t/2$ sowie für $t = t_n - \Delta t/2$ erhält man aus Gl. (3.13)

$$\mathbf{v}_i(t_n + \Delta t/2) = \mathbf{v}_i(t_n) + \Delta t/2 \frac{d\mathbf{v}_i(t_n)}{dt} + \frac{(\Delta t/2)^2}{2!} \frac{d^2\mathbf{v}_i(t_n)}{dt^2} + \dots \quad (3.15)$$

$$\mathbf{v}_i(t_n - \Delta t/2) = \mathbf{v}_i(t_n) - \Delta t/2 \frac{d\mathbf{v}_i(t_n)}{dt} + \frac{(-\Delta t/2)^2}{2!} \frac{d^2\mathbf{v}_i(t_n)}{dt^2} + \dots \quad (3.16)$$

Die Differenz von Gl. (3.15) und Gl. (3.16) ergibt dann unter Verwendung von Gleichung (3.9) und Vernachlässigung höherer Terme:

$$\mathbf{v}_i(t_n + \Delta t/2) = \mathbf{v}_i(t_n - \Delta t/2) + m_i^{-1} \mathbf{F}_i(\mathbf{r}_i(t_n)) \Delta t + \dots \quad (3.17)$$

Wendet man entsprechend diese Verfahrensweise auf Gl. (3.14) an und bildet ebenfalls wieder die Differenz (diesmal jedoch die der Funktionswerte für $t = t_n$ bzw. $t = t_n + \Delta t$), so resultiert daraus zusammen mit Gl. (3.8):

$$\mathbf{r}_i(t_n + \Delta t) = \mathbf{r}_i(t_n) + \mathbf{v}_i(t_n + \Delta t/2)\Delta t + \dots \quad (3.18)$$

Zusammenfassend verdeutlicht das folgende Schema den Ablauf:

- Die Bestimmung von $\mathbf{F}(\mathbf{r}_i(t))$ erfolgt entsprechend Gl. (3.8). Das Potential ergibt sich dabei aus Gl. (3.3).
- Daraus lässt sich zusammen mit den Startwerten $\mathbf{r}_i(t)$ und $\mathbf{v}_i(t - \Delta t/2)$ der Wert für $\mathbf{v}_i(t_n + \Delta t/2)$ (Gl. (3.17)) bestimmen.
- Mit Hilfe von Gleichung (3.18) erfolgt die Berechnung von $\mathbf{r}_i(t_n + \Delta t)$. Mit diesen Werten kann dann ein erneuter Algorithmen durchlauf erfolgen.

Die Abb.(3.3) verdeutlicht die Namensgebung des Algorithmus, der in der deutschen Übersetzung als Bocksprung bezeichnet wird. Nachdem die Geschwindigkeit zum Zeitpunkt $t + \Delta t/2$ bestimmt worden ist, springt man über die aktuelle Ortskoordinate hinweg, um den nächsten Halbschritt wert zu ermitteln.

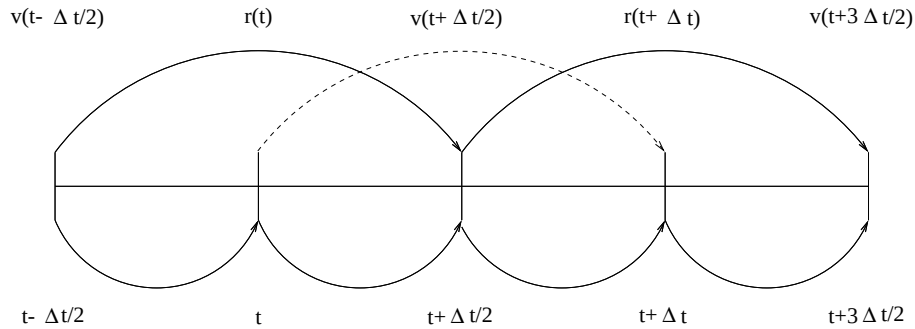


Abb. 3.3: Graphische Darstellung des *leap-frog*-Algorithmus [68]

Durch eine Mittelwertbildung können Orte und zugehörige Geschwindigkeiten der Teilchen zu einem gemeinsamen Zeitpunkt bestimmt werden. Dies stellt eine Näherung dar, die im Rahmen der erreichbaren Genauigkeit jedoch als vertretbar angesehen werden kann.⁷

$$\mathbf{v}_i(t) = \frac{1}{2}(\mathbf{v}_i(t + \Delta t/2) + \mathbf{v}_i(t - \Delta t/2)) \quad (3.19)$$

⁷Die Speicherung der aktuellen Koordinaten $\mathbf{r}_i(t)$ und der Halbschrittwerte der Geschwindigkeiten $\mathbf{v}_i(t - \Delta t/2)$ muss sichergestellt werden.

3.5 Besonderheiten der MD-Simulation

3.5.1 Isotherme bzw. isobare MD-Verfahren

Ein häufig verwendeter Ansatz für Simulationen geht von dem Erhalt des Volumens und der Gesamtenergie aus. Demgegenüber werden Experimente zumeist bei konstantem Druck und konstanter Temperatur durchgeführt. Möchte man daher den direkten Vergleich zu experimentellen Messergebnissen herstellen, so wäre es wünschenswert, ein isobar-isothermes Ensemble zu erzeugen.

Zu diesem Zweck sind verschiedene Verfahren entwickelt worden [117], die den Druck bzw. die Temperatur als unabhängige Variable behandeln. Insbesondere können dadurch Temperaturverschiebungen infolge von Kräfteabbruchfehlern korrigiert werden, die ansonsten zu unrealistischen Erwärmungen bzw. Abkühlungen führen würden.

Das in dieser Arbeit verwendete Verfahren beruht auf dem so genannten *Berendsen-Thermostaten*, der von VAN GUNSTEREN und BERENDSEN entwickelt wurde. Er beruht auf der schwachen Kopplung mit einem Wärmebad [12][116][117]. Allgemein ist die Temperatur mit der kinetischen Energie des Systems über folgende Beziehung verknüpft:

$$E_{kin}(t) = \sum_{i=1}^N \frac{1}{2} m_i \mathbf{v}_i^2(t) = \frac{1}{2} N_{df} k_B T(t) \quad (3.20)$$

Jedem Freiheitsgrad N_{df} kommt dabei ein Betrag von $1/2 k_B T(t)$ zu ($k_B \equiv$ Boltzmann-Konstante). Die Temperatur kann zu einem beliebigen Simulationszeitpunkt t auf einen bestimmten Wert T_0 eingestellt werden, indem die Teilchengeschwindigkeiten mit einem Faktor $\sqrt{T_0/T(t)}$ multipliziert werden. Realistischer ist es jedoch, die Bewegungsgleichungen so zu verändern, dass die Wirkung auf das System einer Temperaturrelaxation 1. Ordnung auf den Referenzwert T_0 entspricht:

$$\frac{dT}{dt} = \tau_T^{-1} [T_0 - T(t)] \quad (3.21)$$

- $\tau_T \equiv$ Relaxationszeit
- $T_0 \equiv$ Referenztemperatur
- $T \equiv$ Temperatur

Durch die Multiplikation der Atomgeschwindigkeiten $\mathbf{v}_i$ mit einem Faktor λ wird die kinetische Energie während eines MD-Zeitschrittes angepasst. Damit ergibt sich unter Verwendung von Gl. (3.20):

$$\Delta E_{kin} = \frac{1}{2} (\lambda^2 - 1) N_{df} k_B T(t) \quad (3.22)$$

Diese Energieveränderung kann unter der Annahme, dass die Wärmekapazität pro Freiheitsgrad c_v^{df} beträgt, als Temperaturveränderung dargestellt werden, die der in Gl. (3.21) entspricht.

$$\Delta T = [N_{df} c_v^{df}]^{-1} \Delta E_{kin} \quad (3.23)$$

Daraus ergibt sich unter Berücksichtigung der Gl. (3.20)-(3.23) folgender Ausdruck für den Einstellungsfaktor λ :

$$\lambda = \sqrt{1 + c_v^{df} \left(\frac{k_B}{2} \right)^{-1} \Delta t \tau_T^{-1} \left(\frac{T_0}{T(t)} - 1 \right)} \quad (3.24)$$

Analog dazu kann durch die Kopplung an ein „Druckbad“ ein isobares Verhalten erzeugt werden, wobei die Teilchenpositionen und die Größe der Simulationsbox skaliert werden [12].

3.5.2 Einschränkung der Freiheitsgrade

Die höchste Frequenz, die für die korrekte Beschreibung der Systemeigenschaften notwendig ist, bestimmt die Wahl des MD-Zeitintervalls Δt .

$$\Delta t \ll \nu_{max}^{-1} \quad (3.25)$$

Ein Ansatz zur Verlängerung des MD-Zeitintervalls liegt daher in der Möglichkeit, hochfrequente Schwingungen wie z.B. Streck- oder Deformationsschwingungen „einzufrieren“, die bei der Untersuchung makromolekularer Systeme eine eher untergeordnete Rolle spielen. Gleichzeitig können bestimmte Abstände fixiert werden, die die Molekülbewegung insgesamt nicht signifikant beeinflussen. Allgemein sollte gewährleistet sein, dass die Kopplung zwischen den „eingefrorenen“ Freiheitsgraden und den verbleibenden nicht sonderlich stark ausgeprägt ist. Die Verwendung so genannter *constraints* verkürzt die Rechenzeit daher entscheidend.

Es sind verschiedene Methoden bekannt, die die Lösung der Bewegungsgleichungen unter Fixierung individueller Abstände erlauben. Der dieser Arbeit zugrunde liegende SHAKE-Algorithmus [115] eignet sich besonders gut für Makromoleküle, da die Distanzfixierungen iterativ behandelt werden. Ein gleich bleibender Abstand zwischen den Atomen i und j wird durch die Integration der Nebenbedingung⁸ in die Bewegungsgleichungen erreicht:

$$\sigma_k = r_{ij}^2 - d_{ij}^2 = 0 \quad (3.26)$$

⁸Diese Gleichung ist in einer numerischen Simulation nie exakt erreichbar, so dass ein bestimmter Schwellenwert ϵ definiert werden muss, ab dem die Gleichung als erfüllt anzusehen ist: $\sigma_k = \frac{(r_{ij}^2 - d_{ij}^2)}{d_{ij}^2} < \epsilon$

$$m_i \frac{d^2 \mathbf{r}_i(t)}{dt^2} = \underbrace{\frac{\partial}{\partial \mathbf{r}_i} V(\mathbf{r}_i(t))}_{\mathbf{F}_i(t)} + \underbrace{\frac{\partial}{\partial \mathbf{r}_i} \sum_{k=1}^{N_c} \lambda_k(t) \sigma_k(\mathbf{r}_i(t))}_{\mathbf{G}_i(t)} \quad (3.27)$$

mit $\mathbf{r}_i = \mathbf{r}_i' - \delta \mathbf{r}_i$

- $\mathbf{r}_i' \equiv$ Position des i-ten Teilchens nach einem MD-Simulationsschritt ohne Berücksichtigung von Nebenbedingungen
- $\delta \mathbf{r}_i \equiv$ Korrektur der Ortskoordinaten des i-ten Teilchens aufgrund der Nebenbedingungen
- $\lambda_k \equiv$ Lagrangescher Multiplikator
- $N_c \equiv$ Anzahl der Nebenbedingungen (Abstandsfixierungen)

Der erste Term in Gl. (3.27) stellt die unbeschränkte Kraft $\mathbf{F}_i(t)$ dar, wohingegen $\mathbf{G}_i(t)$ die Einschränkungen berücksichtigt. $\mathbf{G}_i(t)$ kompensiert dabei die Komponente von $\mathbf{F}_i(t)$ entlang der Bindungsrichtung. Der Ablauf des SHAKE-Algorithmus ist in Abb.(3.4) verdeutlicht.

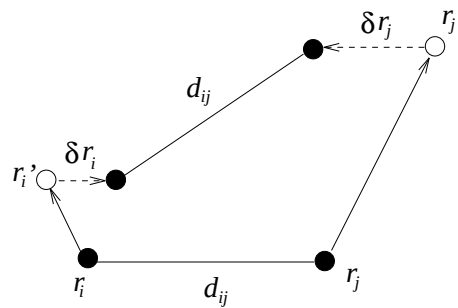


Abb. 3.4: Graphische Darstellung des SHAKE-Algorithmus [68]

Zunächst erfolgt dabei die Lösung der Bewegungsgleichungen ohne äußere Einschränkungen ($\mathbf{r}_i \rightarrow \mathbf{r}_i'$). Unter Berücksichtigung von $\mathbf{G}_i(t_n)$ ergibt sich aus Gl. (3.17) zusammen mit Gl. (3.18):

$$\delta \mathbf{r}_i = m_i^{-1} \mathbf{G}_i(t_n) (\Delta t)^2 \quad (3.28)$$

Setzt man den Teil für $\mathbf{G}_i(t)$ aus Gl. (3.27) in Gl. (3.28) ein, so ergibt sich die Ortskorrektur für den *leap-frog*-Algorithmus:

$$\delta \mathbf{r}_i = -2m_i^{-1} (\Delta t)^2 \sum_{k=1}^{N_c} \lambda_k(t) \mathbf{r}_{ij}(t) \quad (3.29)$$

Die Summe in Gl. (3.29) berücksichtigt lediglich die Abstandsfixierung des Atoms i . Aus diesem Grund müssen Korrekturen entlang des Vektors $\mathbf{r}_{ij}$ erfolgen, die für die Atome i und j jeweils in entgegengesetzter Richtung verlaufen. Daraus resultiert für die Abstandsfixierung:

$$\left[\mathbf{r}'_i + \delta \mathbf{r}_i - \mathbf{r}'_j - \delta \mathbf{r}_j \right]^2 = d_{ij}^2 \quad (3.30)$$

Damit ergibt sich ein System von $N - C$ quadratischen Gleichungen, die zur Bestimmung der Lagrangeschen Multiplikatoren herangezogen werden können. Unter Vernachlässigung der quadratischen Terme in λ_k geht Gl. (3.30) in eine lineare Form über. Die anschließende Behandlung der Nebenbedingungen erfolgt nacheinander und wird iterativ sooft wiederholt, bis sich alle Nebenbedingungen innerhalb eines spezifischen Toleranzbereichs befinden.

Durch den Einsatz von Abstandsfixierungen lässt sich der Rechenaufwand erheblich reduzieren. Gelegentlich kann es jedoch zu Konvergenzproblemen kommen. Eine Übertragung dieses Verfahrens auf Bindungswinkel sollte hingegen vermieden werden, da sich gezeigt hat, dass sie die Molekülbewegung signifikant beeinflussen [117].

Das im bisherigen Verlauf dieses Abschnitts beschriebene Verfahren stellt einen sehr rigiden Eingriff dar, da es dem System nicht erlaubt, sich außerhalb der vorgegebenen Nebenbedingungen zu entwickeln. Eine alternative Möglichkeit besteht in der Addition zusätzlicher Terme im Kraftfeld, die die Bevorzugung bestimmter Konfigurationen unterstützen, diese jedoch nicht zwingend vorschreiben. Im Gegensatz zu dem „constraining“ wird diese Vorgehensweise als „restraining“ bezeichnet. Ein häufig während der Equilibrierungsphase angewandtes Verfahren stellt das „position restraining“ dar. Dabei wird die Bewegung bestimmter Atomgruppen mit Hilfe eines zusätzlichen harmonischen Potenzials eingeschränkt. Entsprechend der Größe der zu wählenden Kraftkonstante können so bestimmte Teilchenpositionen über individuelle Zeiträume bevorzugt bzw. gänzlich fixiert werden:

$$V_{pr}(\mathbf{r}_i, \mathbf{r}_i^0) = \sum_{i=1}^{N_{pr}} \frac{1}{2} K_{pr} (\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_i^0)^2 \quad (3.31)$$

N_{pr} = Zahl der festgehaltenen Atome

K_{pr} = Kraftkonstante des harmonischen Oszillators

$\mathbf{r}_i$ = Aktuelle Position des Atoms i

$\mathbf{r}_i^0$ = Referenzposition des Atoms i

Ebenso können bestimmte bevorzugte Abstände zwischen individuellen Atomen realisiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit kommt dabei insbesondere das Verfahren des „distance restraining“ zur Verstärkung von Wasserstoffbrückenbindungen zum Einsatz. Analog zu Gl. (3.31) erfolgt dabei die Addition eines harmonischen Terms:

$$V_{dr}(r_{ii'}, r_{ii'}^0) = \sum_{i=1}^{N_{dr}} \frac{1}{2} K_{dr} (r_{ii'} - r_{ii'}^0)^2 \quad (3.32)$$

N_{dr} = Zahl der festgehaltenen Abstände

K_{dr} = Kraftkonstante des harmonischen Oszillators

$r_{ii'}$ = Aktueller Abstand zwischen den Atomen i und i'

$r_{ii'}^0$ = Referenzabstand zwischen den Atomen i und i'

3.5.3 Die Behandlung weitreichender Wechselwirkungen

Wie bereits bei der Diskussion des Kraftfeldansatzes beschrieben wurde, berücksichtigt der letzte Term in Gl. (3.3) die nichtbindenden Wechselwirkungen zwischen den Atomen. Dabei wird über alle Atompaare des Systems eine Summe gebildet, die proportional zum Quadrat der vorhandenen Teilchen (N^2) in der Simulationsbox ist. Durch die Verwendung von *cutoff*-Radien lässt sich die Anzahl der zu berücksichtigenden Atome einschränken und damit die Rechenzeit verkürzen. Dies kann jedoch zu Problemen bei der Behandlung von Potenzialen führen, die mit zunehmender Entfernung nur langsam abnehmen, wie z.B. den Coulomb-Wechselwirkungen. Besonders im Zusammenhang mit den periodischen Randbedingungen und der *minimum-image*-Konvention treten Schwierigkeiten bei der Berücksichtigung von Potenzialen auf, deren Wirksamkeit sich in der Größenordnung der Boxlänge bewegt.

Zu diesem Zweck sind verschiedene Ansätze entwickelt worden, die mit Hilfe von Näherungen versuchen, diese Problematik zu umgehen [20][117][11]. Im Folgenden werden die dieser Arbeit zugrunde liegenden Modellannahmen eingehender vorgestellt.

Neutrale Atomgruppen

Das Prinzip neutraler Atomgruppen beruht auf dem Ansatz der Annäherung der Ladungsverteilung innerhalb einer endlich großen Gruppe von Atomen durch eine Multipolentwicklung [117]. Die Wechselwirkungen zweier dieser Gruppen kann

dabei durch ein Produkt von Multipolentwicklungen beschrieben werden. Die resultierenden Terme weisen eine verschiedenartige Abhängigkeit bzgl. des Abstandes der berücksichtigten Gruppen auf. Monopol-Monopol-Wechselwirkungsterme verhalten sich proportional zu r^{-1} , wohingegen Monopol-Dipol eine Proportionalität zu r^{-2} , Dipol-Dipol eine zu r^{-3} aufweisen [69].

Die Zusammenstellung der Ladungsgruppen (*charge-group*) erfolgt in der Weise, dass die Summe ihrer Atomladungen null ergibt. Dadurch erhält der Hauptterm, der die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen diesen Gruppen dominiert, den Charakter eines Dipols. Dementsprechend ist seine effektive Reichweite wie oben beschrieben proportional zu r^{-3} . Die Wechselwirkungen der einzelnen Atome bleiben solange unberücksichtigt, wie der Schwerpunkt der Ladungsgruppe die *cutoff*-Grenze nicht überschreitet. Ansonsten müssen die wirksamen elektrostatischen Kräfte für alle Atome der betreffenden Gruppe neu berechnet werden.

Die Methode der Doppelradien

Durch die Verwendung dielektrischer Modelle wurde in den Anfangsjahren der Simulation großer Biopolymersysteme die Beschreibung von Lösungsmittel- sowie Ioneneinflüssen ermöglicht. Der Einsatz zumeist abstandsabhängiger Dielektrizitätskonstanten konnte jedoch nur grob das reale Systemverhalten widerspiegeln. Mit der stetig steigenden Leistung moderner Computersysteme nahm man jedoch zunehmend Abstand von diesem Ansatz und ging dazu über, sowohl Ionen als auch Lösungsmittelmoleküle explizit zu berücksichtigen.

Das in dieser Arbeit angewandte *twirange*-Verfahren (Doppelradienmethode) stellt neben anderen, wie z.B. *shift-Funktionen*, der *Ewald-Methode*, oder auch der *Reaktionsfeldmethode*, eine Möglichkeit zur Modellierung der langreichweitigen Wechselwirkungen dar [50][89]. Die Abb. 3.5 verdeutlicht schematisch den zugrunde liegenden Ansatz.

Die Aufteilung der Atome erfolgt dabei in zwei Gruppen, deren Zuordnung vom Abstand zum Zentralatom i abhängt. Die primären Nachbaratome befinden sich in einem Abstand r_p , die in eine Nachbarschaftstabelle aufgenommen werden. Die sekundären residieren in einem Abstand zwischen r_p und r_c . Ihre weitreichenden Kräfte auf das Atom i werden berechnet und gespeichert. Dementsprechend groß muss der äußere Radius gewählt werden. Die Berücksichtigung der weitreichenden Wechselwirkungen wird dabei in jedem Simulationsschritt in zwei Kategorien aufgeteilt. So werden die Wechselwirkungen zwischen den primären Nachbarn und dem Atom i stets aus den tatsächlichen Atomlagen berechnet, wohingegen die der

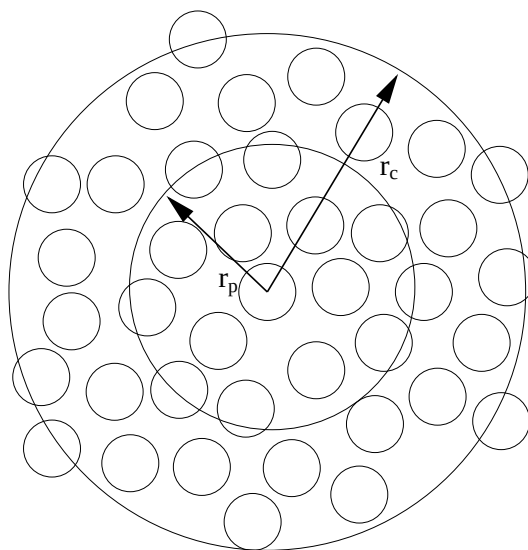


Abb. 3.5: Doppelradienmethode [68]

sekundären Nachbarn über einen gewissen Zeitraum als konstant angesehen werden. Ihre Werte werden nur ca. alle zehn Zeitschritte aktualisiert. Die Vernachlässigung schneller Schwingungsbewegungen (≤ 0.2 ps)) zusammen mit der Modellvorstellung einer konstanten Krafteinwirkung über einen bestimmten Zeitraum führt zu einer Reduzierung der benötigten Rechenzeit.

3.5.4 Optimierung der Geometrie

Die Untersuchung der Energiehyperfläche von Biopolymeren erweist sich, aufgrund der Vielzahl vorhandener Freiheitsgrade im Molekül, als äußerst komplexe Aufgabe. Der Ansatz des *molecular modelling* besteht jedoch gerade im Auffinden energetisch optimierter Strukturen, also Konfigurationen möglichst geringen Energieinhalts. Da die Lokalisierung des absoluten Minimums in der Realität praktisch unmöglich ist, muss man sich auf das Auffinden lokaler Minima beschränken [79].⁹

Die in einer MD-Simulation verwendeten Algorithmen reagieren sehr sensibel auf energetisch ungünstige Konfigurationen. Insbesondere führen heftige Energiefluktuationen zu Konvergenzproblemen, teilweise sogar zu Abbrüchen der Simulation. Besonders anfällig dafür ist der bereits beschriebenen SHAKE-Algorithmus. Dementsprechend kommt der Auswahl einer geeigneten Startstruktur, verbunden mit einer angemessenen Equilibrierungsphase, besondere Aufmerksamkeit zu.

⁹Die Beurteilung der Güte eines Minimums ist mit Hilfe der MD-Simulation nicht möglich. Seine Lage hängt in hohem Maße von der gewählten Startstruktur ab.

Das bereits geometrioptimierte Makromolekül¹⁰ wird in der Simulationsbox platziert und eine entsprechende Anzahl von Wassermolekülen hinzugefügt, die den restlichen Raum ausfüllen.

Im nächsten Schritt muss die zunächst ungünstige Anordnung der Solvensteilchen korrigiert werden. Zu diesem Zweck wird das zentrale Biopolymer festgehalten. In einer kurzen Simulationsphase werden die umgebenden Wassermoleküle hinsichtlich ihrer Position energetisch minimiert. Erst jetzt kann mit der eigentlichen Durchsuchung der Hyperfläche des gesamten Systems begonnen werden.

Es existieren unterschiedliche mathematische Ansätze, deren Hilfe das Auffinden lokaler Minima erlaubt [1][43]. Die wohl bekanntesten unter ihnen sind die Verfahren des *steepest descent* (steilster Abstieg) und des *conjugate gradient*. Das Erstgenannte verfolgt den Weg des negativsten Gradienten der potenziellen Energie, indem jeweils ein Inkrement in dieser Richtung addiert wird. Diese Vorgehensweise bietet den Vorteil, dass verschiedenste Konfigurationen mit großen Energieunterschieden sehr schnell untersucht werden, dabei jedoch häufig über „das Ziel hinausgeschossen wird“, was zu einem teilweise sehr langsamen Konvergenzverhalten führt. Ein intelligenteres Vorgehen liegt dem *conjugate gradient* zugrunde, der nicht nur den aktuellen Gradienten berücksichtigt, sondern zusätzlich auch das Ergebnis des vorherigen Schrittes zur Entscheidung heranzieht. Das beobachtete Konvergenzverhalten ist zielstrebig, der Rechenaufwand für einen einzelnen Schritt jedoch höher. Häufig wechselt man nach einem anfänglichen „steilsten Abstieg“ im Nahbereich des Konvergenzkriteriums zu dem „intelligenteren“ Verfahren, um möglichst schnell eine optimierte Struktur zu erhalten.

3.5.5 Trajektorienanalyse

Gegenüber dem weitestgehend standardisierten Vorgehen bei der Molekulardynamischen Simulation ist die Analyse der erhaltenen Trajektorien sehr stark von den jeweils zugrunde liegenden Systemen abhängig. Aus der Fülle an Informationen, die durch die Sammlung von Momentaufnahmen angehäuft wird, sind vielfältige strukturelle, dynamische aber auch energetische Rückschlüsse möglich.

Für ergodische Systeme lassen sich beispielsweise durch die Bildung von Mittelwerten bestimmte physikalische Werte ableiten (siehe auch Gl. (3.1)-(3.2)). Diese können sich auf kinetische oder auch potenzielle Energietерme ebenso beziehen wie

¹⁰Falls Messergebnisse aus Röntgenstrukturuntersuchungen vorhanden sind, kann eine entsprechende PDB-Datei Datenbanken entnommen werden. Ansonsten erfolgt die Geometrieoptimierung zunächst beschränkt auf das einzelne Makromolekül.

auf geometrische Abstände und Winkel innerhalb spezieller Molekülbereiche. Die Betrachtung mittlerer Temperaturen oder Drücke erlaubt zusätzlich eine differenziertere Interpretation der Ergebnisse gegenüber experimentellen Daten.

Die Stabilität bestimmter Konformationen kann durch die Berechnung von rms-Werten¹¹ beurteilt werden. Diese spiegeln die Fluktuationen ausgewählter Atome bzgl. einer Referenzstruktur wider. Die Quadratwurzel aus der mittleren quadratischen Abweichung wird anhand der Ortsvektoren berechnet, die sich aus einer möglichst guten Überlagerung der zu vergleichenden Strukturen ergeben.¹²

$$rms = \sqrt{\sum_{i=1}^{N_s} \frac{[\mathbf{r}(i, t) - \mathbf{r}(i, 0)]^2}{N_s}} \quad (3.33)$$

- $\mathbf{r}(i, t) \equiv$ Ortsvektor des Atoms i zur Zeit t
- $\mathbf{r}(i, 0) \equiv$ Ortsvektor des Atoms i in der Referenzstruktur
- $N_s \equiv$ Gesamtzahl der ausgesuchten Atome

Wichtige Informationen hinsichtlich der Dynamik einzelner Systemkomponenten sowie der Verteilung von Solvensteilchen innerhalb bestimmter Volumenelemente lassen sich mit Hilfe von Korrelationsfunktionen gewinnen.

Hier spielt insbesondere die Zeit-Autokorrelationsfunktion eine wichtige Rolle, da sie einen Zugang zur Ermittlung von Diffusionskoeffizienten eröffnet, die sowohl translatorische als auch rotatorische Bewegungen quantifizieren und experimentell durch Streulichtuntersuchungen zugänglich sind [57][17].

$$\begin{aligned} C(\tau) &= \langle A(0)A(\tau) \rangle \\ &= \frac{1}{T} \int_0^T A(t)A(t + \tau) dt \end{aligned} \quad (3.34)$$

Strukturelle Eigenschaften lassen sich durch die Paarkorrelationsfunktion beschreiben, die häufig auch als radiale Verteilungsfunktion bezeichnet wird.

$$\begin{aligned} g(r) &= \frac{1}{\rho^2} \langle \rho(0)\rho(\mathbf{r}) \rangle \\ &= \frac{V}{N^2} \left\langle \sum_i \sum_{j \neq i} \delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}_{ij}) \right\rangle \end{aligned} \quad (3.35)$$

¹¹root mean square deviation

¹²Die Summe der Abstände zwischen den einzelnen Atomen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Simulation wird minimiert.

- $\rho \equiv$ Teilchendichte des reinen Wassers
- $V \equiv$ Volumen
- $N \equiv$ Teilchenzahl

Sie stellt ein Maß für die Wahrscheinlichkeit dar, zwei Atome in einem bestimmten Abstand r zueinander in Bezug auf eine homogene Verteilung zu finden. Die Ergebnisse einer solchen Untersuchung können mit Werten aus Neutronen- oder Röntgenstreuexperimenten verglichen werden.

Durch die Integration der Funktion $g(r)$ entsprechend Gl. (3.36) erhält man die Anzahl der Teilchen, die sich im Abstand r zum untersuchten Atom befinden [51].

$$n(r) = 4\pi\rho \int_0^r g(r)r^2 dr \quad (3.36)$$

Integriert man bis zum ersten Minimum r_{min1} , so ergibt $n(r_{min1})$ die Koordinationszahl des untersuchten Teilchens hinsichtlich der ersten Hydratschale.

Kapitel 4

Simulationsdurchführung

Die Simulation der Quadruplexstrukturen wurde mit Hilfe des GROMOS-Programmpakets¹ durchgeführt [116], das speziell für die Simulation von Biopolymeren entwickelt wurde. Es zeichnet sich aus durch eine Vielzahl unterschiedlichster, modular aufgebauter Routinen, die Möglichkeiten zur Simulation von DNA- und RNA-Systemen, Abspeicherung der Trajektorien sowie Analyse der generierten Daten bereitstellt. Diese können für die Untersuchung „normaler“, doppelhelikaler Strukturen direkt eingesetzt werden. „Ungewöhnliche“ Polynukleotid-Konformationen, zu denen insbesondere auch die im Zentrum dieser Arbeit stehenden Quadruplexstrukturen zählen, bedürfen jedoch individueller Anpassungen im Quellcode der Software. Nur so lassen sich stabile Simulationen durchführen und spezielle Fragestellungen analysieren.

Die MD-Routinen wurden modifiziert [113], um eine schrittweise Erhöhung der cutoff-Radien, Relaxationszeiten sowie die Vergrößerung der Zeitschritte zu ermöglichen. Insbesondere musste für die Berechnungen auf Computersystemen der Fa. Hewlett Packard eine doppelte Genauigkeit (real*8) der verwendeten Variablen deklariert werden, da ansonsten besonders während der Equilibrierungsphase Abbrüche auftraten, die auf Rundungsfehler zurückzuführen waren.

Die zumeist mehrere Gigabyte umfassenden Trajektorien wurden zunächst in binärer Form abgespeichert und zur weiteren Untersuchung bereitgehalten.

Für die Auswertung der Systeme mit vier DNA- bzw. RNA-Strängen sowie interkalierten Kationen und umgebender „Wasserbox“ war es notwendig, umfangreiche Analyseroutinen zu entwickeln. Neben den bereits existierenden Anpassungen [113], die weiter verfeinert und mit Schnittstellen versehen wurden, mussten große Teile der für die Systemanalyse benötigten Programme auf Basis von Fortran 77 eigenständig entwickelt werden. Dieses umfasste sowohl die Bereiche der Visualisierung

¹GRONINGEN MOLECULAR SIMULATION COMPUTER PROGRAM PACKAGE

von Strukturen (als statisches Bild sowie als Filmsequenz), der Untersuchung geometrischer Aspekte als auch der Analyse spezieller Verteilungsmuster und Aufenthaltszeiten einzelner Systemkomponenten (Hydrathülle, Ionen).

4.1 Das Ablaufschema der MD-Simulation

Die Abb. 4.1 verdeutlicht den prinzipiellen Ablauf der MD-Simulation.

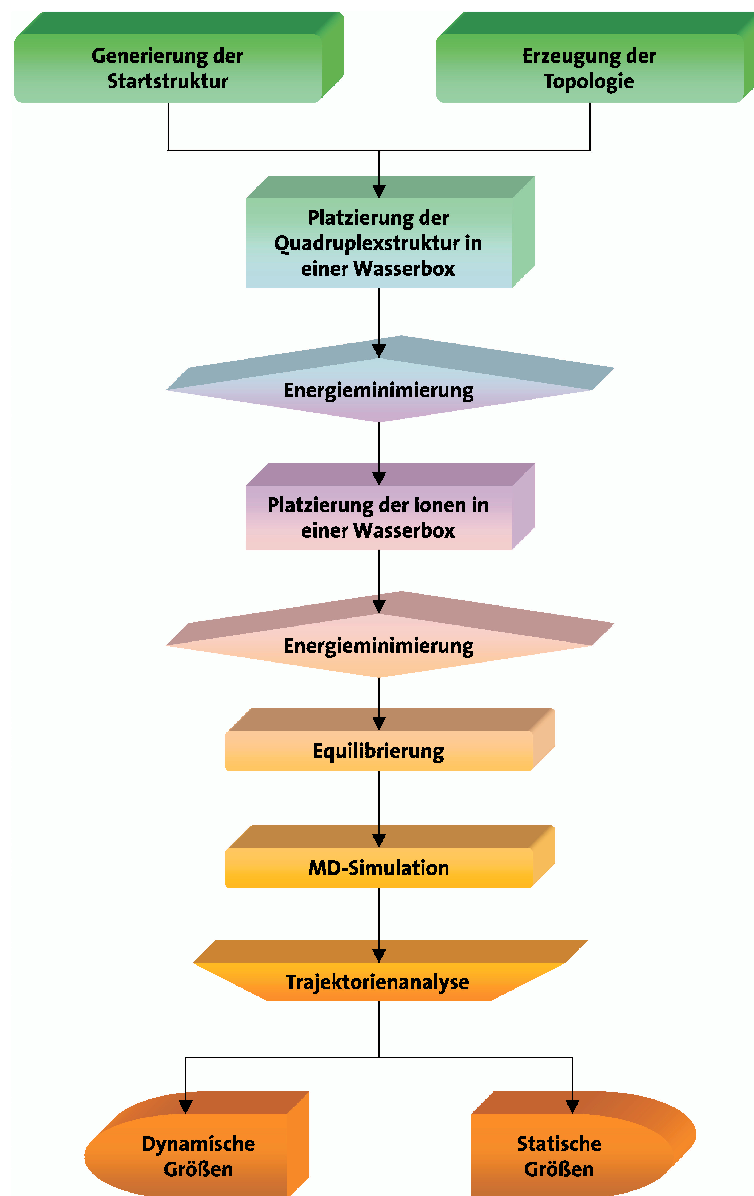


Abb. 4.1: Ablaufschema der MD-Simulation mit anschließender Trajektorienanalyse

Zunächst erfolgt die Generierung einer Startstruktur bzw. der Zugriff auf Datenbankinformationen, die in ein Format konvertiert werden müssen, das von GROMOS gelesen werden kann. Parallel dazu benötigt man eine Topologie, die Verknüpfungen zwischen den Atomen sowie entsprechende Kraftfeldparameter (vgl. Gl.(3.3)) enthält, die über den gesamten Simulationszeitraum unverändert bleiben. Diese Datei bestimmt maßgeblich die auftretenden Wechselwirkung zwischen allen Atomen während der Simulation. Im Anschluss wird das zentrale Biopolymer inklusive der interkalierten Ionen in einer Wasserbox platziert, wobei die Solventteilchen entfernt werden, die sich innerhalb eines bestimmten Abstands zu den Strangatomen befinden. Unter Fixierung des Quadruplexes und der Kationen wird die umgebende dann Solvathülle energieminiert. Im folgenden Schritt tauscht man einzelne Wassermoleküle gegen die restlichen Ionen aus, die zum Erreichen der Elektroneutralität notwendig sind, und führt eine erneute Energieminimierung der Bereiche außerhalb des Biopolymers durch, um die ungünstige Anordnung der Kationen zu den H₂O-Molekülen zu korrigieren. Die sich anschließende Equilibrierungsphase schafft unter sukzessiver Reduzierung der von außen angelegten „restraints“ die energetischen Voraussetzungen für eine nachfolgende stabile Simulationsphase. Nach Abschluss der Produktionsphase lassen sich die gesammelten Informationen hinsichtlich dynamischer oder statischer Größen auswerten.

4.2 Startstruktur und Topologie

4.2.1 Quadruplexe aus DNA- bzw. RNA-Strängen

Der Zugang zu geeigneten Grund- bzw. Startstrukturen für die Simulation von Quadruplexen kann auf verschiedene Arten geschaffen werden.

- Viersträngige Quadruplexstrukturen können mit *quadgen*, einem von J.Töhl entwickelten Programm, aufgebaut werden [113].
- Spezielle Datenbanken enthalten Atomkoordinaten, die auf Röntgenstrukturuntersuchungen entsprechender Systeme basieren (z.B. **Protein Data Bank**, die auf einem weit verbreiteten Datenformat zur Darstellung der Ortskoordinaten nicht nur von Biomolekülen beruht (PDB-Format)). Quadruplexstrukturen stehen jedoch lediglich in geringer Anzahl zur Verfügung.
- Mit kommerziellen Programmen, wie z.B. Hyperchem [1] lassen sich Makromoleküle (DNA-Stränge wie auch Proteinstrukturen) aufbauen. Diese bieten jedoch nicht die Möglichkeit, direkt viersträngige Quadruplexstrukturen zu generieren.

Das Aufbauprogramm *quadgen* [113]

Die Basiseinheit wird gebildet durch ein G-Quartett, dessen Struktur der PDB entnommen wird. Es beruht auf NMR und „restraint“ MD-Untersuchungen an dem System d[TTGGGGT]₄. Die Hauptträgheitsachse dieses Quartetts wird in die z-Achse des Koordinatensystems gelegt und weitere Tetramereinheiten desselben Typs unter Benutzung eines festgelegten helikalen Winkels $\alpha = 30^\circ$ und einer Verschiebung von 3,4 Å entlang der z-Achse hinzugefügt.² Die auf diese Weise generierten Quadrupele stellen energetisch keine ideale Anordnung dar, da insbesondere die Phosphor-Sauerstoff-Abstände (P-O3*) im Rückgrat (2,4 Å) noch nicht den gewünschten Kriterien entsprechen (1,61 Å). Die Korrektur erfolgt durch eine Optimierung der Phosphodiesterbrücken unter Festhalten („position restraining“) der Basenatome entsprechend des Verfahrens des *steepest descent* [72].

Um die endgültige Startstruktur zu erhalten, wird eine mittlere Quartetteinheit als neue Basis entnommen und ein erneuter Durchlauf des *quadgen*-Programms entsprechend der oben genannten Vorgehensweise gestartet. Daraus resultiert letztendlich ein P-O3*-Bindungsabstand von 1,56 Å.

4.2.2 Konvertierung des Formats und Topologierzeugung

Die bereits im Vorfeld angesprochene Topologiedatei enthält neben Informationen zu den Verknüpfungen (Bindungen) der Teilchen zusätzlich festgeschriebene Winkel, Massen und Kraftfeldparameter aller im System vorhandenen Atome. Diese Daten ändern sich während der Simulation nicht und müssen aufgrund ihrer Menge binär abgespeichert werden.

Das benutzte Simulationspaket stellt zu diesem Zweck entsprechende Routinen bereit, die sich jedoch direkt nur zur Erzeugung von Topologien ein- bzw. zweisträngiger Strukturen eignen. Dementsprechend ist es notwendig, die Daten zweier Doppelstränge miteinander zu verknüpfen. Der Aufbau erfolgt aus so genannten „molecular topology building blocks“, zumeist Untereinheiten aus Nukleotiden, die hinsichtlich der Verwendung als endständige Gruppen modifiziert werden müssen ($\text{PO}_3 \rightarrow \text{OH}$). Eine weiterführende Beschreibung ist in [113] zu finden.

Eine Voraussetzung für die spätere reibungslose Simulation ist die identische Anordnung der Atome in Topologie- und Atomkoordinatendatei. Gleichzeitig benötigt man zumeist für die Visualisierung von Strukturen die Daten im PDB-Format.

²Quadrupele, die zusätzlich Thymin- oder Uracileinheiten beinhalten, werden nach den gleichen Prinzipien aufgebaut, wobei geometrische Unterschiede im Bereich der „backbone“-Verknüpfungen sowie der Anordnung der Basen zu berücksichtigen sind.

Zu diesem Zweck werden bereits vorhandene Konvertierungsprogramme [113] für den Einsatz im Rahmen dieser Arbeit verfeinert, die den flexiblen Wechsel vom GROMOS-Format hin zu dem der Protein Data Bank ermöglichen.

4.2.3 Spezielle Erweiterungen des Kraftfeldes

Das originale GROMOS-Kraftfeld beschränkt sich auf insgesamt 37 verschiedene Atomtypen [116].³ Im Rahmen dieser Arbeit werden jedoch insbesondere die Auswirkungen spezieller, interkalierter Ionentypen auf die Dynamik von Quadruplexen untersucht. Dementsprechend findet eine von J. Töhl modifizierte Datei Verwendung [113], die die Lennard Jones-Parameter der fehlenden Alkali- und Erdalkalitionen auf der Basis von Literaturangaben enthält.

Auswahl des Wassermodells

Wie bereits mehrfach betont wurde, besitzt die Wechselwirkung des Wassers mit den zentralen Nukleotidsträngen eine eminente Bedeutung hinsichtlich Stabilität und Dynamik des Gesamtsystems. Die implizite Berücksichtigung von Abschirmungseffekten durch das Lösungsmittel unter Verwendung konstanter oder auch abstandsabhängiger Dielektrizitätszahlen führt meist zu Ergebnissen, die das reale Systemverhalten nur eingeschränkt wiedergeben [79]. Insbesondere im Fall der vorliegenden Makromoleküle mit zahlreichen polarisierten und geladenen Atompositionen ist die explizite Berücksichtigung der Wassermoleküle unumgänglich. Die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen Solvensmolekülen und speziellen Bereichen des Quadruplexes führt dabei zu einer möglichst realitätsnahen Beschreibung des Systems [71].

Das in dieser Arbeit verwendete SPC/E⁴-Modell stellt ein starres Dreizentrenmodell mit einer OH-Bindungslänge von 1 Å und tetraedischem HOH-Winkel dar. Das Zentrum der Lennard-Jones-Wechselwirkungen liegt am Sauerstoffatom. Die Berücksichtigung der elektrostatischen Wechselwirkungen erfolgt durch Punktladungen, die auf alle drei Atome verteilt sind ($q_O/e = -0.8476$, $q_H/e = 0.4238$) [10].

³Lediglich die Parameter für Natrium-, Magnesium- und Calciumionen sind aus dem Bereich der Kationen implementiert.

⁴Simple Point Charge Extended

4.3 Platzierung der DNA/Ionen in der Wasserbox

Die zuvor generierte Quadruplexeinheit (einschließlich der sich zwischen den Quartettebenen sowie im Bereich der Strangenden befindlichen Ionen) wird in eine mit Wassermolekülen aufgefüllte Simulationsbox eingefügt, deren Verteilung durch ein Monte-Carlo-Verfahren festgelegt wurde. Dabei werden die Solvensmoleküle entfernt, deren Abstand zu den Strangatomen weniger als $2,3 \text{ \AA}$ beträgt.

Die Simulationsbox besitzt die Form eines abgekappten Oktaeders⁵ (siehe Abb. 4.2). Durch das Abschneiden der Ecken eines Oktaeders ergibt sich ein halbiertes

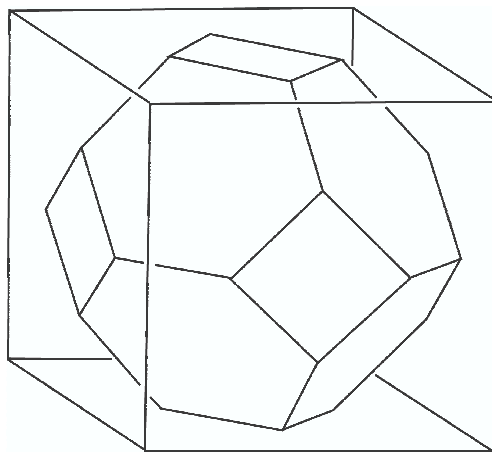


Abb. 4.2: Abgekappter Oktaeder als Simulationsbox im Vergleich zum entsprechenden Würfel

Volumen im Vergleich zu einem entsprechenden Würfel. Die gegenüberliegenden Sechseckflächen besitzen dabei das $\frac{1}{2}\sqrt{3}$ -fache des Abstandes der gegenüberliegenden quadratischen Flächen [117]. Der entscheidende Vorteil in der Verwendung einer solchen Simulationsumgebung liegt in der erheblichen Reduzierung der Rechenzeit, da sich die Anzahl der zu berücksichtigenden Wassermoleküle praktisch halbiert.⁶ Die zunächst ungünstigen Wechselwirkungen zwischen DNA und umgebenden Wassermolekülen werden durch eine Energieminimierung mit Hilfe des Verfahrens des *steepest descent* optimiert.

Der sich anschließende Austausch von Wassermolekülen gegen Kationen schafft die Elektroneutralität des Gesamtsystems. Dabei wird das Solvensmolekül mit dem negativsten elektrostatischen Potenzial (bezogen auf sein Sauerstoffatom) durch ein

⁵Prinzipiell eignen sich alle geometrischen Figuren, die den kompletten Raum durch fortgesetztes Hinzufügen gleichartiger Einheiten auszufüllen vermögen.

⁶Die zu berechnenden Paarwechselwirkungen sind proportional zu N^2 .

Ion ersetzt. Dieses Vorgehen wird so oft wiederholt, bis alle Kationen verteilt sind. Dadurch gewährleistet man eine Ionenverteilung, die sich in der Nähe des Gleichgewichtszustandes befindet.

Eine erneute Energieminimierung mit Hilfe des Verfahrens des *conjugate gradient* [72] schließt den Bereich der Teilchenpositionierung in der Simulationsbox ab.

4.4 Equilibrierungsphase

Die Equilibrierungsphase spielt für den sich anschließenden Zeitraum der Trajektorienproduktionsphase eine entscheidende Rolle. Innerhalb dieses Zeitbereichs wird eine Boltzmann-Verteilung der Teilchengeschwindigkeiten realisiert, die der gewünschten Temperatur entspricht und damit zu einer Gleichverteilung zwischen kinetischer und potenzieller Energie des gesamten Systems führt.

Die Tab. 4.1 zeigt exemplarisch die Vorgehensweise während der Equilibrierung der $d[GGGG]_4$ -Systeme auf. Man beginnt mit Zeitschritten der Größe 0,8 fs und erhöht schrittweise im weiteren Verlauf auf 2 fs, um Abbrüche im SHAKE-Algorithmus zu vermeiden. Gleichzeitig wird die Temperatur- bzw. Druckrelaxationszeit erhöht,

Nr.	Zahl der Zeitschritte	Größe des Zeitschrittes [ps]	Zeit [ps]	τ_t [ps]	τ_p [ps]	$k_{restraints}$ [kJ · mol ⁻¹ nm ⁻²]
1	10000	0.0008	8	0.01	0.05	5000
2	10000	0.0012	20	0.04	0.20	5000
3	10000	0.0016	36	0.07	0.35	5000
4	10000	0.0020	56	0.10	0.50	5000
5	1000	0.0020	58	0.10	0.50	5000 (nur Ionen)
6	5000	0.0020	68	0.10	0.50	0

Tabelle 4.1: Equilibrierungsschritte für alle $d[GGGG]_4$ -Systeme

was zu einer Verringerung der Kopplung an das Temperatur- bzw. Druckbad führt. Durch die Addition eines harmonischen Potentials im Kraftfeld fixiert man die Käfigionen⁷ sowie die DNA-Atome nahezu vollständig an ihrer ursprünglichen

⁷Dazu zählen ebenfalls die an den DNA-Enden außerhalb des Quadruplexes angesiedelten Kationen.

Position („position restraining“; siehe Gl. (3.31)). Während der sich über 56 ps erstreckenden Equilibrierung werden ausschließlich die Solvensmoleküle sowie die „bulk“-Ionen bzgl. ihrer Anordnung optimiert. Erst danach wird die Bewegung der Quadruplex-DNA vollständig freigegeben, wobei man die interkalierten Ionen weiterhin durch ein „künstliches“ Potenzial festhält. Die anschließende Phase von 10 ps schließt den Bereich der Equilibrierung ab. Sie zeichnet sich durch Bedingungen aus, die denen der eigentlichen Simulationsphase entsprechen. Alle Teilchen innerhalb der Simulationsbox bewegen sich nun ohne zusätzliche Potenzialverstärkungen. Ihre Bewegung wird allein durch die bindenden und nichtbindenden interatomaren Wechselwirkungen bestimmt.

Die Equilibrierungsschritte für die ausstehenden Systeme sind den Tab. A.4 und A.5 in Anhang A.1.2 auf S. 235f. zu entnehmen.

4.5 Übersicht der simulierten Systeme

Wie bereits in der Einleitung ausgeführt wurde, offenbaren zahlreiche NMR- und Röntgenstrukturuntersuchungen vielfältige strukturelle Details von Quadruplex-G-DNA. Die guaninreichen Oligonukleotide sind gekennzeichnet durch einen ausgeprägten Polymorphismus (intra- bzw. intermolekulare Assoziate; parallele bzw. antiparallele Stranganordnung), wobei die sich ausbildenden Konformationen entscheidend durch die Wahl der stabilisierenden Kationen beeinflusst werden.

In Erweiterung der experimentellen Methoden eignen sich MD-Simulationen, um den regulatorischen Einfluss dieser Kationen auf molekularer Ebene besser zu verstehen.

In dieser Arbeit wurden strukturelle und dynamische Aspekte des Tetraplex-verhaltens in wässriger Lösung anhand von d[GGGG]₄-Modellquadruplexen eingehend untersucht. Dabei konnten zum einen die Auswirkungen unterschiedlicher Erdalkaliionensorten hinsichtlich des Besetzungsmusters der Hohlräume sowie der Stabilitäten der Quadruplexe in einer homogenen Kationenumgebung studiert werden. Zum anderen ermöglichten die Simulationen von d[GGGG]₄-Systemen mit gemischten Ionensorten (interkalierte Alkali- sowie Erdalkaliionen im „bulk“) den Rückschluss auf die Ursachen konformativer Veränderungen der Tetraplexe infolge einer inhomogenen Ionenumgebung.⁸

Besonders im Hinblick auf die Anwesenheit verschiedener Ionensorten im Bereich der lebenden Zelle, stellt dieser Aspekt eine grundlegende Voraussetzung für das Verständnis der Stabilität von Quadruplexen in vivo dar, der maßgeblich durch den Kationentyp bestimmt wird.

⁸An dieser Stelle konnten insbesondere Effekte der miteinander konkurrierenden Kationen hinsichtlich Veränderungen der Tetraplexgeometrie auf molekularer Ebene verfolgt werden.

Zahlreiche Simulationen erlaubten, Rückschlüsse auf den Einfluss der äußeren Bedingungen hinsichtlich der individuellen Entwicklung der jeweiligen Trajektorie zu ziehen. Dabei konnte sowohl das Schmelzverhalten durch eine systematische Variation der Simulationstemperatur charakterisiert, als auch die Auswirkungen veränderter Geschwindigkeiten der interkalierten Kationen zu Beginn der Aufzeichnungsphase auf die resultierende Quadruplexkonformation beobachtet werden.

Auf Basis der gewonnenen Erkenntnisse wurde anschließend der Übergang von kurzsträngigen Guanin-Modell-Systemen hin zu realen, in der Natur vorkommenden Sequenzen vollzogen, die experimentell umfangreich untersucht wurden (siehe Abb. 4.3).

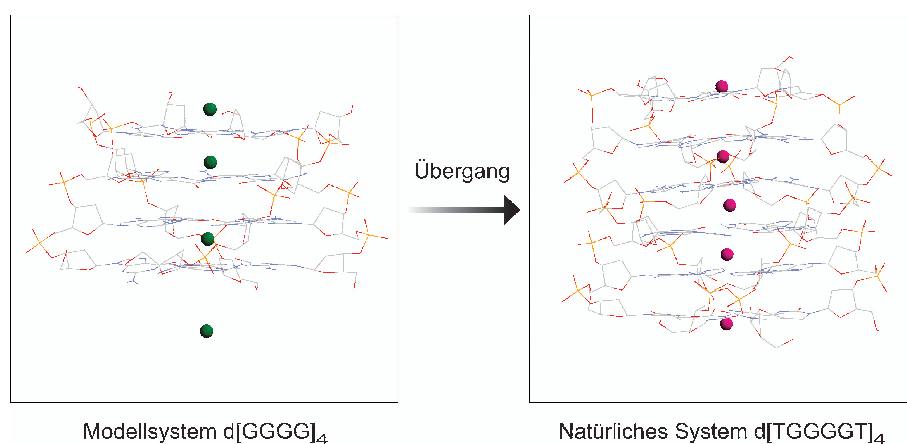


Abb. 4.3: Übergang vom Modellsystem zum natürlichen System; exemplarische Darstellung der Struktur von d[GGGG]₄/Mg sowie d[TGGGGT]₄/K nach Ende der Equilibrierungsphase

Dabei ermöglichte die gezielte Verlängerung der Strangsequenzen durch Thyminbasen, die Bedeutung dieser endständigen Purineinheiten im Hinblick auf die Stabilität des zentralen Guanin-Quadruplexes sowie des sich ausbildenden Besetzungsmusters zu verstehen.

Den Abschluss der Untersuchungen bildete die Simulation eines RNA-Systems r[UGGGGU]₄, der einen direkten Vergleich zu den vorausgehenden Studien der DNA-Quadruplexe erlaubte.

Die aus den Strangverlängerungen resultierende erhöhte negative Ladung des Quadruplexes musste zum einen durch die Zugabe zusätzlicher Kationen kompensiert werden. Zum anderen erforderte der gesteigerte Raumbedarf des Zentralkörpers die Vergrößerung der Simulationsbox, verbunden mit einer Anpassung der Anzahl an

Wassermolekülen. Dementsprechend stellten die Simulationen der „realen“ Systeme höchste Anforderungen an die vorhandenen Rechenkapazitäten.

Im Folgenden werden die simulierten Systeme kurz im Überblick vorgestellt. Die aufgeführten Tabellen beinhalten die Systembezeichnung⁹, Anmerkungen (sofern Besonderheiten beachtet werden müssen), die verwendete Ionensorte, das Besetzungsmuster zu Beginn der Equilibrierungsphase sowie die Gesamtsimulationsdauer.

1) d[GGGG]₄/Erdalkalitionen

Zunächst wurden Systeme untersucht, die in der Basis aus vier Guanin-Quartett-einheiten d[GGGG]₄ bestehen (siehe Tab. 4.2). Diese variieren hinsichtlich der in den Hohlräumen eingelagerten Kationensorte. In Anknüpfung an geleistete Vorarbeiten [68] (Kurzzeitsimulationen mit unterschiedlichen Erdalkalitionen) konnte die Simulationsdauer in dieser neuen Untersuchung wesentlich erhöht werden, um das Langzeitverhalten eingehender beobachten zu können.

System	Kationen	Besetzungsmuster	t_{sim} [ps]
d[GGGG] ₄ /Mg	Mg ²⁺	• • • •	1000
d[GGGG] ₄ /Ca ¹⁰	Ca ²⁺	• • • •	560
d[GGGG] ₄ /Sr	Sr ²⁺	• • • •	1000

Tabelle 4.2: d[GGGG]₄/Erdalkalitionen

2) d[GGGG]₄/K (Variation der Startbedingungen)

Daran anschließend erfolgte die Analyse von Alkali-Quadruplexsystemen, die auf den oben genannten Basensequenzen beruhen. Dabei wurden die Auswirkungen unterschiedlicher Startbedingungen auf die sich anschließende Simulation eines d[GGGG]₄/K-Systems durch eine gezielte Veränderung der anfänglichen Geschwindigkeiten der eingelagerten Kationen untersucht (siehe Tab. 4.3).

⁹Alternativ zur vollständigen Bezeichnung werden die verschiedenen Systeme im weiteren Verlauf durch das Symbol des dem Kation zugrunde liegenden Atoms abgekürzt, sofern eine Eindeutigkeit dadurch erhalten bleibt.

¹⁰Die Simulation dieses Systems erfolgte bereits in [68], die weitergehende Auswertung ist Teil dieser Arbeit.

System	Startbedingungen	Kationen	Besetzungsmuster	t_{sim} [ps]
d[GGGG] ₄ /K(1)	$v_x(K(1)-2)=0$	K ⁺	• • • •	200
d[GGGG] ₄ /K(2)	$v_{xyz}(K(2)-2)=0$	K ⁺	• • • •	200
d[GGGG] ₄ /K(3)	$v_{xyz}(K(3)-1,2,3,4)=0$	K ⁺	• • • •	200
d[GGGG] ₄ /K(4)	$v_{xyz}(K(4)-2,3,4) + 10\%$	K ⁺	• • • •	200
d[GGGG] ₄ /K(5)	$v_{xyz}(K(5)-2) + 20\%$ $v_{xyz}(K(5)-3) - 20\%$	K ⁺	• • • •	200

Tabelle 4.3: d[GGGG]₄/K(1) - d[GGGG]₄/K(5) (Geschwindigkeitsvariation der interkalierten Kationen)

3) d[GGGG]₄/Na (Temperaturvariation)

Ein in [68] charakterisierter d[GGGG]₄/Na-Quadruplex bildete die Grundlage einer Untersuchungsreihe, in der systematisch die Temperaturen innerhalb der Simulationsbox variiert wurden. So konnte der Temperatureinfluss auf die Stabilität bzw. das Schmelzverhalten dieses Modellsystems eingehend studiert werden (siehe Tab. 4.4).

System	Anmerkungen	Kationen	Besetzungsmuster	t_{sim} [ps]
d[GGGG] ₄ /Na(300)	$T_{sim} = 300$ K	Na ⁺	• • • •	530
d[GGGG] ₄ /Na(320)	$T_{sim} = 320$ K	Na ⁺	• • • •	530
d[GGGG] ₄ /Na(340)	$T_{sim} = 340$ K	Na ⁺	• • • •	500
d[GGGG] ₄ /Na(360)	$T_{sim} = 360$ K	Na ⁺	• • • •	350
d[GGGG] ₄ /Na(400)	$T_{sim} = 400$ K	Na ⁺	• • • •	350

Tabelle 4.4: d[GGGG]₄/Na(300) - d[GGGG]₄/Na(400) (Temperaturvariation)

4) d[GGGG]₄/K-Erdalkalitionen (Systeme mit gemischten Ionensorten)

Als Abschluss der Untersuchungen an d[GGGG]₄-Modellsystemen wurden die Auswirkungen einer nicht einheitlichen Ionensorte in der Simulationsbox auf das Quadruplex-Verhalten beobachtet. Hierbei handelte es sich um ein gemischtes System aus Kaliumionen im Kanalbereich sowie Erdalkalikationen in den äußeren Bereichen des Tetraplexes („bulk“) (siehe Tab.4.5).

System	Anmerkungen	Kationen	Besetzungsmuster	t _{sim} [ps]
d[GGGG] ₄ /K-Mg	Kaliumionen	K ⁺ -[Mg ²⁺]	• • • •	1080
d[GGGG] ₄ /K-Ca	interkaliert,	K ⁺ -[Ca ²⁺]	• • • •	1080
d[GGGG] ₄ /K-Sr	Erdalkalitionen im „bulk“	K ⁺ -[Sr ²⁺]	• • • •	1080

Tabelle 4.5: d[GGGG]₄/K-Mg, -Ca, -Sr

5) d[TGGGGT]₄/K

Der Übergang zu längeren, in der Natur vorkommenden Sequenzen erfolgte durch die Simulation von zwei d[TGGGT]₄/K-Systemen (siehe Tab. 4.6), die gegenüber den Modellsystemen an den Strangenden jeweils eine zusätzliche Thyminbase aufweisen.

Das Ziel der Untersuchung lag zum einen darin, die Einflüsse dieser Strangverlängerung auf die Stabilität des Quadruplexes charakterisieren zu können (Veränderung der Zugänglichkeit der zentralen Guanineinheiten).¹¹ Zum anderen wurde durch die Verstärkung der Wasserstoffbrückenbindungen („distance restraining“) in einer der beiden Simulationen „künstlich“ das Hoogsteen-Muster aufrecht erhalten (vergleiche dazu Abb. 5.18 aus S. 79). Dadurch konnten zusätzlich Erkenntnisse bzgl. des bevorzugten Besetzungsmusters (Wanderungsverhalten der Kationen entlang der Kanalachse) in Abhängigkeit von der „Kanalgeometrie“ gewonnen werden.

¹¹Im Unterschied zu Guanin-Quartetts (acht mögliche H-Brücken) sind die entsprechenden Thymin-Tetramere lediglich zur Ausbildung von vier Wasserstoffbrücken befähigt.

System	Anmerkungen	Kationen	Besetzungsmuster	t_{sim} [ps]
d[TGGGGT] ₄ /K		K ⁺	• • • • • •	920
d[TGGGGT] ₄ /K (d.r) ¹²	verstärkte H-Brücken	K ⁺	• • • • • •	920

Tabelle 4.6: d[TGGGGT]₄/K (mit und ohne „restraints“)6) d[TTGGGGTT]₄/K

Die Simulation zweier d[TTGGGGTT]₄/K-Systeme bildete den Abschluss der Studie von DNA-Quadruplexstrukturen (siehe Tab. 4.7).

Durch das Hinzufügen zusätzlicher Thymineinheiten wurden die terminalen Enden des Quadruplexes weiter verlängert. Dadurch eröffnete sich die Möglichkeit, die Auswirkungen der sich ausbildenden, ausgedehnten Endstrukturen in Bezug auf die Stabilität sowie die Ionenwanderung entlang der Kanalachse des zentralen Guanin-Quadruplexes zu studieren.

Die gezielte Ausdehnung der Simulationsdauer auf über 3 ns ermöglichte Aussagen hinsichtlich des Langzeitverhaltens.

In Anlehnung an die d[TGGGGT]₄/K-Systeme wurde auch an dieser Stelle einmal mit und einmal ohne zusätzliche H-Brückenverstärkung gearbeitet.

System	Anmerkungen	Kationen	Besetzungsmuster	t_{sim} [ps]
d[TTGGGGTT] ₄ /K		K ⁺	• • • • • • •	3160
d[TTGGGGTT] ₄ /K (d.r)	verstärkte H-Brücken	K ⁺	• • • • • • •	2240

Tabelle 4.7: d[TTGGGGTT]₄/K (mit und ohne „restraints“)

¹²d.r.= distance restraining (in diesem System werden die Wasserstoffbrückenbindungen (O6/H1 sowie N7/H2) durch Addition eines harmonischen Terms (Kraftkonstante $k=1000 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\text{nm}^{-2}$) im Kraftfeld verstärkt)

7) $r[\text{UGGGGU}]_4/\text{K}$ (Übergang von DNA- zu RNA-Systemen)

Unterschiede im Verhalten zwischen DNA- und RNA-Strukturen wurden anhand der Simulation eines $r[\text{UGGGGU}]_4/\text{K}$ -Systems studiert (siehe Tab. 4.8). Zentrale Untersuchungsgegenstände bildeten dabei insbesondere der Einfluss der Uracil-Basen (im Unterschied zu den zuvor eingesetzten Thymin-Einheiten) sowie der zusätzlichen Hydroxyeinheiten auf die Stabilität des Quadruplexes sowie die Ionenwanderung der interkalierten Kationen.

System	Anmerkungen	Kationen	Besetzungsmuster	t_{sim} [ps]
$r[\text{UGGGGU}]_4/\text{K}$	RNA	K^+	$ \bullet \bullet \bullet \bullet \bullet \bullet $	920

Tabelle 4.8: $r[\text{UGGGGU}]_4/\text{K}$

Die relevanten Simulationsparameter aller untersuchten Systeme können den Tab. A.2 und A.3 in Anhang A.2 auf S. 234f. entnommen werden.

Kapitel 5

Die Systeme

$d[\text{GGGG}]_4/\text{Erdalkaliionen}$

Erdalkaliionen nehmen in biologischen Systemen zahlreiche Funktionen wahr [110]. Calciumionen beispielsweise sind in Form ihrer Phosphatsalze zusammen mit Kollagen die Hauptbestandteile des Knochenmaterials. Gleichzeitig spielen sie eine Rolle in Signalprozessen bei der Muskelkontraktion. Ihre ausgeprägte Fähigkeit zur Bindung von Liganden (über Sauerstoffatome) ermöglicht gezielte Konformationsänderungen, z.B. die Quervernetzung von Proteinabschnitten. Dabei erfolgt die Ausbildung von Bindungen zumeist sehr selektiv, auch in Anwesenheit anderer Erdalkaliionen. Demgegenüber bilden Magnesiumionen Komplexe (aktive Form) mit Adenosintriphosphat (ATP), dem wichtigsten Energieträger in biologischen Systemen.¹

Hinsichtlich der Wechselwirkungen mit DNA-Strängen kommt den Erdalkaliionen eine besondere Bedeutung zu. So zeigten experimentelle Untersuchungen mit Hilfe der CD- bzw. Massenspektroskopie *in vitro*, dass die Anwesenheit dieser zweiwertigen Kationen zur Ausbildung polymorpher, stabiler Tetraplexstrukturen aus guaninreichen Telomersequenzen führt [64][82]. Neben dem pH-Wert ist dabei die Kationensorte maßgeblich für die Stöchiometrie sowie den Richtungssinn des Quadruplexes verantwortlich (vergleiche dazu Abschnitt 2.2). *In vivo* ergeben sich damit aufgrund der signifikanten Konzentrationen der Erdalkaliionen in der lebenden Zelle (siehe Einleitung) mögliche Schlüsselfunktionen als konformative Schalter im Bereich der Telomerenden.

Im Folgenden werden daher $d[\text{GGGG}]_4/\text{Erdalkali-Tetraplexe}$ hinsichtlich ihrer Stabilität und geometrischen Besonderheiten sowohl untereinander als auch im Vergleich zu den analogen Alkalisystemen untersucht.

¹Sie bevorzugen kleine, symmetrische Koordinationsräume, wohingegen Ca^{2+} -Ionen asymmetrische, größere Hohlräume präferieren.

Wie sich bereits in vorhergehenden Studien [68] gezeigt hat, ist das kationenspezifische Verhalten von den Bedingungen während der Equilibrierungsphase weitestgehend unabhängig. Daher dient für die Simulationen der $d[\text{GGGG}]_4$ -Systeme mit jeweils Magnesium-, Calcium- bzw. Strontiumionen eine Startstruktur als Grundlage, die bereits in früheren Arbeiten von TÖHL benutzt wurde [113]. Hierbei handelt es sich um einen equilibrierten $d[\text{GGGG}]_4/\text{K}$ -Quadruplex. In der hier vorliegenden Untersuchung werden die dort verwendeten einwertigen Ionen gegen die o.g. zweiwertigen unter Erhaltung der Ladungsneutralität des Gesamtsystems ausgetauscht.

5.1 Stabilität der Quadruplex-DNA

Ein wichtiges Potenzial der *Molekulardynamischen Simulation* ist es, Aussagen über die Stabilitäten der untersuchten Systeme treffen zu können. Qualitativ drückt sich dies im Grad der beobachteten konformativen Fluktuationen auf atomarer Ebene aus, die in Beziehung zu Strukturen aus NMR- bzw. Röntgenuntersuchungen gesetzt werden können.

Speziell die Stabilität von Quadruplexstrukturen wird dabei maßgeblich durch die eingesetzte Ionensorte, das Besetzungsmuster sowie mögliche Wechselwirkungen mit der umgebenden Sphäre aus Wasser und zusätzlichen Gegenionen bestimmt.

Insbesondere für die Besetzungsmuster, die die interkalierten Kationen innerhalb des Tetraplexes ausbilden, liegen bislang erst wenige experimentelle Erkenntnisse vor [63][70], sodass die Computersimulation hier wertvolle Ergänzungen hinsichtlich möglicher Ionenanordnungen sowie deren Korrelation zu systemimmanenten geometrischen Größen geben kann.

Quantitativ lassen sich die Stabilitäten von Quadruplexstrukturen durch die Berechnung der zugehörigen rms-Werte beurteilen (siehe dazu S. 37). Zu diesem Zweck werden die während der Simulation auftretenden Folgestrukturen möglichst genau über die gewählte Startstruktur gelegt, die den Beginn der Aufzeichnung kennzeichnet. Die Quadratwurzel der mittleren quadratischen Abweichung der Ortsfluktuationen aller Atome des Quadruplexes von dieser Startstruktur fungiert somit als Indikator für die konformativen Änderungen innerhalb des Tetraplexes.

5.1.1 rms-Werte

Die Abb. 5.1 stellt die zeitabhängige Auftragung der rms-Werte für die Systeme $d[\text{GGGG}]_4/\text{Erdalkaliionen}$ dar. Dabei zeigt sich ein deutlich unterschiedliches Verhalten für den jeweiligen Ionentyp.

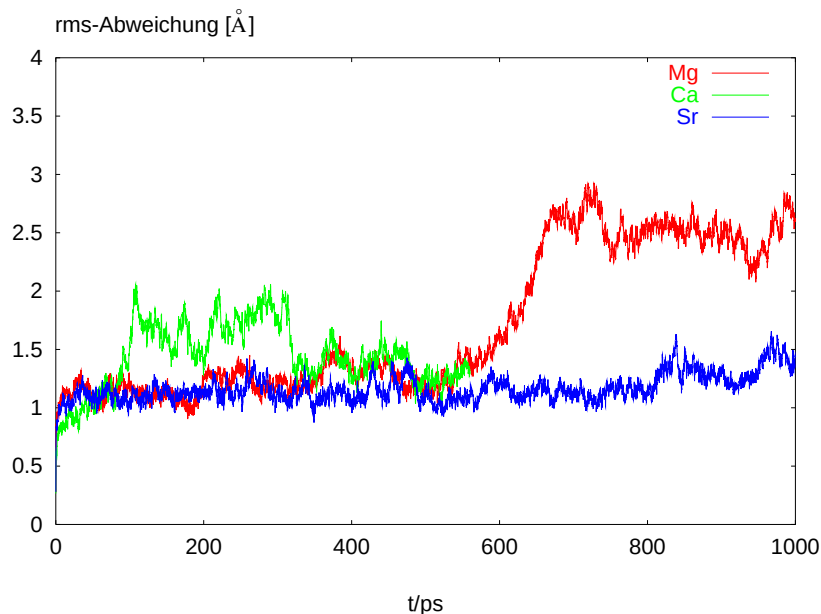


Abb. 5.1: rms-Abweichungen für die d[GGGG]₄-Systeme mit den zweiwertigen Kationen Mg²⁺, Ca²⁺ und Sr²⁺ (die zugehörigen Besetzungsmuster finden sich in den Abb. 5.6, 5.8 sowie A.1)

Die rms-Werte des Strontium-Systems weisen über den gesamten Simulationszeitraum von 1000 ps einen gleichmäßigen, horizontalen Verlauf auf. Das Magnesium-System verhält sich zunächst analog, neigt jedoch nach ca. 350 ps zu stärkeren Fluktuationen, bis nach ca. 600 ps ein deutlicher Anstieg zu beobachten ist.² Demgegenüber beobachtet man für das Calcium-System bereits in den ersten 100 ps der Simulation einen stetigen Anstieg der rms-Werte. Im Anschluss verbleiben sie bis in den Bereich von ca. 350 ps unter starken Fluktuationen auf erhöhtem Niveau, um schließlich bis zum Simulationsende bei 560 ps auf Werte abzufallen, die mit den beiden anderen Erdalkalisystemen vergleichbar sind.

Vergleicht man sowohl die absoluten rms-Werte als auch die auftretenden Schwankungen mit denen analoger Alkalisysteme, so lässt sich erkennen, dass die Werte in der gleichen Größenordnung liegen (siehe hierzu auch [68][113]).

Neben der Betrachtung der absoluten rms-Werte, die die Abweichung von der jeweiligen Startstruktur angeben, sind ihre Fluktuationen ein weiteres Kriterium für die Beurteilung der Stabilität einer intermediären Konformation. Zu diesem Zweck ist es sinnvoll, die gemittelten Werte unter Berücksichtigung der Standard-

²Zu beachten ist in diesem Fall jedoch, dass die abrupte Erhöhung auf eine Veränderung des Ionenbesetzungsmusters zurückzuführen ist (Einzelheiten hierzu siehe Kap. 5.3).

abweichung zu betrachten, um einen Vergleich untereinander zu ermöglichen. Abb. 5.2 zeigt eine entsprechende Auftragung.

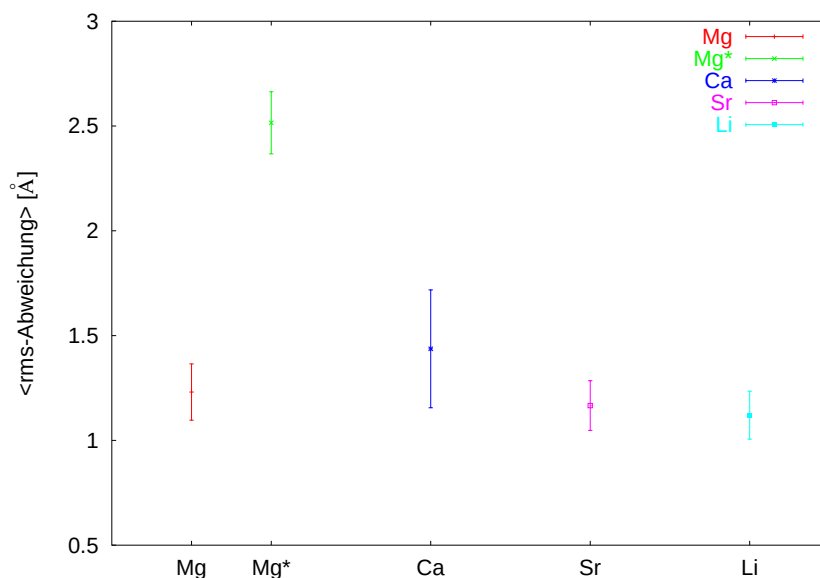


Abb. 5.2: Mittlere rms-Abweichungen mit Standardabweichung für die d[GGGG]₄-Systeme mit den Kationen Mg²⁺, Ca²⁺, Sr²⁺ sowie Li⁺ (zum Vergleich)

Die Mittelung bezieht sich auf Zeitbereiche, in denen die Käfige am 3'- und am 5'-Ende durch jeweils ein Ion besetzt sind. Lediglich das als Mg* bezeichnete System unterscheidet sich durch eine Verschiebung des vormals im Käfig befindlichen Magnesiumions in die Ebene vier (Zeitbereich von 700 - 1000 ps; vergleiche hierzu Kap. 5.3). Zum Vergleich mit den äquivalenten d[GGGG]₄/Alkali-Systemen sind zusätzlich die Ergebnisse der Untersuchung mit Lithiumionen (gleiches Besetzungsmuster) [68] aufgetragen.

Die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der rms-Werte des Strontium- und des Magnesium-Systems liegen dabei mit Beträgen von ca. 1,2 Å in der Größenordnung des d[GGGG]₄/Li-Quadruplexes. Das Calcium-System zeigt im Mittel einen rms-Wert von ca. 1,4 Å, jedoch sind die Fluktuationen deutlich stärker ausgeprägt. Trotz der Unterschiede stellen sie für DNA-Strukturen typische rms-Werte dar [120][83].

Der stark erhöhte rms-Wert im Mg*-System wird bedingt durch die mit der Modifikation des Besetzungsmusters verbundenen konformativen Änderung der Quadruplexstruktur nach 600 ps (im Vergleich zur Startstruktur). Die Schwankungsbreite liegt jedoch im Bereich der Systeme mit Strontium- bzw. Lithiumionen.

Wie die Untersuchungen zeigen, vermag jede der eingesetzten Ionenarten die Quadruplexstruktur zu stabilisieren. Dies lässt sich an den nahezu horizontalen Kurvenverläufen (zeitabhängige Auftragung der rms-Werte) über weite Bereiche der Simulationen ablesen. Die geringen Fluktuationen sind ein Indiz dafür, dass innerhalb des Experiments Bereiche um bestimmte Gleichgewichtskonformationen betrachtet werden.

Gleichzeitig wird deutlich, dass die Magnesium- und Strontiumionen für eine erhöhte Stabilität des Quadruplexes sorgen, was die verringerten rms-Werte bzw. Standardabweichungen gegenüber dem Calcium-System bei vergleichbarem Besetzungsmuster widerspiegeln.

Die Größe der Ionen allein kann jedoch für die erhöhten rms-Werte des Calciumsystems nicht verantwortlich gemacht werden, da ansonsten der Sr^{2+} -Quadruplex die geringste Stabilität aufweisen sollte. Offensichtlich kompensiert die geringere Ladungsdichte der Strontiumionen den vergrößerten Ionenradius im Vergleich zu den anderen beiden untersuchten Erdalkalitionen (Mg^{2+} ($r_{\text{ion}}=1,03 \text{ \AA}$), Ca^{2+} ($r_{\text{ion}}=1,26 \text{ \AA}$), Sr^{2+} ($r_{\text{ion}}=1,40 \text{ \AA}$); eine allgemeine Übersicht der Ionenradien findet sich im Anhang auf Seite 233).

Eingehendere energetische Untersuchungen in Kap. 5.6 unterstreichen die Sonderstellung des Calciumsystems. Besonders die Coulomb-Wechselwirkungen zwischen DNA und interkalierten Ionen weisen an dieser Stelle auf die geminderten Stabilisierungseigenschaften dieser Ionensorte hin.

Experimentelle CD-Untersuchungen unterstützen ebenfalls tendenziell das vorliegende Simulationsergebnis. Hierbei wurde ein synergetischer Effekt von Kalium- und Magnesiumionen bei der supramolekularen Selbstorganisation von $\text{d}[\text{TGG}]_4$ beschrieben [19] (gleichzeitig wird an dieser Stelle auf den Synergismus von Magnesium- und Strontiumionen hingewiesen). Die Zugabe schon kleiner Mengen an Mg^{2+} führt zu einer starken Beschleunigung der Aggregation. Ebenfalls ist der Austausch von Kalium- gegen Strontiumionen möglich, ohne dass der o.g. Effekt verschwindet. Eine vergleichbare Rolle von Calciumionen konnte an dieser Stelle nicht beobachtet werden.

Um ein Gefühl für das Ausmaß der Strukturveränderungen im Laufe der Simulation zu erhalten, werden im folgenden Abschnitt visualisierte Darstellungen der verschiedenen $\text{d}[\text{GGGG}]_4$ -Systeme vorgestellt.

5.2 Visualisierung der Folgestrukturen

Abb. 5.3 stellt exemplarisch für die Gruppe der Erdalkali-Quadruplexe die Startstruktur des Systems $\text{d}[\text{GGGG}]_4/\text{Mg}$ nach dem Ende der Equilibrierungsphase dar.

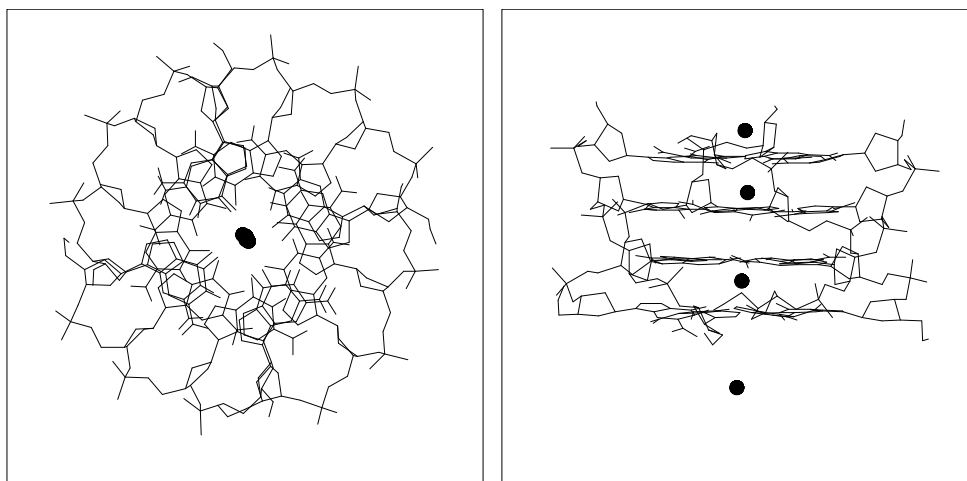


Abb. 5.3: Startstruktur des Systems $d[\text{GGGG}]_4/\text{Mg}$ nach Ende der Equilibrierungsphase

Alle Guaninebenen des Quadruplexes weisen eine planare Ausrichtung auf. Desweiteren erkennt man deutlich, dass sich die zu Beginn in den Tetramerebenen platzierten Kationen während der Equilibrierungsphase von 68 ps verschoben haben (vergleiche dazu Tab. 4.2 auf S. 48). Sie halten sich zum Startzeitpunkt der eigentlichen Simulationsphase in den endständigen Käfighohlräumen sowie im Bereich der Enden außerhalb des Tetraplexes auf.

Im Laufe der sich anschließenden Produktionsphase der Trajektorien entwickeln sich die Systeme ohne die Einwirkung zusätzlicher, strukturverstärkender Kräfte (“restraints“). Abb. 5.4 zeigt die am Ende der jeweiligen Simulation auftretenden Strukturen der Systeme $d[\text{GGGG}]_4/\text{Mg}$ und -Sr (nach 1000ps) sowie $d[\text{GGGG}]_4/\text{Ca}$ (nach 560 ps), sowohl entlang der helikalen Achse als auch senkrecht dazu.

Innerhalb jeder der drei Simulationsreihen bleibt die Quadruplexstruktur weitestgehend erhalten. Alle Systeme weisen ein nahezu identisches Besetzungsmuster des Tetraplexes mit Kationen auf, das sich zum einen in einer Belegung der endständigen Käfige äußert. Zum anderen haben sich die vormals an den 3'- und 5'-Enden assoziierten Erdalkalitionen vollständig aus dem Nahbereich der DNA entfernt.

Bei genauer Betrachtung erkennt man jedoch die individuellen Besonderheiten jedes Systems. So spiegelt sich beispielsweise der bereits im letzten Abschnitt beschriebene, erhöhte rms-Wert des Magnesium-Systems zum Ende der Simulation in der dargestellten Struktur wider. Das System reagiert am 5'-Ende auf den Eintritt des Ions in die durch die Guaninbasen aufgespannte Ebene mit einer Ausweichbewegung. Dabei dreht sich die Purinbase des vorne liegenden Stranges

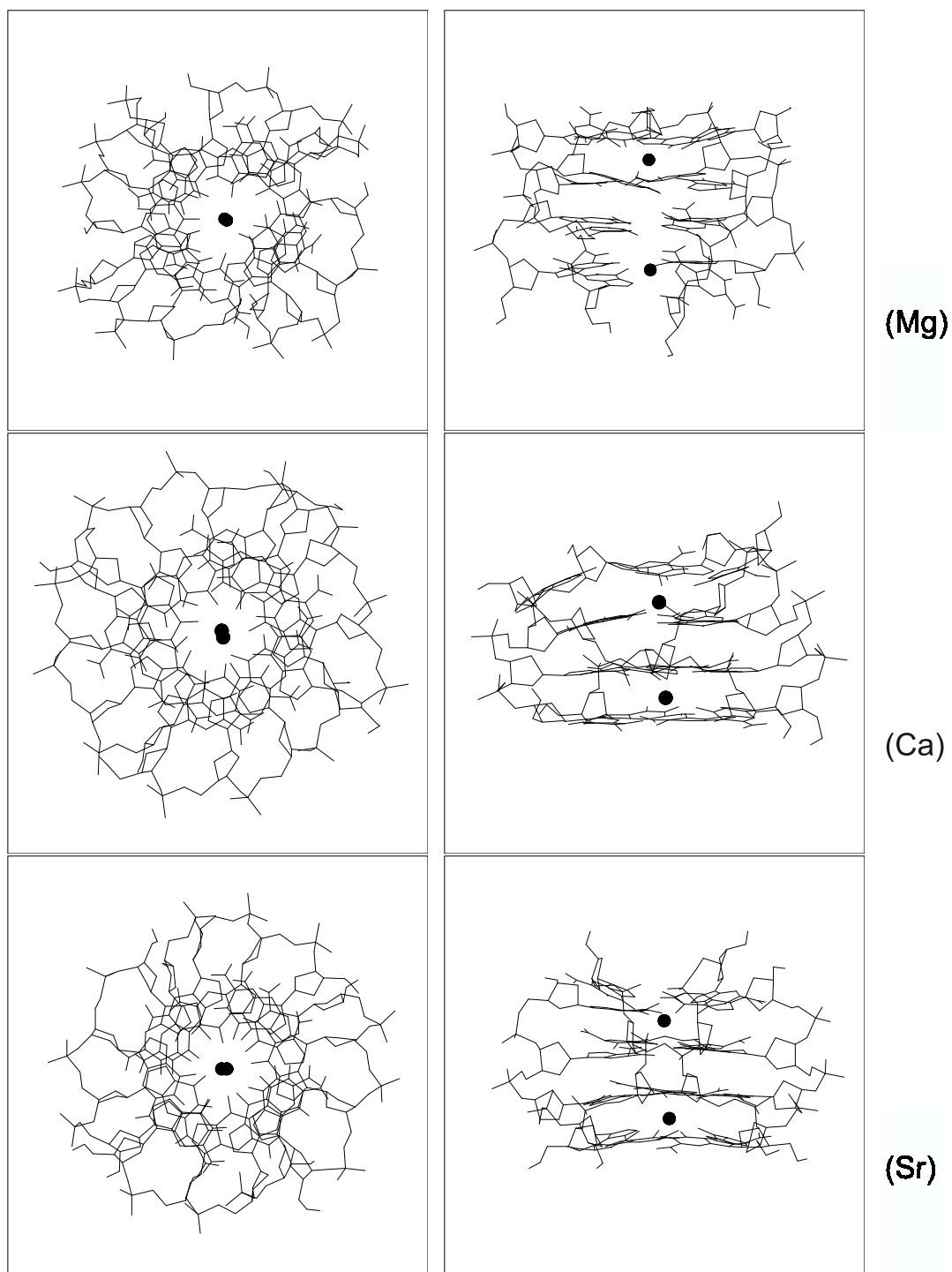


Abb. 5.4: Folgestrukturen der simulierten Systeme $d[GGGG]_4$ mit Mg^{2+} , Sr^{2+} (nach 1000 ps) und Ca^{2+} (nach 560 ps) (Aufsicht und Seitenansicht (3'-Ende oben))

aus der weitestgehend planaren Anordnung der anderen Basenpaare dieser Ebene heraus, um dem erhöhten Platzbedarf Rechnung zu tragen. Ein Blick entlang der helikalen Achse zeigt die Auswirkung auf die anderen Stränge. Hier kommt es zu einer deutlichen Verringerung des helikalen Winkels α . Interessanterweise führen diese geometrischen Veränderungen nicht zu einer weitreichenden Destabilisierung des Gesamtsystems.

Die d[GGGG]₄-Systeme mit Ca²⁺- bzw. Sr²⁺-Ionen zeigen hingegen eine im Vergleich zur Anfangsstruktur lediglich „geringfügig“ veränderte Konformation. Der Quadruplex mit Calciumionen stabilisiert sich nach zwischenzeitlich auftretenden Fluktuationen, der mit Strontium-Ionen besitzt über den gesamten Simulationszeitraum hinweg eine zur dargestellten Endstruktur vergleichbare äußere Form.³

Die im letzten Abschnitt diskutierten Verläufe der rms-Werte spiegeln sich in den Strukturdarstellungen wider und untermauern die insgesamt guten Komplexeierungseigenschaften der untersuchten Spezies. Jede der Ionensorten trägt zu einer Stabilisierung des Tetraplexes bei.

Wie die Darstellungen verdeutlichen, besitzen Quadruplexe vielfältige Möglichkeiten, um auf lokale Veränderungen infolge von Ionenbewegungen reagieren zu können. Bereits in Voruntersuchungen [113][68] konnten konformative Änderungen bei den zumeist schnellen Ebenendurchtritten von Alkaliionen charakterisiert werden. Man beobachtete, dass die Carbonylsauerstoffatome flexibel auf den steigenden Raumbedarf der Kationen reagieren können, indem sich ihr Abstand zueinander vergrößert. Auswirkungen auf den Bereich des Rückgrats („backbone“) traten dabei jedoch weniger in Erscheinung. Die längere Anwesenheit eines Ions in einer Basenebene führt hingegen dazu, dass die Trägheit in Bezug auf Konformationsänderungen des „backbones“ überwunden werden kann (siehe hierzu auch Kap. 5.4).

Neben den vorangegangenen Betrachtungen statischer Eigenschaften der G-DNA-Assoziate spielen natürlich ebenso die dynamischen Prozesse innerhalb der Telomereinheiten eine wichtige Rolle. Zu diesem Zweck werden im folgenden Abschnitt die Ionenfluktuationen innerhalb der Quadruplexe näher untersucht.

5.3 Ionenwanderung entlang der Kanalachse

Voruntersuchungen haben gezeigt, dass insbesondere Kaliumionen in der Lage sind, sowohl von außen in die Quadruplexstruktur einzudringen als auch sich innerhalb dieser bewegen oder sie wieder verlassen zu können [113]. Inwieweit Erdalkaliionen ebenfalls dies Verhalten aufweisen, wird im Folgenden eingehender untersucht.

³Während der Simulation beider Systeme beobachtet man am 3'-Ende stärkere geometrische Veränderungen, deren Ursachen im Kap. 8 näher betrachtet werden.

Zu diesem Zweck betrachtet man die Bewegung der Ionen entlang der helikalen Achse (Kanalachse). Hierzu wird der Ursprung des Koordinatensystems alle 0.4 ps, was jedem zweihundertsten Zeitschritt entspricht, in das Geometriezentrum der Quadruplex-DNA verschoben und die Koordinatenachsen den Hauptträgheitsachsen entsprechend angeglichen. Die z-Komponente der Kationenbewegung senkrecht zu den durch die Carbonylsauerstoffen aufgespannten Ebenen stellt somit die zeitlich zu verfolgende Größe dar (siehe Abb. 5.5).

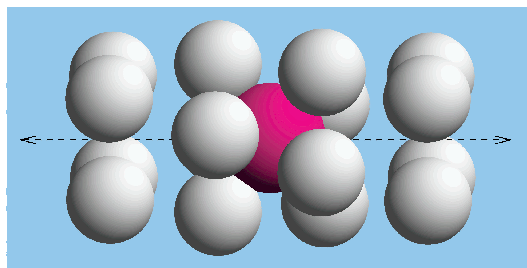


Abb. 5.5: Schematische Darstellung der Ionenbewegung entlang der Kanalachse

Abb. 5.6 zeigt die entsprechende Bewegung der Magnesiumionen. Dabei stellen die dunkel dargestellten, horizontal verlaufenden Linien die Quartettebenen dar, deren Lage durch den Abstand des geometrischen Zentrums der jeweiligen Ebene (definiert durch die vier Carbonylsauerstoffatome) zum Geometriezentrum der DNA charakterisiert wird. Eine solche Darstellung besitzt den Vorteil, dass die Bewegungen der Ionen mit entsprechenden Reaktionen der Ebenen korreliert werden können.

Die zu Beginn der Simulation an den Strangenden positionierten Mg^{2+} -Ionen (vergleiche hierzu Abb. 5.3) entfernen sich bereits nach wenigen Pikosekunden aus dem Nahbereich des Quadruplexes und werden daher aufgrund einer besseren Übersichtlichkeit nicht weiter berücksichtigt.

Während der ersten 700 ps der Simulation besetzen die interkalierten Magnesiumionen die Käfige am 3'- bzw. 5'-Ende. Der Abstand zu den benachbarten Guaninebenen bleibt konstant. Hierbei sollte beachtet werden, dass sich die Kationen nicht in der Mitte zwischen den beiden benachbarten Ebenen aufhalten, die durch die Carbonylsauerstoffatome der Guaninbasen aufgespannt werden. Vielmehr sind sie zu den jeweiligen Strangenden hin verschoben, bedingt durch elektrostatische, interionische Abstoßungseffekte. Zusätzlich unterstützen anziehende Wechselwirkungen mit Wassermolekülen, die sich in der Nähe der Enden des Quadruplexes aufhalten, die Ionenverschiebung nach außen, worauf in Kap. 8 noch näher eingegangen wird. Eine Besetzung aller drei Hohlräume bei $\text{d}[\text{GGGG}]_4$ -Systemen ist

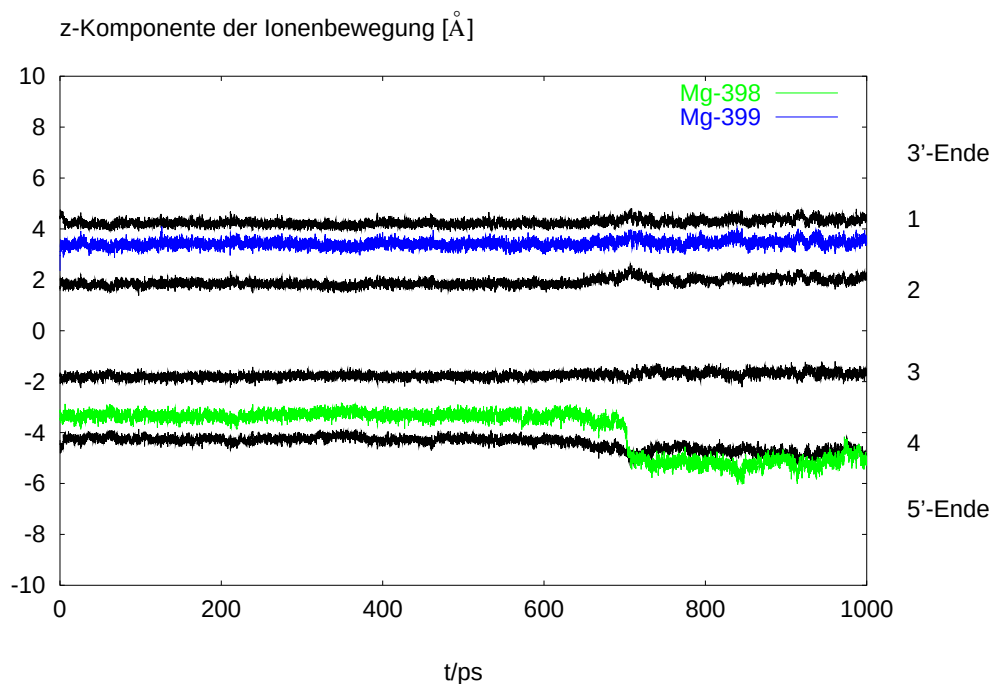


Abb. 5.6: Kationenbewegung entlang der helikalen Achse für das System $d[\text{GGGG}]_4/\text{Mg}$ (Die Nummerierung der untersuchten Ionen bezieht sich auf deren Position innerhalb der zugrunde liegenden Koordinatendatei des Gesamtsystems)

offensichtlich aufgrund der daraus resultierenden Coulomb-Abstoßung der Ionen untereinander ungünstig.

Nach ca. 700 ps verlässt das Ion am 5'-Ende abrupt seinen bislang eingenommenen Platz im Käfig des Quadruplexes und durchdringt schnell die Ebene der O6-Sauerstoffatome. Durch das Herauswandern kommt es am 3'-Ende zu einer gleichzeitigen Verschiebung von Ebene eins und zwei sowie dem eingelagerten Magnesiumion nach außen. Diese Auslenkung wird hervorgerufen durch die plötzlich verringerte Coulombanziehung des Kations (Mg-398) auf die Carbonylsauerstoffatome der Ebene zwei, die die Bedeutung der weitreichenden elektrostatischen Wechselwirkungen unterstreicht. Auch „entfernte Regionen spüren“ die Anwesenheit von Kationen und reagieren sehr sensibel auf Veränderungen innerhalb des sie umgebenden elektrostatischen Feldes.

Das ausgetretene Ion verlässt den Nahbereich des Quadruplexendes nicht, sondern hält sich weiterhin in unmittelbarer Nähe (teilweise sogar innerhalb) der Ebene vier auf und trägt damit zu einer Stabilisierung des Systems bei. Unterstützt wird der Ionendurchtritt durch das Herausdrehen einer Purinbase aus der „planaren“ Anordnung (ablesbar an dem bereits nach ca. 600 ps ansteigenden rms-Wert).

Dies liefert den nötigen Raum für die Verschiebung des Kations (vergleiche dazu S. 60).

Gleichzeitig stellt man fest, dass sich die Magnesiumionen nicht direkt entlang der durch die O6-Atome festgelegten helikalen Achse bewegen, sondern auch senkrecht dazu fluktuieren (siehe Abb. 5.7). Hierbei ist zu beachten, dass diese Sauerstoffatome natürlich ebenfalls einer ständigen Fluktuation unterliegen, die sich an Änderungen des uneigentlichen Diederwinkels (C6-C5-N1-O6) des Purinrestes zeigen bzw. durch Verschiebungen der Guaninbasen hervorgerufen werden. Besonders das Ion am 5'-Ende (Mg-398) zeigt von ca. 700 ps bis 1000 ps eine auffällige Erhöhung des Abstandes zur helikalen Achse verbunden mit einer deutlichen Vergrößerung der Schwankungsbreite, was auf die oben beschriebene Verzerrung der Tetramerebene zurückzuführen ist.

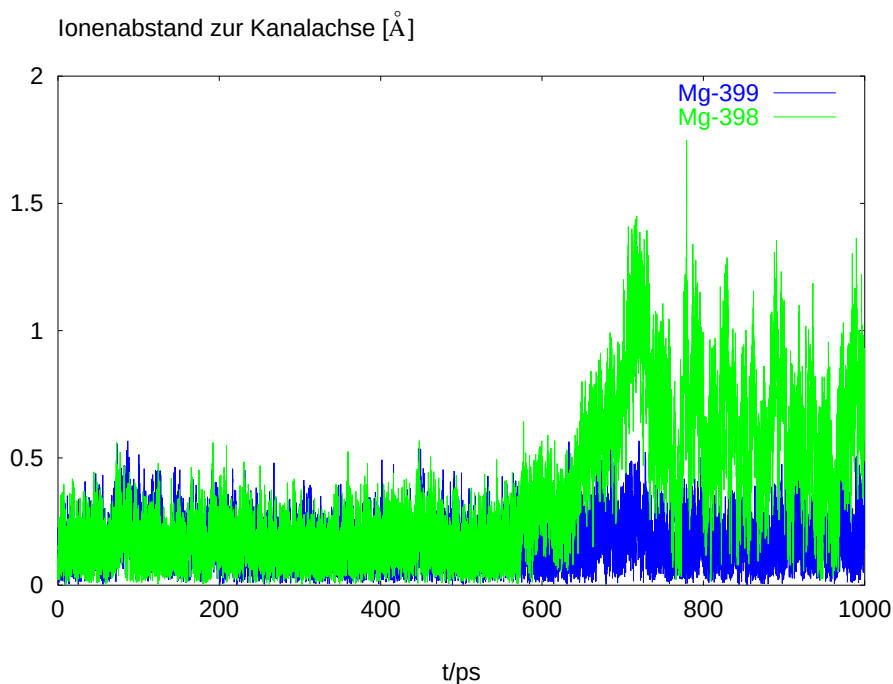


Abb. 5.7: Ionenabstand der Mg^{2+} -Ionen zur Kanalachse im System $\text{d[GGGG]}_4/\text{Mg}$

Das $\text{d[GGGG]}_4/\text{Sr}$ System zeigt hinsichtlich des Besetzungsmusters ein ähnliches Verhalten (siehe Abb. A.1 in Anhang A.2.1 auf S. 237). Auch hier sind die äußeren Käfige besetzt, wobei ebenfalls eine Verschiebung der Ionen zu den Strangenden hin zu beobachten ist. Anders als im vorher betrachteten Fall bleibt die Ionenanordnung innerhalb des Quadruplexes jedoch über den gesamten Simulationszeitraum konstant. Die Abstände der interkalierten Kationen zur helikalen

Achse liegen mit Werten von durchschnittlich $0,15 \text{ \AA}$ (Sr-398) bzw. $0,16 \text{ \AA}$ (Sr-399) bei einer Standardabweichung von $0,08 \text{ \AA}$ in der Größenordnung des Abstands des vergleichbaren Magnesiumions am 3'-Ende.

Das Calciumsystem zeigt demgegenüber ein wesentlich stärker fluktuierendes Verhalten, wie Abb. 5.8 zu entnehmen ist.

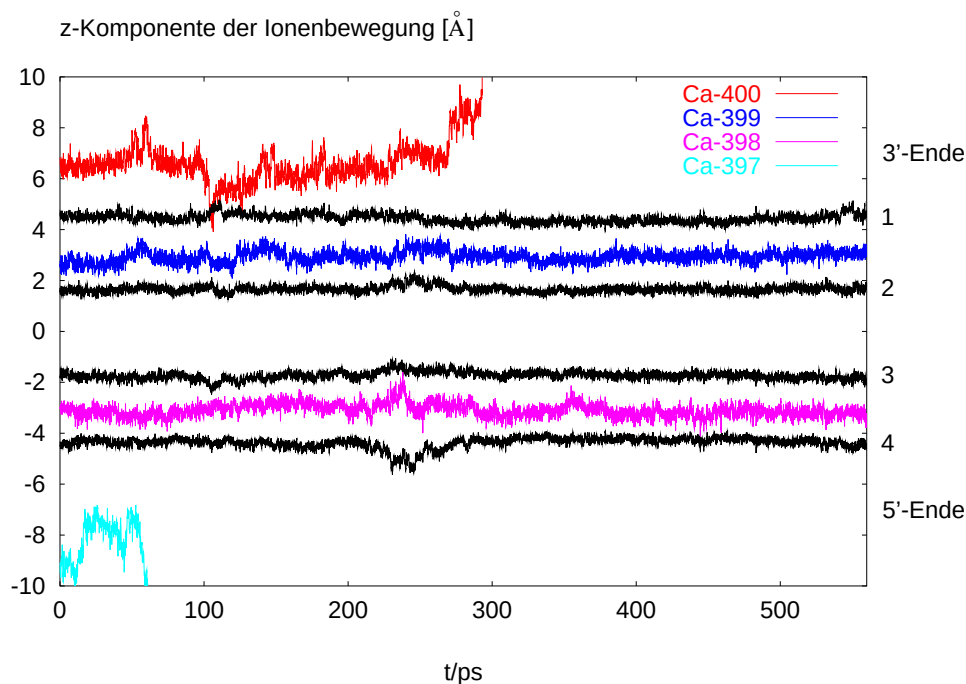


Abb. 5.8: Kationenbewegung entlang der helikalen Achse für das $d[\text{GGGG}]_4/\text{Ca}$ -System (entnommen aus [68])

Anders als bei den zuvor betrachteten Systemen kommt es nicht zu einer unmittelbaren Entfernung des außerhalb des Quadruplexes am 3'-Ende assoziierten Ca^{2+} -Ions. Vielmehr verbleibt es über einen Zeitraum von 220 ps im näheren Bereich der Ebene eins.

Durch seine Anwesenheit werden starke Coulomb-Wechselwirkungen auf die Ionen in den Käfigen ausgeübt, die sich besonders deutlich im Bereich um 220 ps beobachten lassen. Dabei korrelieren ihre resultierenden Bewegungen mit der Dynamik der angrenzenden Purin-Ebenen. Bedingt durch die Fluktuation des Ions zwischen Ebene drei und vier kommt es zu einer drastischen Verschiebung der Ebene am 5'-Ende nach außen. Das Calciumion kann jedoch offensichtlich aufgrund seiner Größe und seiner damit verbundenen, gegenüber einwertigen Kationen gesteigerten Lennard-Jones-Abstoßung zu den Carbonylsauerstoffatomen die Quartettebene drei

nicht durchtreten. Erst nachdem sich das außerhalb des Komplexes befindliche Kation (3'-Ende) weiter entfernt, kommt es zu einer „spürbaren Beruhigung“ (nach ca. 380 ps).

Wie in diesem Abschnitt gezeigt werden konnte, bedingt die ausgeprägte Coulomb-Abstoßung zwischen den zweiwertigen Kationen eine bevorzugte Besetzung der äußeren Käfige innerhalb von d[GGGG]₄-Quadruplexen durch Erdalkalitionen.

Dies trägt dazu bei, dass die Möglichkeit zum Herausdrehen der Basen aus der Ebene durch die anziehenden Wechselwirkungen zwischen den Carbonylsauerstoffatomen und den eingelagerten Kationen reduziert wird. Endeffekte, die sich besonders gravierend bei kurzen Fragmenten [113] auf die äußeren Quartetteinheiten auswirken, können dadurch merklich unterdrückt werden. Gleichzeitig reduziert sich die Coulomb-Abstoßung zwischen den zweifach positiv geladenen Teilchen durch das Vorhandensein eines unbesetzten Käfigs in der Mitte (siehe dazu Kap. 5.3). Gegenüber den analogen Systemen mit Kaliumionen lässt sich insgesamt ein deutlich reduziertes Fluktuationsverhalten entlang der helikalen Achse beobachten (vergleiche hierzu auch Kap. 6.2 bzw. [113]), das in den stärkeren Anziehungseffekten zwischen Guanin-Sauerstoffatomen und dem jeweiligem Erdalkaliumion begründet liegt. Die eingelagerten Ionen werden dadurch stärker fixiert und somit in ihrer Bewegungsfreiheit eingeschränkt.

Wie aus Voruntersuchungen analoger Alkalisysteme bekannt ist [68], beeinflusst die Größe der eingelagerten Ionen ihr Fluktuationsverhalten in ganz entscheidender Weise. Lediglich die „kleinen“ Magnesiumionen sind in der Lage, durch eine Ebene hindurchzuwandern (auch wenn es in diesem Fall durch das Herausdrehen einer Purinbase erleichtert wird), die höheren Homologen hingegen verbleiben in ihrer ursprünglichen Position.

Inwieweit sich die vorliegenden Besetzungsmuster und Ionenbewegungen auf die Geometrie des Quadruplexes auswirken, ist im Folgenden Gegenstand der Untersuchung. Dabei werden Korrelationen aufgezeigt, die zu einem besseren Verständnis der hohen Flexibilität dieser speziellen DNA-Konformation beitragen.

5.4 Charakteristische geometrische Größen

Die jeweiligen Kationen beeinflussen die lokale Geometrie der sie umgebenden DNA-Fragmente in sehr individueller Art und Weise. Neben der unterschiedlichen Ionengröße wirken sich besonders die Coulomb- sowie die Lennard-Jones-Wechselwirkungen direkt auf bestimmte Strukturparameter aus. Voruntersuchungen [113] belegen, dass innerhalb von d[GGGG]₄-Quadruplexen mit Alkaliionen vor-

zugsweise lokale Veränderungen stattfinden, die „äußere“ Form des Tetraplexes jedoch unverändert bleibt. In welchem Umfang sich diese Ergebnisse auf analoge Systeme mit interkalierten Erdalkaliionen übertragen lassen, wird in den nächsten Abschnitten eingehend untersucht.

5.4.1 Größe des Quadruplexkäfigs $\leftrightarrow$ Ebenenabstände

Die Ausdehnung des Quadruplexkäfigs entlang der helikalen Achse wird durch den Abstand der Quartettebenen zueinander vorgegeben, der über die Carbonylsauerstoffatome der Guaninbasen definiert wird. Das Geometriezentrum eines Quartetts wird durch Mittelung der O6-Koordinaten bestimmt (CG(1)). Sein Abstand zu dem Geometriezentrum der benachbarten Quartettebene (CG(2)) wird als d_0 bezeichnet und stellt die im Folgenden als Ebenenabstand bezeichnete Größe dar (siehe Abb. 5.9).

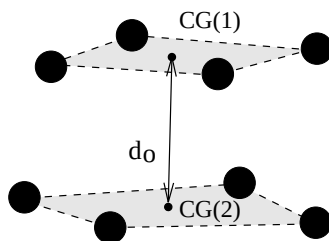
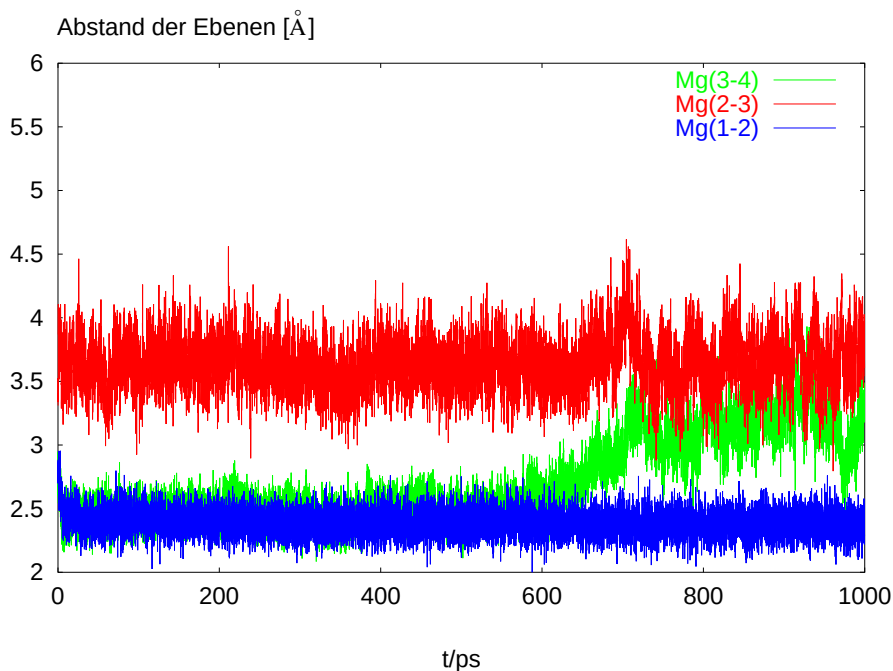


Abb. 5.9: Definition des Ebenenabstands [113]

Abb. 5.10 zeigt die zeitliche Entwicklung der Ebenenabstände des $d[\text{GGGG}]_4/\text{Mg}$ -Systems. Die Nummerierung der Ebenen erfolgt dabei analog zu Abb. 5.6 in Richtung vom 3'- zum 5'-Ende.

Man erkennt deutlich, wie sich das Besetzungsmuster (siehe Abb. 5.6) auf die Käfiggröße auswirkt. Die Besetzung der äußeren Käfige über einen Zeitraum von ca. 700 ps führt aufgrund der anziehenden Wechselwirkungen zwischen positiv geladenen Kationen und den entsprechend negativ polarisierten Carbonylsauerstoffatomen zu einer wesentlichen Verkleinerung des Ebenenabstandes gegenüber dem unbesetzten Raum zwischen den Ebenen zwei und drei. Des weiteren erkennt man, dass die Schwankungen der Abstände unbesetzter Bereiche gegenüber denen besetzter in erheblichem Maße erhöht sind. Im weiteren Verlauf der Simulation wird, bedingt durch das Eindringen des Magnesiumions in die Ebene vier, der Abstand zwischen dieser und ihrer Nachbarebene unter gleichzeitigem Anstieg der

Abb. 5.10: Ebenenabstände im System d[GGGG]₄/Mg

auftretenden Fluktuationen vergrößert. Zu beachten ist in diesem Zusammenhang, dass die Vergrößerung des Wertes in nicht unerheblichem Maße aus der Verzerrung der Quartettebene vier ab ca. 600 ps resultiert, die durch die Verschiebung eines einzelnen Stranges und des damit verbundenen O6-Atoms hervorgerufen wird (siehe hierzu auch Abb. 5.4).

Das äquivalente Strontiumsystem zeigt über den gesamten Simulationszeitraum hinweg ein Verhalten, das dem des Magnesiumsystems (bis ca. 600 ps) entspricht. Auf eine explizite Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Ebenenabstände wird daher an dieser Stelle verzichtet. Er kann der Abb. A.2 in Anhang A.2.2 entnommen werden.

Im Calciumsystem bedingt die Anwesenheit eines Kations außerhalb des Quadruplexes am 3'-Ende innerhalb der ersten ca. 350 ps eine deutliche Erhöhung des Abstands zwischen Ebene eins und zwei gegenüber den zuvor betrachteten Systemen (siehe hierzu Abb. A.3 in Anhang A.2.2).

Besonders auffällig erscheint der starke Anstieg des Abstands zwischen Ebene drei und vier im Zeitbereich um 220 ps. Hier kommt es zu einer kurzzeitigen Erhöhung um ca. 2 Å bei gleichzeitiger Abstandsverringerung zwischen Ebene eins und zwei,

welche als Reaktion auf die Bewegung des Ca^{2+} -Ions in dem Käfig am 5'-Ende zu deuten ist.

Unterschiede im Abstandsverhalten der Ebenen innerhalb der Erdalkalireihe lassen sich am besten anhand einer Betrachtung der Mittelwerte beurteilen. Abb. 5.11 zeigt eine entsprechende Zusammenfassung der mittleren Ebenenabstände mit den zugehörigen Standardabweichungen. Gemittelt wurde über Zeitbereiche, in denen ein gleichartiges Besetzungsmuster vorherrscht. Zum Vergleich mit äquivalenten Alkalisystemen sind die Simulationsergebnisse eines $\text{d[GGGG]}_4/\text{Li}$ -Systems [68] ebenfalls eingezeichnet.

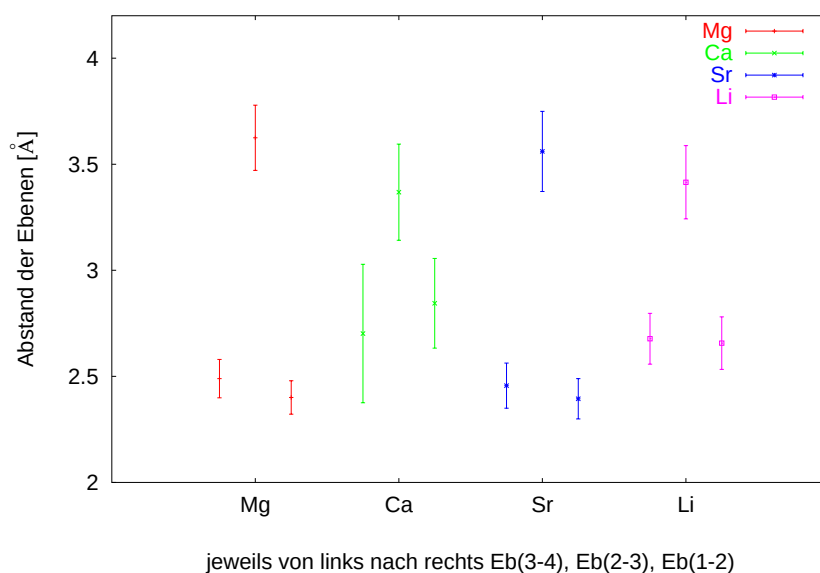


Abb. 5.11: Mittlere Ebenenabstände mit Standardabweichung in den Systemen $\text{d[GGGG]}_4/\text{Mg}$, Ca , Sr , Li , die Besetzungsmuster ändern sich im betrachteten Zeitintervall nicht

Allgemein lässt sich feststellen, dass, ebenso wie auch bei den Quadruplexsystemen mit einwertigen Kationen, die Ebenenabstände besetzter Käfige kleiner sind als die unbesetzter.

Besonders auffällig sind die nahezu identischen Mittelwerte und Schwankungsbreiten der Magnesium- bzw. Strontiumsysteme. Hinsichtlich der besetzten Käfige liegen demgegenüber die Ebenenabstände im Calciumsystem deutlich über denen der beiden anderen Quadruplexe. Die unbesetzten Käfige zeigen ein gegenläufiges Verhalten. Hier liegt ein verringerter Abstand im Ca^{2+} -Komplex vor. Die vergrößerten Schwankungsbreiten bzgl. der Ebenenabstände werden dabei durch die schon angesprochene stärkere Ionenfluktuation hervorgerufen.

Das in dieser Abbildung dargestellte Verhalten des $d[\text{GGGG}]_4/\text{Li}$ -Systems eignet sich zu einem direkten Vergleich, da es ein ähnliches Besetzungsmuster wie die betrachteten Erdalkalisysteme besitzt. Es weist für die besetzten Zwischenräume einen um ca. $0,2 \text{ \AA}$ vergrößerten Abstand auf, der des unbesetzten ist um ca. $0,2 \text{ \AA}$ verkleinert. Die unterschiedliche Ausdehnung entlang der helikalen Achse wird dabei bedingt durch die gesteigerte Coulomb-Anziehung zwischen zweiwertigen Erdalkalitionen und den sie umgebenden Carbonylsauerstoffatomen (Verkleinerung von $d[\text{Eb}(3-4)]$ sowie $d[\text{Eb}(1-2)]$). Gleichzeitig führt die ebenfalls erhöhte interionische Coulomb-Abstoßung zu einem gegenüber dem Lithiumsystem gesteigerten Abstand zwischen Ebene zwei und drei.

Die Käfiggeometrie besitzt ein hohes Maß an Flexibilität, die sich nicht allein durch die eben beschriebenen Abstandsfluktuationen entlang der helikalen Achse äußert, sondern auch die Möglichkeit zur Ausdehnung senkrecht dazu beinhaltet. Im folgenden Abschnitt wird daher die Breite der Quartettebenen in Abhängigkeit vom jeweiligen Ionentyp näher beleuchtet.

5.4.2 Größe des Quadruplexkäfigs $\leftrightarrow$ Breite der Quartettebenen

Die Definition der Käfigbreite erfolgt über den Abstand benachbarter Carbonylsauerstoffatome, wie in Abb. Anhand einer Auftragung des zeitlichen Verlaufs des O6-O6-Abstands wird untersucht, inwieweit die Breite der Quartettebenen von der jeweiligen Ionensorte abhängt und Ionenbewegungen innerhalb des Quadruplexes in der Lage sind, diese zu beeinflussen. 5.12 dargestellt.

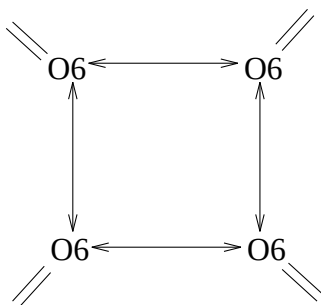


Abb. 5.12: Definition des O6-O6-Abstands innerhalb einer Quadruplexebene, wobei über alle vier Abstände gemittelt wird [113].

Für das Magnesiumsystem (Abb. 5.13) zeigt sich über die ersten 580 ps der Simulation ein sehr gleichmäßiges Verhalten.

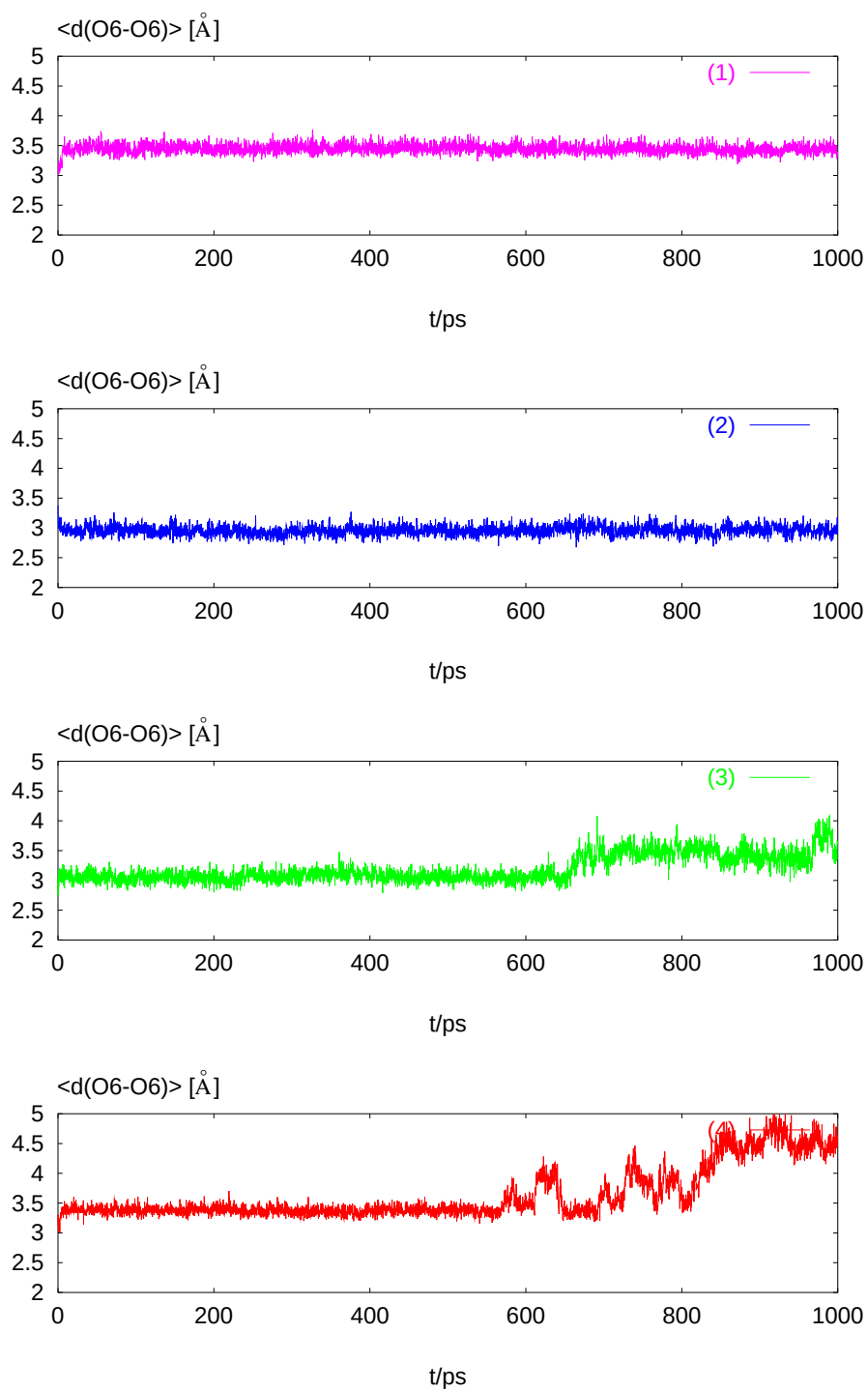


Abb. 5.13: Mittlere O6-O6-Abstände innerhalb der einzelnen Ebenen des Systems $d[\text{GGGG}]_4/\text{Mg}$

Die äußeren Ebenen weisen einen gegenüber den beiden inneren um ca. $0,5 \text{ \AA}$ vergrößerten mittleren Abstand auf, was durch Wechselwirkungen der beiden Enden mit angrenzenden Wassermolekülen erklärt werden kann (siehe hierzu Kapitel 8). Im weiteren Verlauf der Simulation kommt es zu einer Aufweitung der Ebene vier, gefolgt von dem Eintritt eines Kations in die Quartettebene. Diese Aufweitung (teilweise im Bereich von $1 \text{ \AA}$) überträgt sich leicht zeitversetzt ebenfalls auf die Ebene drei, jedoch in merklich abgeschwächter Form.

Vergleicht man den Zeitpunkt der „plötzlichen“ Ausdehnung mit der im vorhergehenden Kapitel beschriebenen Vergrößerung des Abstands, so stellt man fest, dass der erstgenannte Effekt den Auftakt zu einer allgemeinen Steigerung der Dimensionierung des Käfigs bildet.

Das Strontiumsystem zeigt über den gesamten Zeitraum einen analogen Verlauf, der sowohl bzgl. der Mittelwerte als auch der Schwankungsbreite in der Größenordnung des Tetraplexes mit Magnesiumionen liegt. Auf eine explizite Darstellung des Ergebnisses an dieser Stelle wird daher verzichtet.

Die mittleren O6-O6-Abstände des Calciumsystems weisen erwartungsgemäß wesentlich höhere Fluktuationen auf, wie Abb. A.4 in Anhang A.2.3 auf Seite 239 zu entnehmen ist. In Analogie zu dem Verhalten der Ebenenabstände kann der Grund in der ausgeprägteren Ionenbewegung gesehen werden.

Besonders nach 110 ps innerhalb der Ebene eins sowie nach 200 ps innerhalb der Ebene vier kommt es zu drastischen Aufweitungen durch die schon in Abschnitt 5.3 beschriebenen Ionenfluktuationen, wobei im letztgenannten Fall Erhöhungen um bis zu $2,5 \text{ \AA}$ zu beobachten sind.

Die Darstellung der Mittelwerte dieser mittleren Carbonylsauerstoffabstände einschließlich der auftretenden Schwankungen (siehe Abb. 5.14) ermöglicht eine Differenzierung hinsichtlich des Einflusses von Ionentyp und Besetzungsmuster. Zu beachten ist, dass das als Mg bezeichnete System sich auf den Simulationszeitraum bis 580 ps, das System Mg* auf den sich daran anschließenden Bereich bis 1000 ps bezieht.

Besonders auffällig treten die stark erhöhten O6-O6-Abstände bei gleichzeitig großen Schwankungen innerhalb der äußeren Ebenen des Calciumsystems zu Tage. Demgegenüber sind die analogen Werte im Magnesium- bzw. Strontiumsystem wesentlich reduziert. Im Vergleich zum äquivalent besetzten Lithium-Tetraplex zeigen sich, wie schon hinsichtlich der Ebenenabstände, Ähnlichkeiten bezüglich der absoluten Werte sowie der Standardabweichungen.

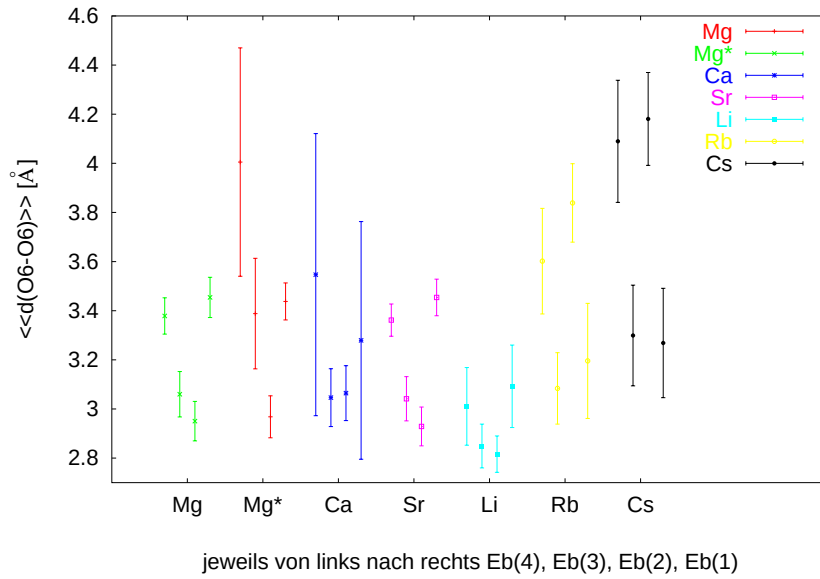


Abb. 5.14: Gemittelte mittlere O6-O6-Abstände mit Standardabweichung in den Systemen $d(GGGG)_4/\text{Mg}$, Mg^* , Ca , Sr , (Li , Rb , Cs zum Vergleich); die Besetzungsmuster ändern sich im betrachteten Zeitintervall nicht

Der als Mg^* gekennzeichnete Zeitbereich mit einem Ion innerhalb einer Ebene weist große Ähnlichkeit zu den ebenfalls in Voruntersuchungen betrachteten Rubidium- bzw. Cäsiumsystemen auf [68]. Auch hier zeigt sich eine deutliche Erhöhung der Ebenenbreite infolge der Anwesenheit eines Ions innerhalb oder in unmittelbarer Nähe des Quartetts.

Ein äquivalenter Ansatz zur Verdeutlichung der o.g. Effekte besteht in der Beobachtung des zeitlichen Verlaufs der mittleren Abstände zwischen den Carbonylsauerstoffatomen und den jeweiligen durch sie innerhalb einer Quartettebene gebildeten Geometriezentren. Die Auswertung dieser Darstellungsart führt zu prinzipiell gleichen Aussagen und soll daher an dieser Stelle nicht näher betrachtet werden.

Insgesamt lässt sich feststellen, dass die Ionensorte eine eher untergeordnete Rolle hinsichtlich der Ausdehnung des Ionenkanals senkrecht zur helikalen Achse besitzt. In viel stärkerem Maße wirkt sich das Besetzungsmuster aus.

Je näher sich die Ionen in der Umgebung einer Quartettebene befinden (oder sogar innerhalb), desto stärker resultiert daraus eine Aufweitung der Ebene, da die zunehmende Verringerung des Abstands zwischen Kation und Carbonylsauerstoffatomen zu einer Erhöhung der Lennard-Jones-Abstoßung führt.

5.4.3 Verzerrung des Quadruplexkäfigs $\leftrightarrow$ Diederwinkel

Die zuvor beschriebenen Aufweitungen der Käfiggeometrie durch mögliche Abstandsveränderungen, sowohl in Richtung der helikalen Achse als auch senkrecht dazu, weisen auf das hohe Maß an Flexibilität hin, mit der die Quadruplexstruktur auf „äußere“ Einflüsse reagieren kann. Eine weitere Möglichkeit besteht in einer Verzerrung des „Sauerstoffkäfigs“. Dies wird im Folgenden näher betrachtet.

Die Anpassung der Käfiggeometrie, z.B. an die schnellen Bewegungen der interkalierten Kationen, erfolgt bei den in direkter Nachbarschaft befindlichen O6-Atomen durch das Auslösen hochfrequenter Schwingungen, die zu einer Verzerrung des Hohlraums führen. Daraus resultiert, dass die Sauerstoffatome nicht über den gesamten Simulationszeitraum planar angeordnet sind (vergleiche hierzu Abb.5.4). Abb. 5.15 stellt den Diederwinkel δ schematisch für eine O6-Ebene dar.

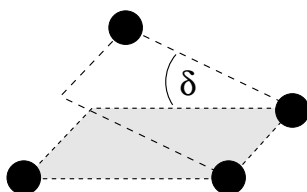


Abb. 5.15: Schematische Darstellung des Diederwinkels, definiert durch die vier O6-Atome einer Ebene [113]

Die Veränderungen der Diederwinkel können zum einen hervorgerufen werden durch ein Herausdrehen einer gesamten Guaninbase aus der Quartettebene. Ebenso besteht die Möglichkeit, dass sich lediglich (bzw. zusätzlich) die O6-Sauerstoffatome aus der „Basenebene“ herausbewegen. Der letztgenannte Effekt ist offensichtlich für die Ausrichtung der Carbonylsauerstoffatome in Richtung der eingelagerten Kationen maßgeblich verantwortlich und hängt in seiner Intensität vom jeweiligen Ionentyp ab [113].

Das zeitliche Verhalten der Diederwinkel ist exemplarisch für die Ebenen des d[GGGG]₄/Mg-Systems in Abb. 5.16 dargestellt. Man erkennt deutlich, dass innerhalb kürzester Zeiträume Winkelbereiche von mehr als 20° überstrichen werden. Gleichzeitig wird die größere Schwankungsbreite für die inneren gegenüber den äußeren Ebenen sichtbar.

Dies kann erklärt werden durch die Verschiebung des interkalierten Magnesiumions hin zu den Enden des Quadruplexes. Durch den verringerten Abstand zur Ebene eins wirken die anziehenden Coulombkräfte der Kationen stärker auf die Carbonylsauerstoffatome und führen so zu geringeren Fluktuationen der betrachteten Winkel.

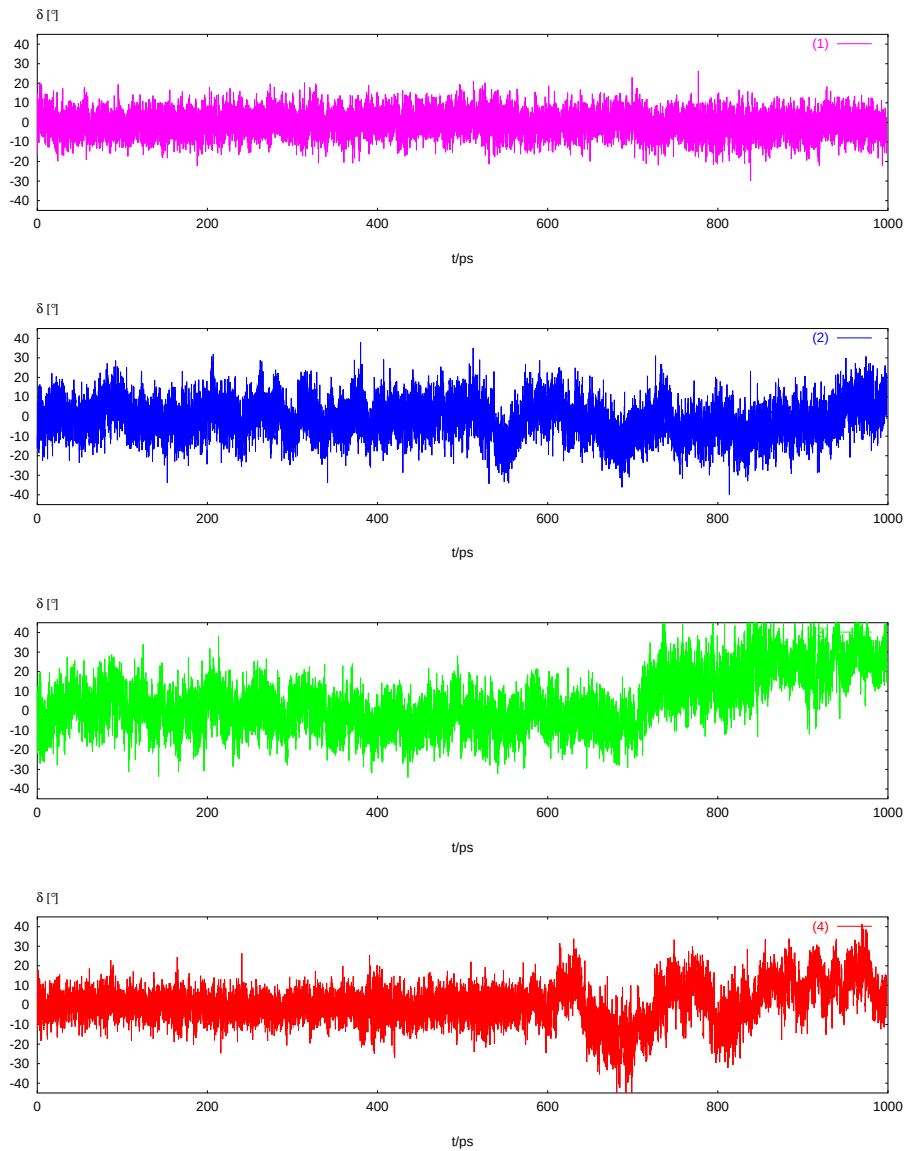


Abb. 5.16: Diederwinkel innerhalb der Ebenen des Systems $d[\text{GGGG}]_4/\text{Mg}$

Des weiteren beobachtet man heftige Winkelauslenkungen innerhalb des durchschrittenen Bereiches sowie in der benachbarten Ebene drei als Reaktion auf die Verschiebung eines Magnesiumions aus dem Käfiginneren in die (bzw. unter die) Ebene vier.

Das Strontiumsystem offenbart ein vergleichbares Verhalten, das an dieser Stelle nicht explizit betrachtet werden soll (die Auftragungen können dem Anhang A.2.4 auf Seite 240 entnommen werden).

Tabelle 5.1 zeigt eine Übersicht der mittleren Diederwinkel mit den zugehörigen Standardabweichungen für die Erdalkalisysteme.

Dabei fallen die verstärkten Fluktuationen des Calciumsystems gegenüber den beiden anderen auf. Offensichtlich bewirken auch an dieser Stelle die Anwesenheit des Calciumions am 3'-Ende sowie die verstärkten Bewegungen der eingeschlossenen Kationen diesen Effekt.

Wie aus Untersuchungen an äquivalenten Alkalisystemen bekannt ist [68], führen „längere“ Kontaktzeiten der Ionen zu den Ebenen zu einer entsprechenden richtungsorientierten Auslenkung. Die dabei auftretenden Schwankungen fallen jedoch deutlich höher aus, als die der hier vorgestellten Magnesium- und Strontiumsysteme.

d[GGGG] ₄	Mg	Ca	Sr
Ebene	$ \langle \delta \rangle_t $	$ \langle \delta \rangle_t $	$ \langle \delta \rangle_t $
1 (3')	0,62° ± 5,91°	0,68° ± 12,71°	0,18° ± 6,32°
2	1,13° ± 9,43°	1,31° ± 10,18°	0,22° ± 9,51°
3	4,41° ± 14,09°	0,34° ± 11,41°	0,85° ± 9,53°
4 (5')	0,56° ± 7,25°	1,36° ± 15,84°	0,26° ± 5,70°

Tabelle 5.1: Beträge der mittleren Diederwinkel mit Standardabweichung für die Systeme d[GGGG]₄/Mg, Ca, Sr

Wie die bisherigen Ergebnisse belegen, ist die hohe Flexibilität der „inneren“ Quadruplexstruktur unabhängig vom jeweils vorliegenden Ionentyp und trägt in hohem Maße zu der Stabilität des Gesamtsystems bei.

Im Folgenden ist nun zu untersuchen, wie sich die Anwesenheit und die Fluktuationen der Erdalkaliionen auf die „äußere“ Struktur z.B. im Bereich des „backbones“ der Quadruplex-G-DNA auswirken.

5.4.4 Die „äußere“ Struktur

Der Abstand der Phosphoratome innerhalb einer Ebene wird als Maß für die nach „außen“ hin sichtbare Ausdehnung der Quadruplexstruktur senkrecht zur helikalen Achse gewählt. Dabei stellt sich die Frage, inwieweit die verschiedenen Ionentypen diese „äußere“ Struktur beeinflussen.

Tab. 5.2 listet die mittleren P-P-Abstände mit den zugehörigen Standardabweichungen für die simulierten Erdalkalisysteme auf.

$d[\text{GGGG}]_4$	Mg	Ca	Sr
Ebene	$\langle d_{(P-P)} \rangle_{t,n} [\text{\AA}]$	$\langle d_{(P-P)} \rangle_{t,n} [\text{\AA}]$	$\langle d_{(P-P)} \rangle_{t,n} [\text{\AA}]$
1 (3')	$15,80 \pm 0,24$	$15,71 \pm 0,35$	$15,66 \pm 0,28$
2	$16,07 \pm 0,25$	$16,48 \pm 0,29$	$16,03 \pm 0,20$
3 (5')	$16,31 \pm 0,26$	$16,66 \pm 0,33$	$16,07 \pm 0,16$

Tabelle 5.2: Mittlere P-P-Abstände mit Standardabweichung innerhalb einer Ebene für die Systeme $d[\text{GGGG}]_4/\text{Mg}$, Ca, Sr

Es zeigt sich, dass für die einzelnen Systeme nahezu gleichwertige Distanzen zwischen den Phosphoratomen einer Ebene vorliegen. Innerhalb der Reihe vom 3'- zum 5'-Ende erkennt man eine leichte Steigerung der Werte, die sich jedoch zumeist im Rahmen der Schwankungsbreite bewegt.

Offensichtlich beeinflusst der Ionentyp nur in geringem Maße diesen Phosphorzwischenraum. Ähnliches wurde bereits bei $d[\text{GGGG}]_4/\text{Alkalisystemen}$ beobachtet [113], die ebenso nur eine schwache Korrelation zwischen Ionentyp und Phosphorabständen aufwiesen. Quantitativ liegen die in dieser Arbeit ermittelten Werte im Bereich der dort simulierten Alkalisysteme, die ebenfalls eine Besetzung der beiden äußeren Käfige aufwiesen.

- $d[\text{GGGG}]_4/\text{Li} \leftrightarrow \langle d_{(P-P)} \rangle_{t,n} = (15,93 \pm 0,20) \text{\AA}$
- $d[\text{GGGG}]_4/\text{Na} \leftrightarrow \langle d_{(P-P)} \rangle_{t,n} = (16,23 \pm 0,19) \text{\AA}$
- $d[\text{GGGG}]_4/\text{K} \leftrightarrow \langle d_{(P-P)} \rangle_{t,n} = (16,21 \pm 0,18) \text{\AA}$

Die mittleren Abstände zwischen den Phosphoratomen innerhalb eines Guanin-Stranges sind in Tab. 5.3 aufgeführt.

Hier zeigt sich erwartungsgemäß ein ebenfalls wenig ionenspezifisches Verhalten. Die „backbone“-Konformation ändert sich auch in Richtung der helikalen Achse nur in geringem Umfang. Die Werte für die einzelnen Stränge unterscheiden sich kaum. Die unterschiedlichen Ionensorten üben dabei keinen signifikanten Einfluss auf die Phosphorabstände aus.

Die individuellen räumlichen und elektrostatischen Anforderungen der verschiedenen interkalierten Kationen an den sie umgebenden Quadruplex werden offensichtlich in hohem Maß durch die Flexibilität der Guaninbasen erfüllt. Speziell die Carbonylsauerstoffatome besitzen die Fähigkeit, sich aus der nahezu planaren Basenanordnung

d[GGGG] ₄	Mg	Ca	Sr
Strang	$\langle d_{(P-P)} \rangle_{t,n}$ [Å]	$\langle d_{(P-P)} \rangle_{t,n}$ [Å]	$\langle d_{(P-P)} \rangle_{t,n}$ [Å]
1	6,97 ± 0,29	6,85 ± 0,26	6,89 ± 0,35
2	6,82 ± 0,21	6,79 ± 0,29	6,92 ± 0,25
3	6,92 ± 0,21	6,91 ± 0,26	6,85 ± 0,22
4	6,84 ± 0,22	6,72 ± 0,20	6,92 ± 0,25

Tabelle 5.3: Mittlere P-P-Abstände mit Standardabweichung innerhalb eines Stranges für die Systeme d[GGGG]₄/Mg, Ca, Sr

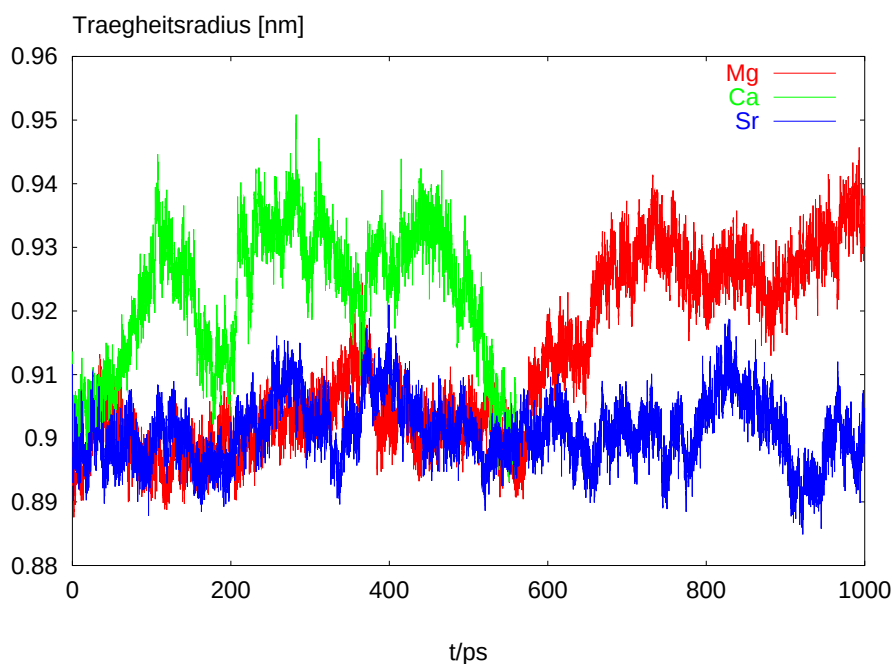
herauszudrehen, um eine „optimale“ Koordination der Kationen zu gewährleisten. Nach außen hin muss sich die Struktur des Tetraplexes dementsprechend wenig verändern, um Ionenfluktuationen auszugleichen.

Eine geeignete „Sonde“ zur Beurteilung von Veränderungen an der „äußeren“ Struktur stellt die Beobachtung der zeitlichen Entwicklung des Trägheitsradius des gesamten Quadruplexes dar. Gegenüber der Untersuchung einzelner Atompositionen bietet sich hierbei der Vorteil, dass die Abstände aller Atome zum Schwerpunkt des Quadruplexes (gewichtet durch ihre jeweilige Masse) in die Berechnung des Trägheitsradius eingehen. Der Verlauf erlaubt somit Aussagen hinsichtlich der „Kompaktheit“ einer bestimmten Gesamtkonformation. Die entsprechenden Auftragungen sind für die Erdalkalisysteme in Abb. 5.17 dargestellt.

Es zeigt sich, wie bereits bei der Diskussion der rms-Werte, dass die Magnesium- und Strontiumsysteme zunächst vollkommen identisch verlaufen. Ein Anstieg des Trägheitsradius im erstgenannten Komplex erfolgt erst mit dem Durchtritt eines Mg²⁺-Ions durch die Ebene am 5'-Ende.

Der Quadruplex mit Strontiumionen behält seine „stabile“ Ausdehnung über den gesamten Simulationszeitraum bei.

Demgegenüber zeigt das Calciumsystem einen wesentlich stärker fluktuierenden Verlauf, bedingt durch die Anwesenheit eines zusätzlichen Kations am 3'-Ende, wie bereits an früherer Stelle ausführlich dargestellt wurde (vergleiche hierzu Kap. 5.1.1). Dies führt zu einer Aufweitung der Ebene eins senkrecht zur helikalen Achse. Die Entfernung dieses Ions bewirkt eine Kontraktion der Ebene, die sich am Verlauf des Trägheitsradius ab ca. 450 ps ablesen lässt.

Abb. 5.17: Trägheitsradien der d[GGGG]₄-Systeme mit Erdalkaliionen

Tab. 5.4 beinhaltet die Mittelwerte der Trägheitsradien. Der Vergleich lässt lediglich unwesentliche Unterschiede innerhalb der Reihe der Mittelwerte erkennen. Die Standardabweichungen verhalten sich analog. Sie bewegen sich in einer Größenordnung von 0,5 % - 1,5 % und sind daher als äußerst gering einzustufen.

d[GGGG] ₄	Mg	Ca	Sr
$\langle r_{Traegheit} \rangle_t$ [nm]	$0,912 \pm 0,013$	$0,923 \pm 0,011$	$0,901 \pm 0,005$

Tabelle 5.4: Mittlere Trägheitsradien mit Standardabweichung für die Systeme d[GGGG]₄/Mg, Ca, Sr

Gegenüber den beobachteten Fluktuationen der Ebenen- bzw. den O6-O6-Abständen sind sie deutlich reduziert, was als Indiz für die Beschränkung konformativer Veränderungen auf begrenzte lokale Bereiche des Quadruplexes gewertet werden kann.

Insgesamt lässt sich feststellen, dass die „Ausdehnung“ der Quadruplexstrukturen nach außen nur in geringem Maße durch die Art der interkalierten Ionensorte bestimmt wird. Sichtbare Effekte, jedoch in beschränktem Umfang, erzielen lediglich die Ionenbewegungen der direkt benachbarten sowie der eingelagerten Kationen.

Wie bereits beschrieben, wird der Zusammenhalt der Tetramer-Einheiten durch die wechselseitigen Anziehungskräfte zwischen Carbonylsauerstoffatomen und komplexierten Erdalkalikationen wesentlich unterstützt. Dabei zeigt die innere O6-Käfigstruktur eine hohe Flexibilität. Ebenso tragen aber auch die nicht kovalenten Bindungsanteile zwischen den DNA-Strängen zur Stabilisierung des Gesamtsystems bei. Dies wird im nächsten Abschnitt eingehender untersucht.

5.5 Wasserstoffbrückenbindungen

Benachbarte Guanineinheiten innerhalb einer Ebene sind zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen ihren polarisierten Atombereichen befähigt. Dabei wird die Existenz einer Wasserstoffbrückenbindung zum einen durch den Abstand zwischen positiv polarisierten Wasserstoffatomen und negativ polarisierten Sauerstoff- bzw. Stickstoffatomen bestimmt. Zum anderen muss der Winkel zwischen Donor und Akzeptor bestimmte Werte annehmen. Als Kriterium für das Vorhandensein einer H-Brücke wird ein Abstand von weniger als $2,5 \text{ \AA}$ angenommen sowie ein Winkel, der größer als 135° ist.

Dabei kann für die Anordnung der Guaninbasen in einer Tetramerebene idealtypisch zwischen zwei Formen unterschieden werden. Diese bilden sich entsprechend den lokalen räumlichen Anforderungen aus (siehe Abb. 5.18).

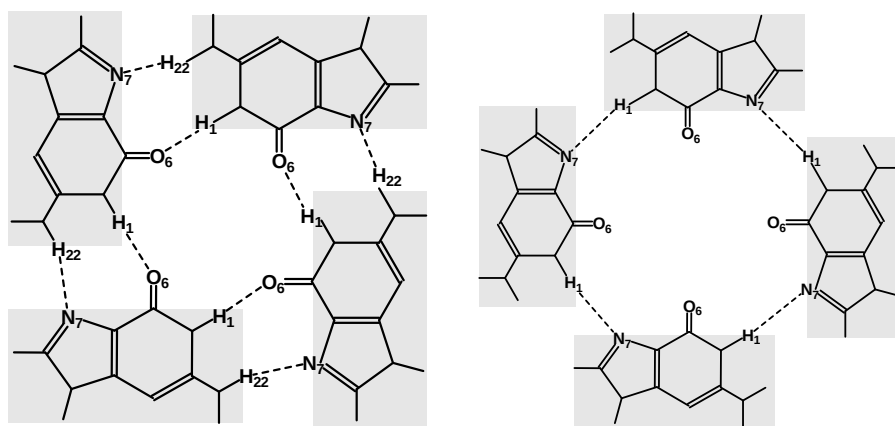


Abb. 5.18: Zwei mögliche Wasserstoffbrückenmuster (links Hoogsteen-Typ, rechts N7-H1-Muster) [113]

Das bekannte Hoogsteen-Muster mit seinen acht H-Brücken ist links, das alternative N7-H1-Muster ist rechts abgebildet. Man erkennt deutlich, dass diese bislang

weitestgehend unbekannte Anordnungsmöglichkeit zusätzlichen Raum für interkalierte Ionen bietet. Dies geschieht jedoch auf Kosten einer reduzierten Anzahl an Wasserstoffbrückenbindungen (insgesamt vier) zwischen den jeweiligen Guaninbasen. In der „Realität“ können durch Verzerrungen ebenso Mischformen auftreten.

Die Einflüsse von Ionensorte und Ionendynamik auf die bevorzugte Ausbildung eines bestimmten Wasserstoffbrückenmusters wird im Folgenden eingehender untersucht. Abb. 5.19 zeigt für die Ebene drei des Magnesiumsystems die Veränderung in der Gesamtwasserstoffbrückenanzahl sowie den jeweiligen Anteil an Hoogsteen- und N7-H1-Brücken.

Man erkennt deutlich, dass durch die Anwesenheit eines Ions im Käfig am 5'-Ende und dem damit verbundenen Raumbedarf das geräumigere N7-H1-Muster bevorzugt wird. Aufgrund der Nähe des Magnesiumions zur Ebene drei, treten abstoßende Lennard-Jones-Wechselwirkungen zu den angrenzenden Carbonylsauerstoffatomen auf, die zu einer „Aufweitung“ dieser Quartettebene führen. Die Hoogsteen-Anordnung tritt dabei im Bereich bis 650 ps vollständig in den Hintergrund.

Erst durch das Hinaustreten des Kations am 5'-Ende kommt es zur Ausbildung einer Mischform beider Muster. Dabei bewirkt die Zunahme der einen Anordnung die Reduktion der anderen und umgekehrt, jeweils abhängig von der Position des eben angesprochenen Magnesiumions (siehe hierzu auch Abb. 5.6).

Eine äquivalente Auftragung für die Ebene vier zeigt die Abb. 5.20. In Analogie zu den Verhältnissen innerhalb der zuvor beschriebenen Nachbarebene wird auch hier das geräumigere N7-H1-Muster dem Hoogsteen-Typ vorgezogen.

Der Verlauf ist jedoch über den gesamten Simulationszeitraum von wesentlich stärkeren Fluktuationen gekennzeichnet, offensichtlich bedingt durch den geringeren Abstand der Carbonylsauerstoffe zu einem der interkalierten Kationen. Durch den größeren Raumbedarf während des Ionendurchtritts bzw. des Ionenaufenthalts innerhalb der Ebene reduziert sich die Gesamtanzahl an Wasserstoffbrückenbindungen. Es ist deutlich zu erkennen, dass die eingenommene Position des Magnesiumions die Ausbildung von H-Brücken im zuvor definierten Sinne verhindert.

Auf eine explizite Darstellung der Verhältnisse innerhalb der Ebenen eins und zwei wird an dieser Stelle verzichtet. Sie zeigen ein analoges Verhalten mit stärkeren Schwankungen hinsichtlich der Anzahl an H-Brücken in der terminalen Ebene gegenüber dem entsprechenden innen liegenden Quartett.

Wie bereits bei den vorhergehenden Untersuchungen, zeigt sich ebenfalls an dieser Stelle eine große Ähnlichkeit im Verhalten des Strontiumsystems und des entsprechenden Mg^{2+} -Quadruplexes.

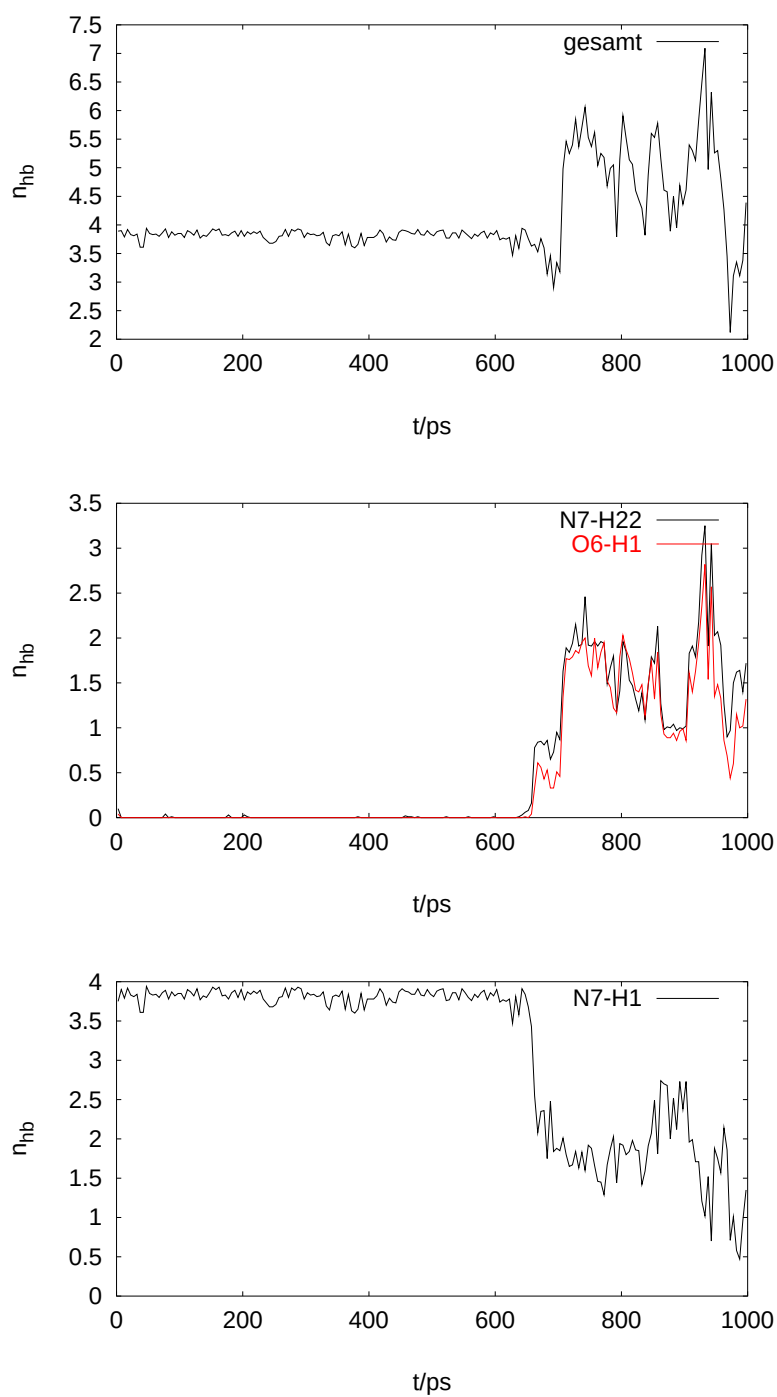


Abb. 5.19: Gesamtanzahl: Wasserstoffbrücken, Hoogsteen-Anteil, N7-H1-Anteil in Ebene 3 des Systems d[GGGG]₄/Mg, gemittelt wurde jeweils über einen Zeitbereich von 5 ps

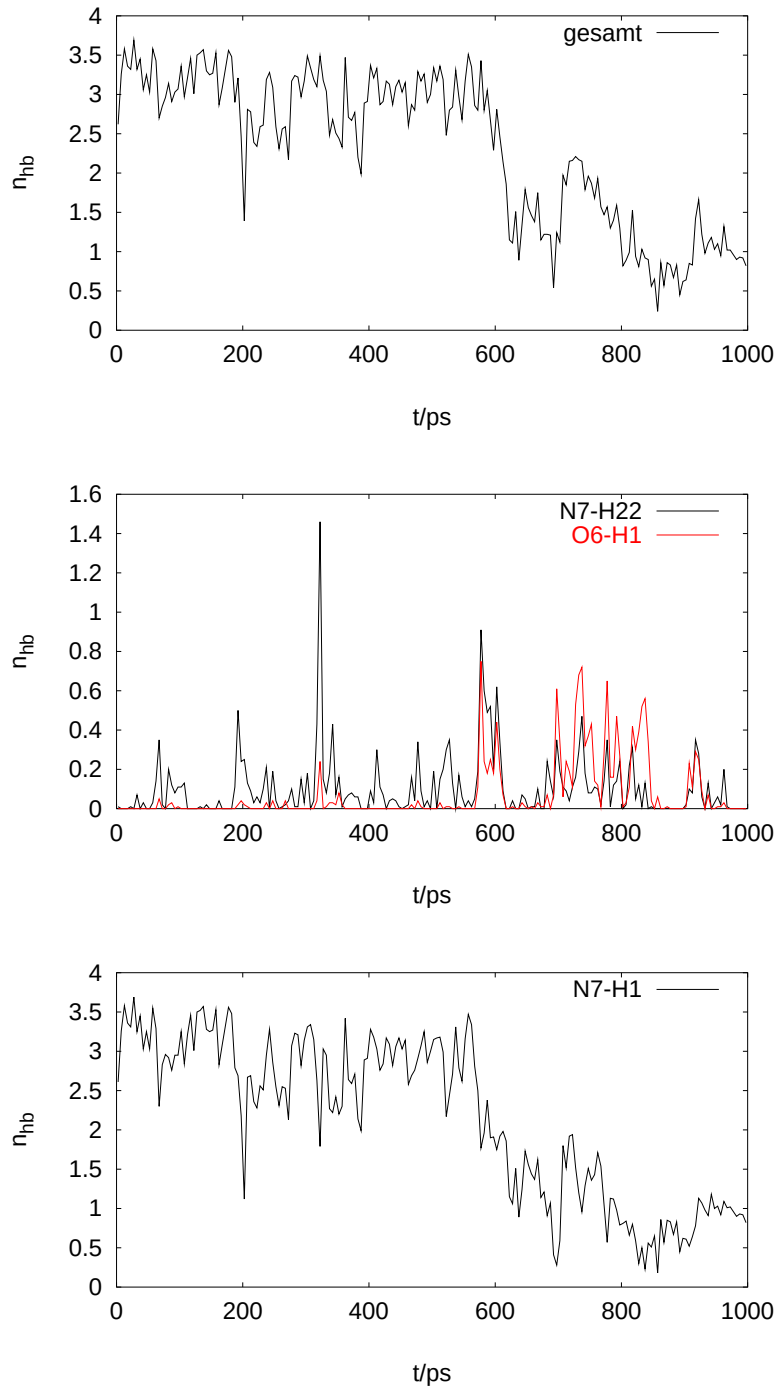


Abb. 5.20: Gesamtanzahl: Wasserstoffbrücken, Hoogsteen-Anteil, N7-H1-Anteil in Ebene 4 des Systems d[GGGG]₄/Mg, gemittelt wurde jeweils über einen Zeitbereich von 5 ps

Obwohl die Sr^{2+} -Ionen deutlich größer sind, kommt es zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken in vergleichbarer Anzahl. Die Abb. A.6 und A.7 im Anhang A.2.5 untermauern dies exemplarisch. Die deutliche Bevorzugung des N7-H1-Musters gegenüber dem Hoogsteen-Typ, verbunden mit den zuvor diskutierten stärkeren Schwankungen in den äußeren Ebenen, ist auch für diese Ionensorte charakteristisch.

Das $\text{d[GGGG]}_4/\text{Ca}$ -System zeigt demgegenüber ein gänzlich anderes Verhalten. Obwohl die O6-O6-Abstände innerhalb der Ebenen aller drei Erdalkali-Quadruplexe vergleichbar sind, erhält man an dieser Stelle einen deutlich erhöhten Hoogsteen-Anteil. Der N7-H1-Anteil wird jedoch nicht vollständig zurückgedrängt, sodass sich ein gemischtes Muster einstellt (siehe Abb. 5.21 und 5.22). Dies führt zu einer höheren Gesamtanzahl an Wasserstoffbrücken.

Die Auswirkungen von Ebenenbewegungen auf die Anzahl bzw. das Muster der Wasserstoffbrücken lassen sich sehr gut im Bereich um 220 ps anhand der Ebene vier beobachten. Hier erfolgt eine starke Verschiebung in Richtung der helikalen Achse, verbunden mit einer deutlichen Aufweitung der Ebene, die zu einem Rückgang der Gesamtanzahl an H-Brücken auf den Wert Null führt.

Unterschiede hinsichtlich der Schwankungsintensität bezogen auf die Position der Ebene im Quadruplex sind nicht zu beobachten. Die Ebenen eins und zwei weisen ähnliche Muster auf und werden an dieser Stelle nicht näher betrachtet.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Verschiebungen der Guaninbasen, ebenso wie die Vergrößerung des Abstands der Carbonylsauerstoffatome, bevorzugt bei Ebenendurchtritten von Kationen auftreten, wie auch schon in früheren Arbeiten bei den entsprechenden Alkali-Modellsystemen beobachtet wurde [113].

Die Anwesenheit von Ionen in direkter Nachbarschaft zu einer Ebene erhöht die Tendenz zur Ausbildung des N7-H1-Musters, indem die repulsiven Lennard-Jones-Wechselwirkungen zwischen Carbonylsauerstoffatomen und Kationen durch eine Abstandsvergrößerung reduziert werden. Die Bevorzugung eines H-Brückentyps wird jedoch nicht allein durch den Abstand eines Ions zu einer Quartettebene bestimmt. Dies zeigt sich deutlich anhand der vollkommen unterschiedlichen Brückenmuster bei nahezu identischen Besetzungsmustern innerhalb der Erdalkalireihe. Vielmehr spielt die Ionenspezifität eine ausgeprägte Rolle, die sich in dem Zusammenspiel von Lennard-Jones- und Coulomb-Wechselwirkungen äußert. So kann für die Magnesium- bzw. Strontiumsysteme eine ausgeprägte Tendenz zur Ausbildung des geräumigeren N7-H1-Musters beobachtet werden, wohingegen das entsprechende Calciumsystem bevorzugt Mischformen aufweist.

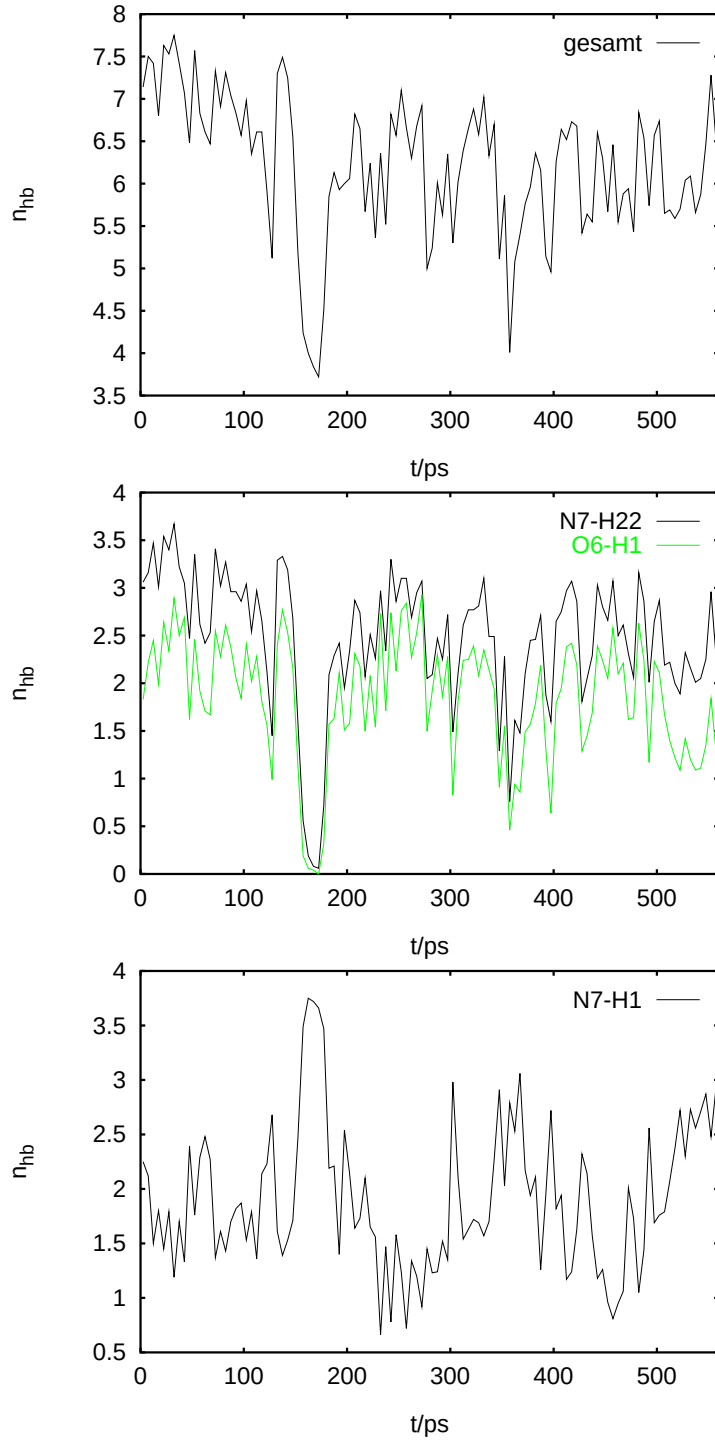


Abb. 5.21: Gesamtanzahl: Wasserstoffbrücken, Hoogsteen-Anteil, N7-H1-Anteil in Ebene 3 des Systems d[GGGG]₄/Ca, gemittelt wurde jeweils über einen Zeitbereich von 5 ps [68]

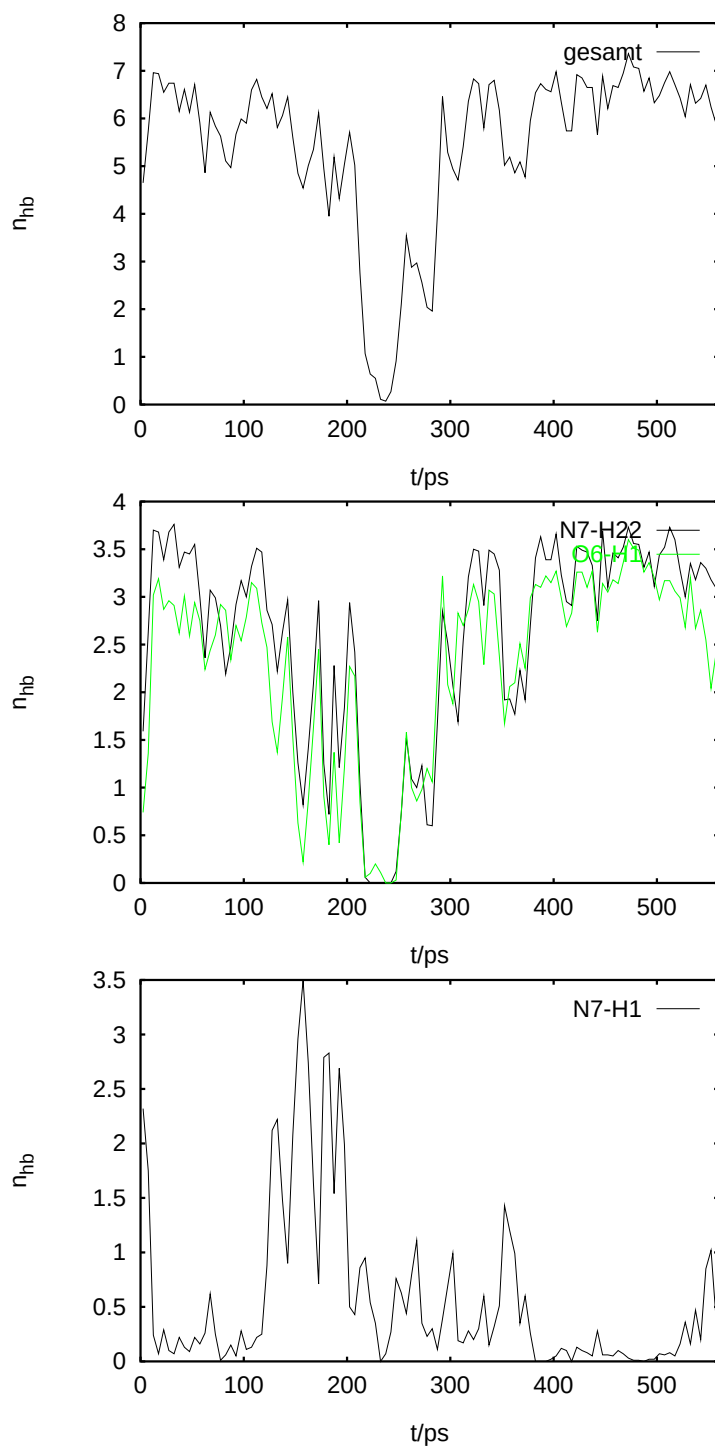


Abb. 5.22: Gesamtanzahl: Wasserstoffbrücken, Hoogsteen-Anteil, N7-H1-Anteil in Ebene 4 des Systems d[GGGG]₄/Ca, gemittelt wurde jeweils über einen Zeitbereich von 5 ps [68]

5.6 Energetische Betrachtungen

Die Ursachen konformativer und geometrischer Veränderungen innerhalb des Quadruplexsystems sind eng verknüpft mit energetischen Wechselwirkungen des gesamten Assoziats bzw. individueller Unterstrukturen.

MD-Simulationen bieten dabei die Möglichkeit, eine Vielzahl von Größen, wie z.B. kinetische und potenzielle Energien (allgemein) oder spezielle Coulomb- bzw. Lennard-Jones-Wechselwirkungen hinsichtlich ihrer zeitlichen Entwicklung zu untersuchen und sie mit auftretenden Konformationen zu korrelieren (prinzipiell sind die Energieterme aus Gl. 3.3 zugänglich). Insbesondere wird im Folgenden die Ionendynamik zu quantitativen Energiebetrachtungen in Beziehung gesetzt.

Die Gesamtenergie bzw. die gesamte potenzielle Energie beinhaltet Werte für alle Atome des Systems. Daher sind Effekte, die sich lediglich auf eine „kleine“ Unter- menge aller Atome beziehen (z.B. zwischen DNA und Ionen im näheren Bereich es Quadruplexes), in solch umfassenden Auftragungen nur schwer zu erkennen (siehe dazu Abb. A.8 und Abb. A.9 in Anhang A.2.6 auf Seite 243). Die MD-Simulation ermöglicht an dieser Stelle, sich mit den spezifischen Energieverläufen der Wechselwirkungen von Unterstrukturen zu beschäftigen, so z.B. denen zwischen DNA und CI ($CI \equiv center-ion$) bzw. innerhalb der DNA.

Die Abb. 5.23 und 5.24 zeigen die entsprechenden Verläufe für das Magnesiumsystem.

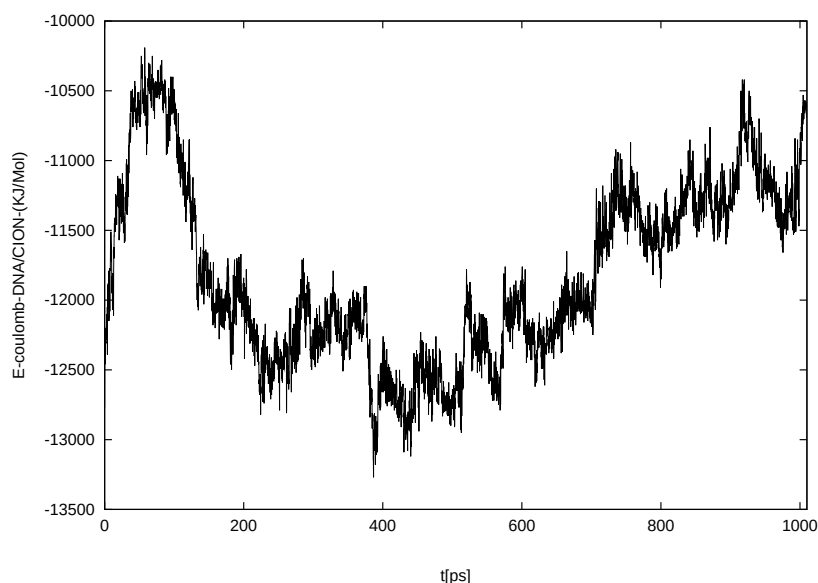


Abb. 5.23: Verlauf der Coulomb-Energie DNA/CI für das System $d(GGGG)_4/Mg$

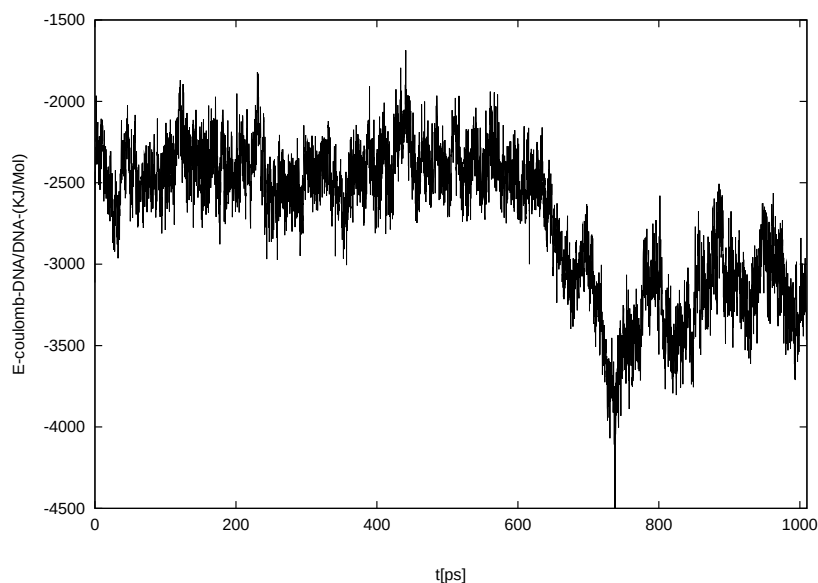


Abb. 5.24: Verlauf der Coulomb-Energie DNA/DNA für das System $d(\text{GGGG})_4/\text{Mg}$

Es wird deutlich, dass der Ionendurchgang durch die Ebene vier nach ca. 600 ps zu einer Verringerung der anziehenden Coulomb-Wechselwirkungen zwischen DNA und interkalierten Ionen führt. Gleichzeitig beobachtet man eine Verstärkung der bindenden elektrostatischen Wechselwirkung innerhalb der DNA, der den zuvor beschriebenen Effekt fast zu kompensieren vermag.

Die beiden Abbildungen spiegeln die Komplexität der Problematik wider, gleichzeitig unterstreichen sie aber auch den hohen Grad an Flexibilität, den ein solches Quadruplexsystem bietet.

Eine Veränderung in lokalen Bereichen des untersuchten Systems hat weitreichende Auswirkungen hinsichtlich der energetischen Wechselwirkungen. Diese sind wiederum aneinander „gekoppelt“ und ermöglichen damit die Kompensation destabilisierender Teileffekte durch das Prinzip von *Aktio* und *Reaktio*.

Abb. 5.25 zeigt den zeitlichen Verlauf der Coulomb-Energie zwischen DNA und CI für das Strontiumsystem. Er ist gekennzeichnet durch eine Verstärkung der bindenden elektrostatischen Wechselwirkungen im Verlauf der Simulation.

Zwischenzeitlich treten Energieerhöhungen auf, die auf der Suche nach einem Zustand möglichst geringen Gesamtenergieinhaltes durch den verwendeten Algorithmus verursacht werden und den normalen Verlauf einer Simulation begleiten.

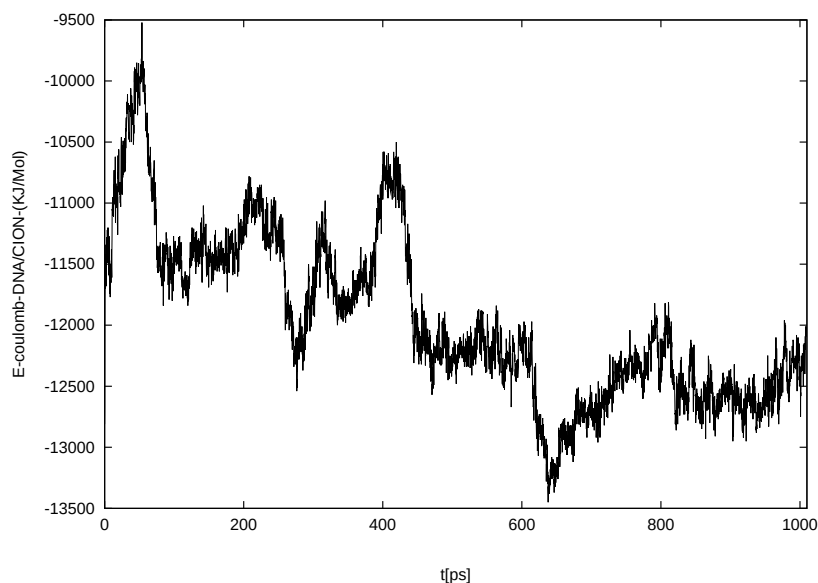


Abb. 5.25: Verlauf der Coulomb-Energie DNA/CI für das System d(GGGG)₄/Sr

Tab. 5.5 gibt eine Übersicht zeitlich gemittelter Energietermine für die untersuchten Erdalkalisysteme.

Wie bereits aus Voruntersuchungen bekannt ist [68], eignet sich die Betrachtung der Summe aus Coulomb- und Lennard-Jones-Termen, die sich auf DNA und Zentralionen beziehen, am besten zur Beurteilung der Stabilisierung der eigentlichen Quadruplex-DNA. Dazu kommen Hydratationseffekte der Ionen, der DNA sowie die Wechselwirkungen mit äußeren Ionen (*bulk*), die in der Gesamtenergie bzw. der gesamten potenziellen Energie enthalten sind, jedoch an dieser Stelle nicht explizit betrachtet werden.

Die Unterschiede in den Energietermen der d[GGGG]₄-Systeme mit Magnesium- bzw. Strontiumionen fallen sehr gering aus. Beide Systeme bestätigen auch hinsichtlich ihres Energieprofils die bereits zuvor diskutierten guten Komplexierungseigenschaften. Im Vergleich zu dem entsprechenden Calciumsystem sind sie deutlich energetisch bevorzugt.

$$Mg^{2+} \approx Sr^{2+} > Ca^{2+}$$

Man sollte an dieser Stelle Vorsicht wahren hinsichtlich der Aussage über eine absolute Stabilitätsreihenfolge. Die Simulationszeiträume sind zwar im Rahmen einer MD-Simulation als recht hoch zu betrachten, stellen jedoch nur einen kleinen Bereich auf der Zeitachse dar, den Systeme unter Laborbedingungen zur Erreichung eines Gleichgewichtszustandes zur Verfügung haben.

d[GGGG] ₄	Mg	Ca[68]	Sr
$\overline{E}_{tot}[kJ/mol]$	$-6,27 \cdot 10^4$	$-5,39 \cdot 10^4$	$-6,25 \cdot 10^4$
σ	$0,08 \cdot 10^4$	$0,03 \cdot 10^4$	$0,09 \cdot 10^4$
$\overline{E}_{pot-tot}[kJ/mol]$	$-7,14 \cdot 10^4$	$-6,25 \cdot 10^4$	$-7,12 \cdot 10^4$
σ	$0,08 \cdot 10^4$	$0,04 \cdot 10^4$	$0,09 \cdot 10^4$
$\overline{E}_{coul-DNA/DNA}[kJ/mol]$	$-2,70 \cdot 10^3$	$-3,44 \cdot 10^3$	$-2,44 \cdot 10^3$
σ	$0,44 \cdot 10^3$	$0,30 \cdot 10^3$	$0,19 \cdot 10^3$
$\overline{E}_{coul-DNA/CI}[kJ/mol]$	$-11,81 \cdot 10^3$	$-5,81 \cdot 10^3$	$-11,95 \cdot 10^3$
σ	$0,64 \cdot 10^3$	$0,26 \cdot 10^3$	$0,69 \cdot 10^3$
$\overline{E}_{coul-CI/CI}[kJ/mol]$	$14,22 \cdot 10^2$	$6,10 \cdot 10^2$	$14,03 \cdot 10^2$
σ	$5,47 \cdot 10^2$	$2,00 \cdot 10^2$	$4,52 \cdot 10^2$
$\overline{E}_{lj-DNA/DNA}[kJ/mol]$	$-1,33 \cdot 10^3$	$-1,30 \cdot 10^3$	$-1,35 \cdot 10^3$
σ	$0,04 \cdot 10^3$	$0,03 \cdot 10^3$	$0,03 \cdot 10^3$
$\overline{E}_{lj-DNA/CI}[kJ/mol]$	$18,06 \cdot 10^1$	$0,35 \cdot 10^1$	$13,74 \cdot 10^1$
σ	$3,15 \cdot 10^1$	$1,37 \cdot 10^1$	$2,13 \cdot 10^1$
$\overline{E}_{lj-CI/CI}[kJ/mol]$	$-5,98 \cdot 10^{-4}$	$-1,56 \cdot 10^{-1}$	$-2,12 \cdot 10^{-2}$
σ	$4,57 \cdot 10^{-4}$	$1,57 \cdot 10^{-1}$	$0,51 \cdot 10^{-2}$
$\overline{E}_{coul} + \overline{E}_{lj}[kJ/mol]$	$-142,44 \cdot 10^2$	$-99,37 \cdot 10^2$	$-141,99 \cdot 10^2$
$(\overline{E}_{coul} + \overline{E}_{lj})_{DNA/CI}[kJ/mol]$	$-116,31 \cdot 10^2$	$-56,86 \cdot 10^2$	$-118,11 \cdot 10^2$

Tabelle 5.5: Mittlere Gesamtenergie, gesamte potentielle Energie sowie Coulomb- (DNA/CI) (CI/CI) (DNA/DNA) und entsprechende Lennard-Jones-Energien für die Erdalkalisysteme

Kapitel 6

Der Einfluss äußerer Bedingungen

Das Ergebnis einer *Molekulardynamischen Simulation* wird in erheblichem Maße durch die Wahl der äußeren Parameter beeinflusst. Dabei spielen der Druck und die Temperatur eine wesentliche Rolle (vergleiche hierzu Abschnitt 6.2). Ebenso beeinflussen die Startstrukturen (Anordnung der Atome in der Simulationsbox) [113] mit den zugehörigen Geschwindigkeitsvektoren eines jeden Atoms den Ausgang des Computerexperimentes.

Im folgenden Kapitel werden daher Veränderungen der äußeren Faktoren vorgenommen, um ihre Einflüsse auf den weiteren Verlauf der Simulation abschätzen zu können. Dies ermöglicht Rückschlüsse sowohl hinsichtlich der Stabilität als auch der resultierenden strukturellen Veränderungen der Quadruplex-G-DNA.

6.1 Die Startbedingungen

Die während einer Simulation aufgezeichneten Trajektorien reagieren sehr empfindlich auf kleine Unterschiede innerhalb der Startbedingungen [45]. Der Ort, den ein Atom des Ensembles zu einem Zeitpunkt t einnimmt, hängt von den Positionen aller anderen Systematome $\mathbf{r}^N(0)$ sowie deren Geschwindigkeiten $\mathbf{v}^N(0)$ zu Beginn der Simulation ab:

$$\mathbf{r}(t) = f[\mathbf{r}^N(0), \mathbf{v}^N(0); t] \quad (6.1)$$

Verändert man die Geschwindigkeit eines oder auch mehrerer Atome um einen Betrag ζ , so resultiert daraus ein veränderter Wert $\mathbf{r}^*$ zum Zeitpunkt t , da die einzelnen Teilchen untereinander in direkter Wechselwirkung stehen und sich somit gegenseitig beeinflussen:

$$\mathbf{r}^*(t) = f[\mathbf{r}^N(0), \mathbf{v}^N(0) + \zeta; t] \quad (6.2)$$

Die Differenz zwischen $\mathbf{r}(t)$ und $\mathbf{r}^*(t)$ wird als $\Delta\mathbf{r}(t)$ bezeichnet und steht in direkter Proportionalität zu der Geschwindigkeitsveränderung. Für kurze Zeitintervalle ergibt sich eine lineare Abhängigkeit, wobei der Koeffizient von ζ exponentiell divergiert:

$$|\Delta\mathbf{r}(t)| \sim \zeta e^{\lambda t} \quad (6.3)$$

λ wird als *Lyapunov*-Exponent bezeichnet und ist verantwortlich für die Divergenz der Trajektorien.

Untersuchungen an einem Lennard-Jones-System haben gezeigt, dass bereits die geringe Geschwindigkeitsveränderung zweier Teilchen (Gesamtanzahl 1000) ausreicht, um nach einer Simulationsdauer von ca. 1000 Zeitschritten rms-Werte in der Größenordnung von 10 (reduzierte Einheiten) zu erhalten. Die zu Beginn der Simulation hinsichtlich der Atompositionen übereinstimmenden Trajektorien sind bereits nach dieser kurzen Zeit hochgradig unkorreliert.

Hierbei ist zu beachten, dass die Summe der „reinen“ quadratischen Abweichungen berücksichtigt wurde, im Gegensatz zu der bereits bei den Erdalkalisystemen angewendeten Vorgehensweise, in der vor der Berechnung der rms-Werte jeweils die Atome der DNA zum Zeitpunkt t „möglichst genau“ über die zum Zeitpunkt t_0 gelegt werden, um gezielte Aussagen über die „tatsächlichen“ Veränderungen innerhalb der lokalen Quadruplexstruktur machen zu können.

Strukturen, Stabilitäten und Ionenbewegungen

Im Rahmen dieser Arbeit dient ein equilibriertes d[GGGG]₄/K-System als Ausgangsbasis (siehe Abb. 6.1).

Ausgehend von einem von TÖHL [113] benutzten Besetzungsmuster, werden die Geschwindigkeiten der interkalierten Kaliumionen zu Beginn der eigentlichen Aufzeichnungsphase der Trajektorie systematisch verändert, um die Auswirkungen veränderter Krafteinwirkungen der Kationen auf den Quadruplex zu untersuchen. Die daraus resultierenden fünf Systeme mit unterschiedlichen Startbedingungen werden im Anschluss daran jeweils über einen Zeitraum von 200 ps simuliert (vergleiche hierzu Tab. 4.3).

Abb. 6.2 und 6.3 zeigen die Folgestrukturen dieser Systeme zum Ende der Simulationsphase. Die Systeme K(1) und K(2) unterscheiden sich lediglich hinsichtlich der Geschwindigkeitskoordinaten des Kaliumions zwei (Käfig am 5'-Ende).¹ Eine komplette Reduzierung der Bewegung in dem System K(2) führt, entgegen der Beobachtung in K(1), zu einem Herausdrehen der Guanin-Basen aus einer nahezu planaren Anordnung, wobei es jedoch nicht zu einem „Schmelzen“ der Gesamtstruktur kommt.

¹ $v_x(\text{K}(1)-2)=0$; $v_{xyz}(\text{K}(2)-2)=0$

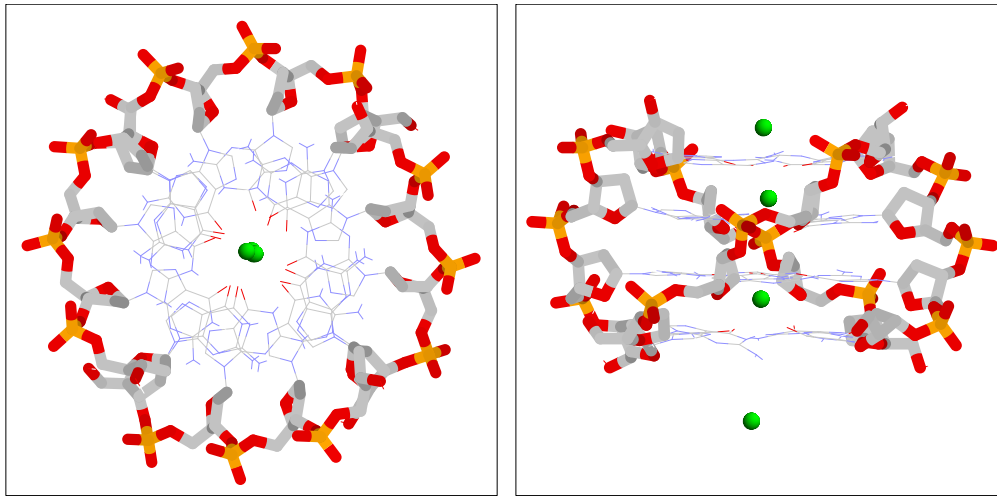


Abb. 6.1: Startstrukturen der simulierten Systeme $d(\text{GGGG})_4/\text{K}(n)$ ($n=1-5$) zu Beginn der Simulationsphase (Aufsicht und Seitenansicht)

Innerhalb der Untersuchung des Systems K(3), das durch das „Einfrieren“ der Bewegung aller vier K^+ -Ionen ($v_{xyz}(\text{K}(3)-m)=0$ ($m=1,4$) zum Zeitpunkt $t=0$ ps) im Nahbereich der DNA gekennzeichnet ist, lassen sich ähnliche Veränderungen nicht beobachten. Offenbar bewirkt das verstärkte Herabsetzen der Kinetik aller vier Ionen, dass, bedingt durch die starke Wechselwirkung mit den Carbonylsauerstoffatomen und einer symmetrisch gleichmäßigen Verteilung, die Quadruplexstruktur vollkommen erhalten bleibt.

Innerhalb des Systems K(4) werden die Geschwindigkeiten der interkalierten Ionen sowie des assoziierten Ions am 3'-Ende jeweils um 10 % erhöht. Dies führt besonders am 3'-Ende zu verstärkten Aufwindungserscheinungen, die die Stabilität des Gesamtsystems merklich schwächen. Insbesondere ist der Eintritt des Kaliumions K(4)-2 in die Ebene drei zu beobachten.

Das System K(5) weist sowohl eine Erhöhung (K(5)-2) als auch eine Erniedrigung (K(5)-3) einzelner Ionengeschwindigkeiten um jeweils 20 % auf. Im Laufe der Simulation kommt es ebenfalls zu einem Übertritt des Ions aus dem Käfig am 5'-Ende in die Ebene drei. Entgegen den Deformationen der Tetraplexstruktur im zuvor beschriebenen Fall, lassen sich an dieser Stelle jedoch keine signifikanten Konformationsänderungen beobachten. Offensichtlich führt die entgegengesetzte Beschleunigung der interkalierten Kationen (K(5)) zu einer sich ausgleichenden Wechselwirkung mit dem Quadruplex. Demgegenüber bewirkt die Geschwindigkeitsänderung der Kaliumionen im System K(4) deutliche strukturelle Veränderungen, als Folge der sich akkumulierenden, gleichgerichteten Krafteinwirkungen auf den Tetraplex.

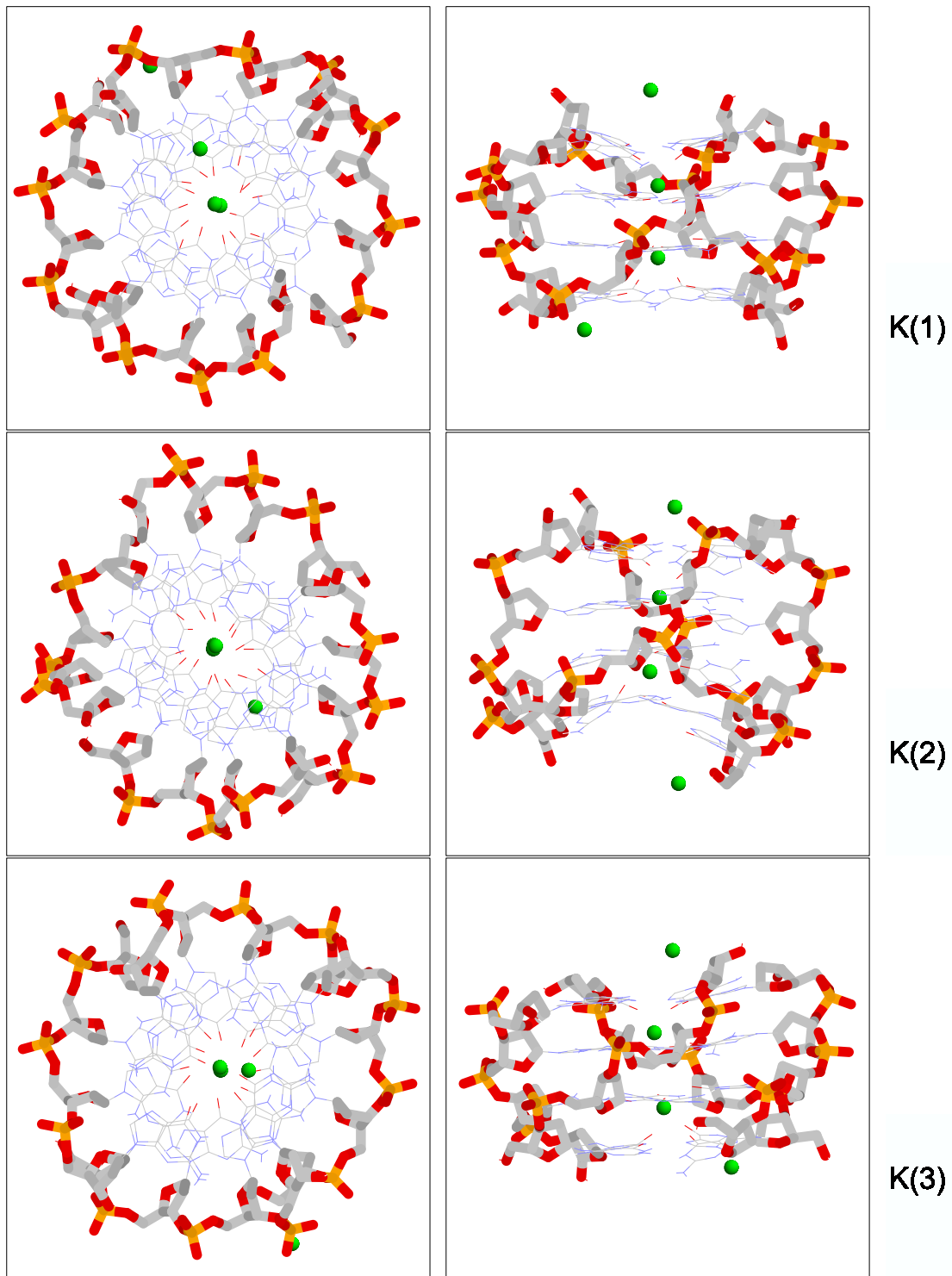


Abb. 6.2: Folgestrukturen der simulierten $d(GGGG)_4$ -Systeme mit unterschiedlichen Startbedingungen K(1) - K(3) (nach 200 ps) (Aufsicht und Seitenansicht)

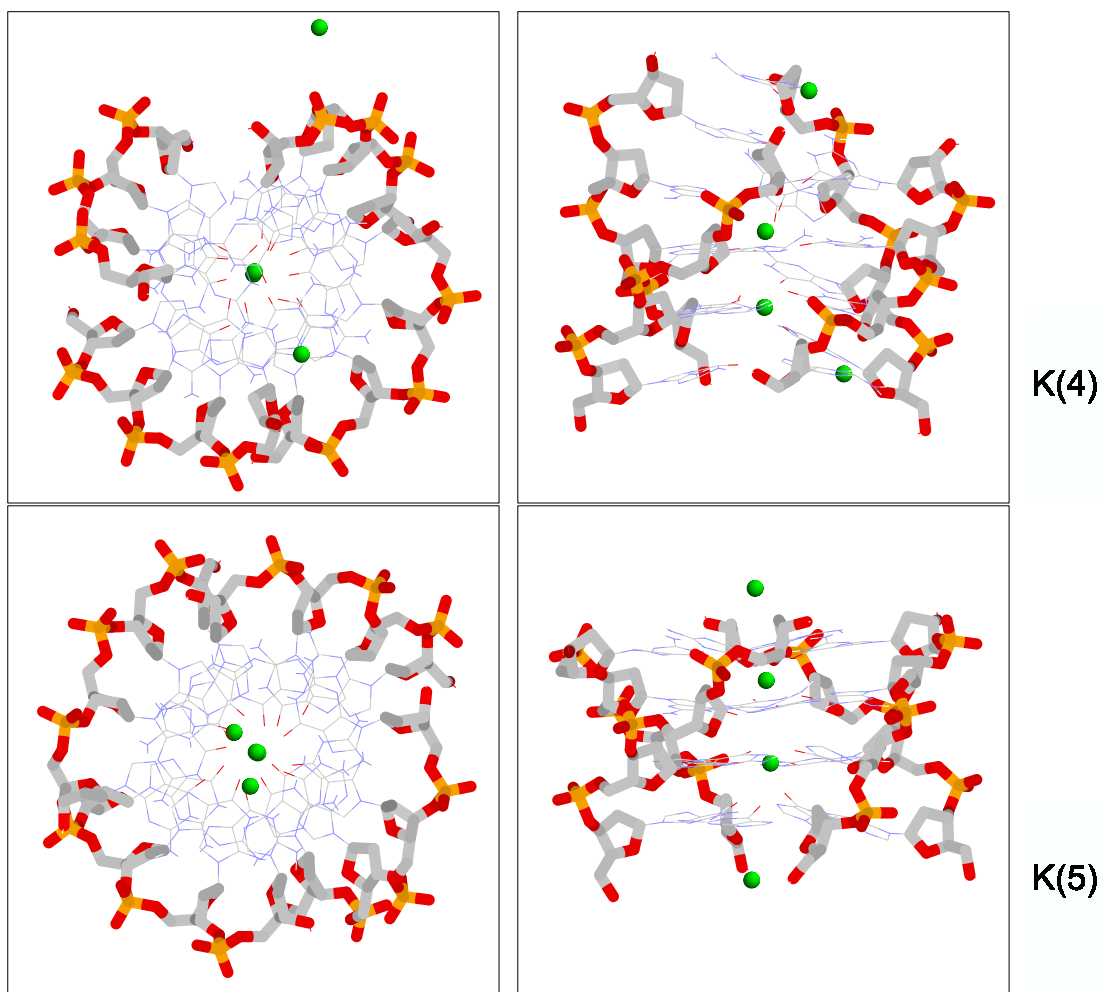


Abb. 6.3: Folgestrukturen der simulierten d(GGGG)₄-Systeme mit unterschiedlichen Startbedingungen K(4) - K(5) (nach 200 ps) (Aufsicht und Seitenansicht)

Ein Vergleich der rms-Werte in Abb. 6.4 bestätigt die sich durch die Endstrukturbetrachtungen ergebenden Aussagen. Bis auf K(4) liegen alle untersuchten Systeme mit rms-Werten von 1,2-1,3 Å in einem Bereich, der den Ergebnissen der Voruntersuchungen entspricht [113]. Die Aufwindungserscheinungen innerhalb des Simulationsverlaufs von K(4) treten insbesondere durch den gegenüber den anderen deutlich erhöhten Mittelwert sowie die erheblich vergrößerte Standardabweichung in Erscheinung, als Folge der oben erwähnten Strukturfluktuationen am 3'-Ende.

Wie die Betrachtung der auftretenden Folgestrukturen zeigte, üben die jeweiligen Startbedingungen einen signifikanten Einfluss auf die Entwicklung der Trajektorie im weiteren Verlauf der Simulation aus.

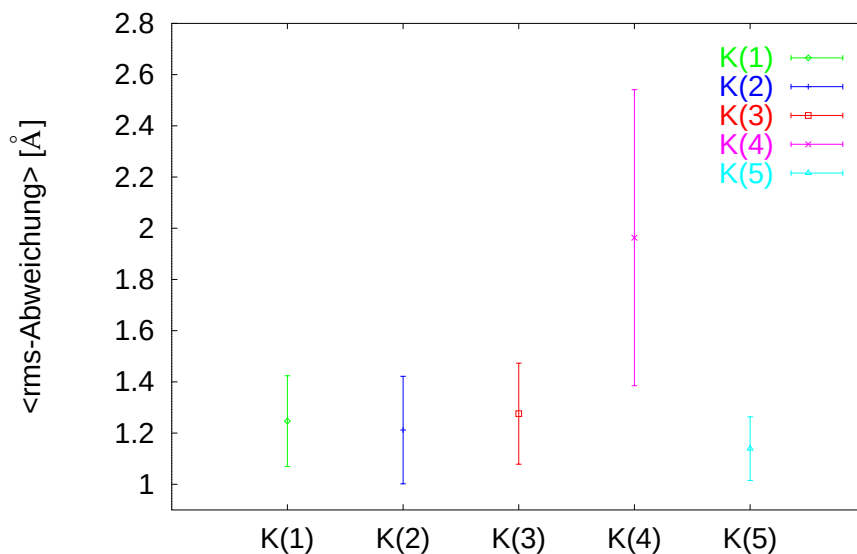


Abb. 6.4: Mittlere rms-Abweichungen mit Standardabweichungen für die Systeme K(1) - K(5) mit verschiedenen Startbedingungen

Veränderungen der äußeren Bedingungen führen in diesem Zusammenhang zu intermediären strukturellen Unterschieden. Der Grad der „Störung“ ist dabei entscheidend dafür, ob sich das Tetraplexsystem erneut stabilisiert oder eine „irreparable“ Destabilisierung auftritt, die zu ausgeprägten Fluktuationen der Tetraplexkonformation sowie der interkalierten Ionen führt.² Der Vergleich mit einem äquivalenten d[GGGG]₄/K-System von TÖHL [113] bestätigt die Vermutung, dass die Ausbildung eines bevorzugten Besetzungsmusters massgeblich durch die Sorte der beteiligten Gegenkationen bestimmt wird, wobei die Auswahl der Startbedingungen einen untergeordneten, jedoch nicht zu vernachlässigenden Effekt ausüben.

Betrachtet man die Bewegung der Kationen entlang der Kanalachse über den Simulationszeitraum von 200 ps, so stellt man fest, dass eine Besetzung der beiden äußeren Käfige begünstigt wird, wobei eine leichte Verschiebung der interkalierten Ionen in Richtung der innen liegenden Ebenen zu beobachten ist. Dies ist exemplarisch anhand des Systems d[GGGG]₄/K(1) (Abb. 6.5) dargestellt. Die Verläufe von K(2), K(3) sowie K(5) sind dazu äquivalent (siehe dazu Anhang A.3.1 auf Seite 245).

Eine Ausnahme bildet auch an dieser Stelle das System K(4) (siehe Abb. 6.6). Seine Ionenbewegungen entlang der helikalen Achse sind wesentlich stärkeren Fluktuationen unterworfen. Bereits nach ca. 20 ps tritt das Kaliumion K(4)-3 aus dem

²Zu beachten ist an dieser Stelle, dass die beschränkte Simulationsdauer nur einen kurzen Einblick in das dynamische Verhalten dieser Quadruplexsysteme erlaubt. Die beobachteten,

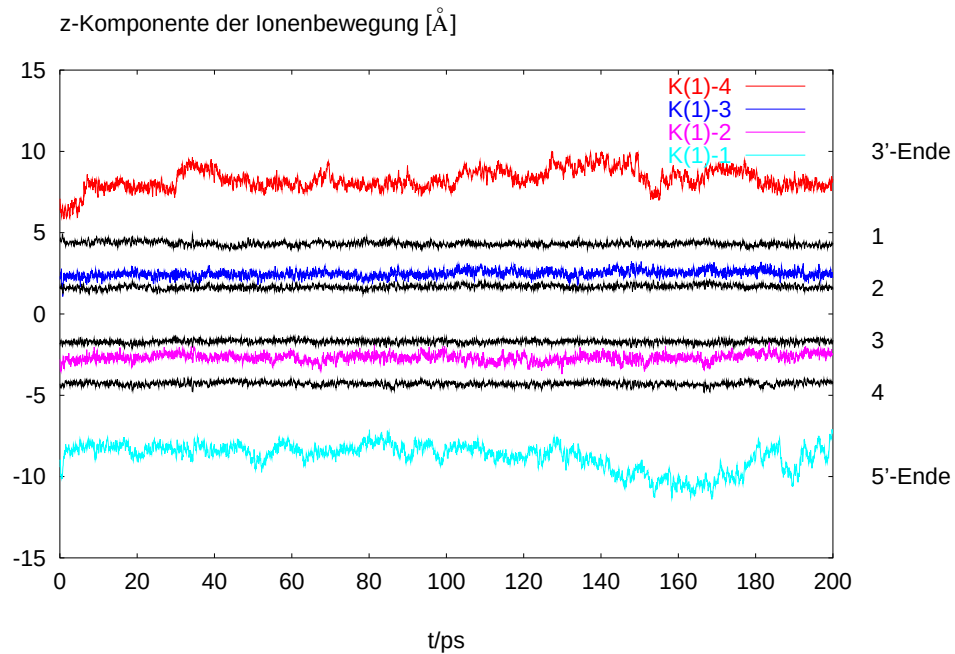


Abb. 6.5: Kationenbewegung entlang der helikalen Achse für das K(1)-System

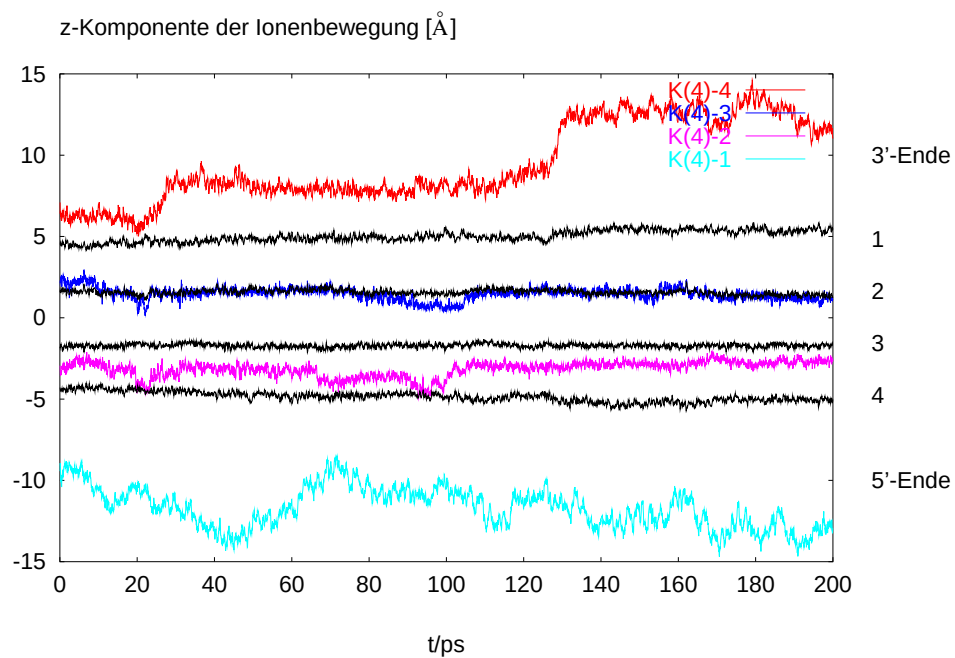


Abb. 6.6: Kationenbewegung entlang der helikalen Achse für das K(4)-System

bevorzugten Besetzungsmuster lassen sich dementsprechend nicht abschließend beurteilen.

Käfig am 3'-Ende in die Ebene zwei und versucht, diese zu durchwandern. Dies bewirkt eine schwingende Ausweichbewegung des Kations K(4)-2 in Richtung des 5'-Endes des Quadruplexes, die ihrerseits jedoch zu keinem direkten Ebenenein- bzw. Ebenendurchtritt führt. Die abstoßenden Coulomb-Wechselwirkungen zwischen diesen beiden Kationen sind offensichtlich nicht stark genug, um die bindenden Kräfte zwischen den Carbonylsauerstoffatomen und dem Ion K(4)-2 zu überwinden.

Wie der Vergleich der Systeme untereinander verdeutlicht, lassen sich hinsichtlich des ausgebildeten Besetzungsmusters bis zu einem „gewissen Grad der Störung“ Parallelen erkennen (K(1)-K(3), K(5)). Treten jedoch insbesondere gleichgerichtete Krafteinwirkungen der eingelagerten Kationen auf das Quadruplexgerüst auf, so resultieren daraus veränderte Bewegungsrichtungen und ungewöhnliche Aufenthaltsorte der K^+ -Ionen.

Quadruplexgeometrien

Betrachtet man die charakteristischen geometrischen Eigenschaften der Tetraplexe in Abhängigkeit von den Startbedingungen, so zeigt sich auch an dieser Stelle ein relativ gleichmäßiges Verhalten der untersuchten Quadruplexe. Individuelle Eigenheiten der einzelnen Systeme hinsichtlich der Mittelwerte liegen dabei zumeist im Rahmen der Schwankungsbreiten.

Die Mittelwerte der Ebenenabstände mit den zugehörigen Standardabweichungen können der Abb. 6.7 entnommen werden. Lediglich das System K(4) fällt durch teilweise erheblich vergrößerte Abstände auf, die ebenfalls starken Schwankungen unterliegen. Dies wird bedingt durch das differente Besetzungsmuster gegenüber den anderen Quadruplexen sowie die zuvor diskutierten Aufwindungserscheinungen. Im Vergleich zu den analogen Erdalkalisystemen (vergleiche hierzu Kapitel 5.4.1) zeigt sich ein um ca. 0,2 Å vergrößerter Wert der Ebenenabstände der besetzten bzw. ein um denselben Betrag verkleinerter Wert für die der unbesetzten Käfige. Insgesamt ergibt sich damit eine bzgl. der helikalen Achse gesteigerte Ausdehnung der Carbonylsauerstoff-Käfigstruktur um ca. 0,2 Å, die sich durch die geringere Coulombanziehung der einwertigen Alkalikationen gegenüber den zweiwertigen Erdalkalikationen in Bezug auf die O6-Atome der Guaninbasen erklären lässt.³

³Die in [113] beschriebene Unabhängigkeit der Ebenenabstände von dem vorliegenden Besetzungsmuster bei d[GGGG]₄/K-Systemen kann an dieser Stelle nicht bestätigt werden. Vielmehr ergeben sich die schon bei den Erdalkalitionen auftretenden Unterschiede in den Ebenenabständen besetzter und unbesetzter Käfige.

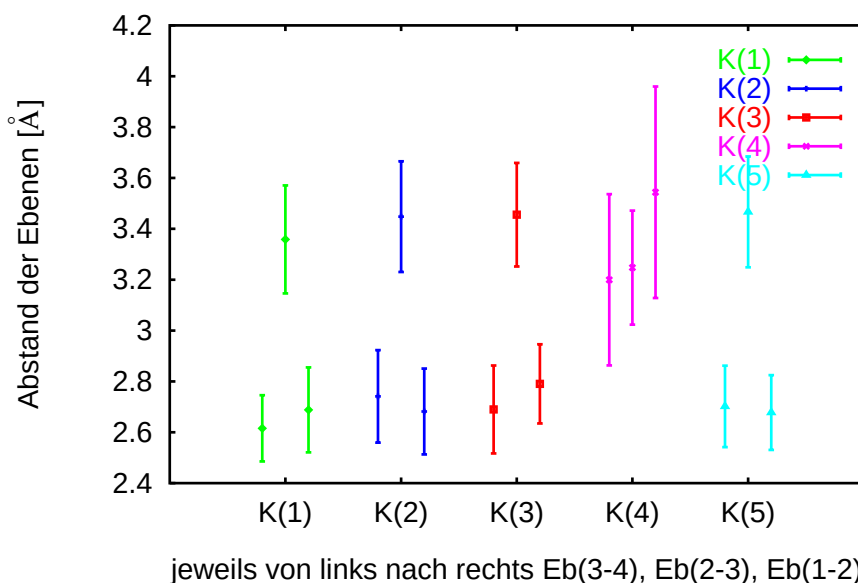


Abb. 6.7: Mittlere Ebenenabstände mit Standardabweichungen für die Systeme K(1) - K(5) mit verschiedenen Startbedingungen

Die Käfigausdehnungen senkrecht zur helikalen Achse in Form der mittleren O6-O6-Abstände lassen im Vergleich der Systeme K(1)-K(3) sowie K(5) kaum Unterschiede erkennen (siehe Tab. A.6 auf S. 246). Die innen liegenden Ebenen neigen gegenüber den äußeren zu einem um 0,2 - 0,3 Å verminderten Abstand der Carbonylsauerstoffatome, der aufgrund der stärkeren Coulombwechselwirkung, bedingt durch die Verschiebung der Kationen zu den Ebenen zwei und drei, hervorgerufen wird.

Im Unterschied dazu weist der Tetraplex K(4) vergrößerte Abstände innerhalb der endständigen Ebenen auf. Für die Ebenen zwei und drei fallen die Steigerungen deutlich geringer aus. Obwohl sich ein Kaliumion über große Teile des Simulationszeitraumes hinweg innerhalb der Ebene zwei aufhält, kommt es lediglich zu einer moderaten Ausdehnung der Käfigdimension senkrecht zur helikalen Achse, bedingt durch die Zunahme der abstoßenden Lennard-Jones-Wechselwirkungen zwischen Kation und den O6-Atomen der Guaninbasen.

Betrachtet man die Diederwinkel der einzelnen Tetraplexe mit unterschiedlichen Startbedingungen, so lässt sich im Vergleich zu den äquivalenten Erdalkalisystemen ein deutlich erhöhter Grad der Verzerrung mit zusätzlich stärkeren Fluktuationen feststellen. Offensichtlich resultiert aus der geminderten Coulombanziehung zwischen negativ polarisierten O6-Atomen und einfach positiv geladenen Alkaliionen eine verstärkte Tendenz zu Ebenenfluktuationen.⁴

⁴Auch an dieser Stelle zeigt sich die Sonderstellung des Systems K(4). Es ist gekennzeichnet durch extrem starke Auslenkungen des Diederwinkels im Bereich der Ebene eins.

Wasserstoffbrückenmuster

Die Betrachtung der über den Simulationszeitraum auftretenden H-Brückenmuster unterstreicht eindrucksvoll den individuellen Verlauf einer jeden Simulation nach entsprechender Veränderung der Anfangsbedingungen. Die Abb. 6.8, 6.10 und 6.9 zeigen die unterschiedlichen Wasserstoffbrückenmuster für die Ebene zwei des K(1)-, K(4)- sowie des K(5)-Systems.

Anhand dieser exemplarischen Auswahl lassen sich die Unterschiede, bedingt durch die jeweils differenten Startgeschwindigkeiten der interkalierten Kaliumionen, verdeutlichen.

Während K(1) (Abb. 6.8) zu Simulationsbeginn das geräumigere N7-H1-Muster bevorzugt, reduziert sich in K(5) (Abb. 6.10) dieses Muster schnell mit der Folge einer stärkeren Ausbildung der Hoogsteen-Anordnung. Im weiteren Verlauf kommt es bei beiden zu häufigen Veränderungen hinsichtlich der Anordnung der Guaninbasen.⁵ Der entsprechende Verlauf von K(4) (Abb. 6.9) ist gekennzeichnet durch eine gegenüber den beiden anderen reduzierte Gesamtanzahl an Wasserstoffbrückenbindungen, die offensichtlich durch die Anwesenheit eines Ions in der Ebene zwei über einen Großteil des Simulationszeitraumes hervorgerufen wird. Interessanterweise führt dies, nicht wie bei dem entsprechenden Magnesiumsystem, zur bevorzugten Ausbildung des N7-H1-Musters (vergleiche hierzu Abb. 5.20).⁶ Auf die explizite Darstellung der Wasserstoffbrückenmuster der anderen Systeme wird an dieser Stelle verzichtet. Sie weisen ebenfalls Mischformen der N7-H1- und der Hoogsteen-Anordnung auf. Im Vergleich untereinander sind kaum Korrelationen zu erkennen. Dies unterstreicht den individuellen Einfluss der Startbedingungen auf die Ausbildung bevorzugter Konformationen im weiteren Verlauf der Simulation.

⁵Auffällig ist im Gegensatz zu den entsprechenden Beobachtungen bei den Erdalkalisystemen, dass sich keines der beiden Muster über längere Zeit in „Reinform“ etablieren kann. Vielmehr wird eine Mischform beider Extrema bevorzugt.

⁶Wie bereits von TÖHL [113] beschrieben wurde, nehmen besonders die Kaliumionen wenig Einfluss auf lokale Strukturelemente.

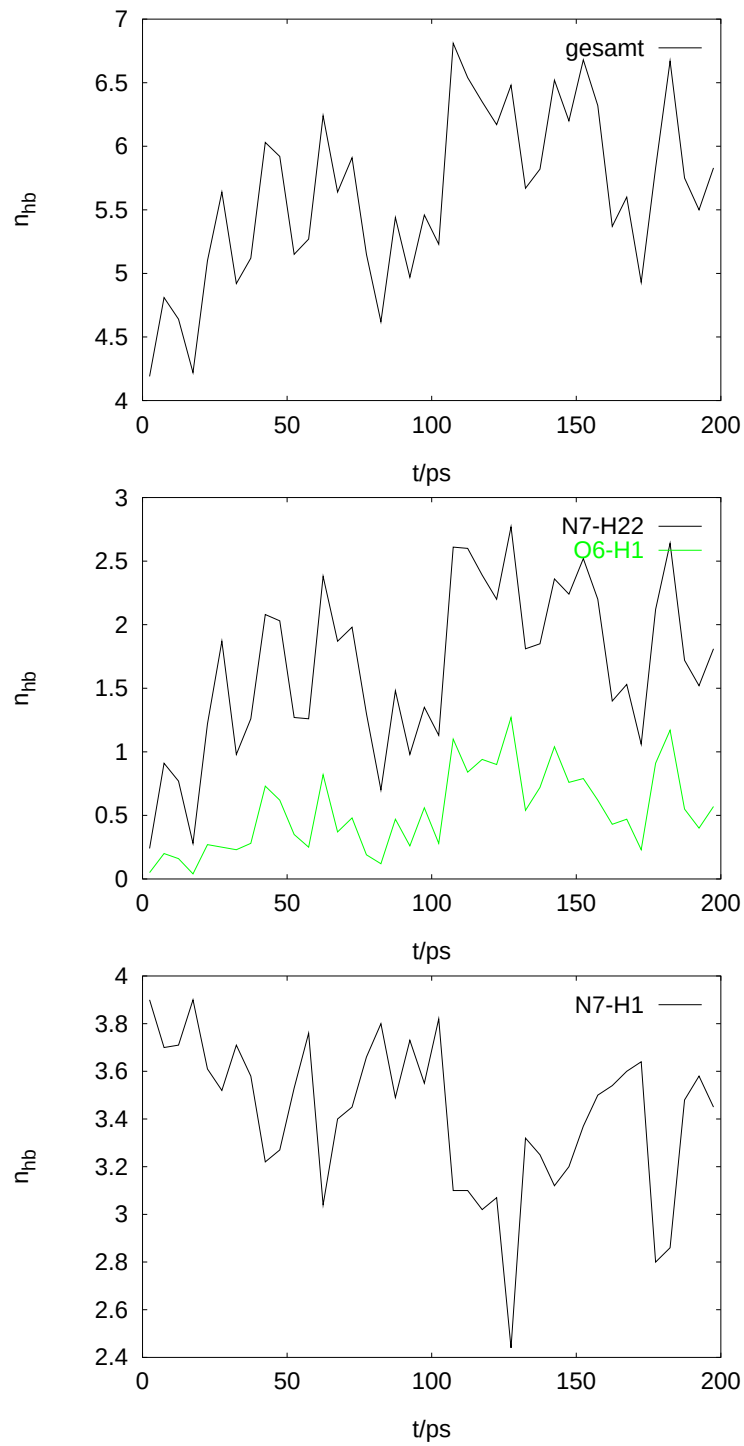


Abb. 6.8: Gesamtanzahl: Wasserstoffbrücken, Hoogsteen-Anteil, N7-H1-Anteil in Ebene 2 des K(1)-Systems, gemittelt wurde jeweils über einen Zeitbereich von 5 ps

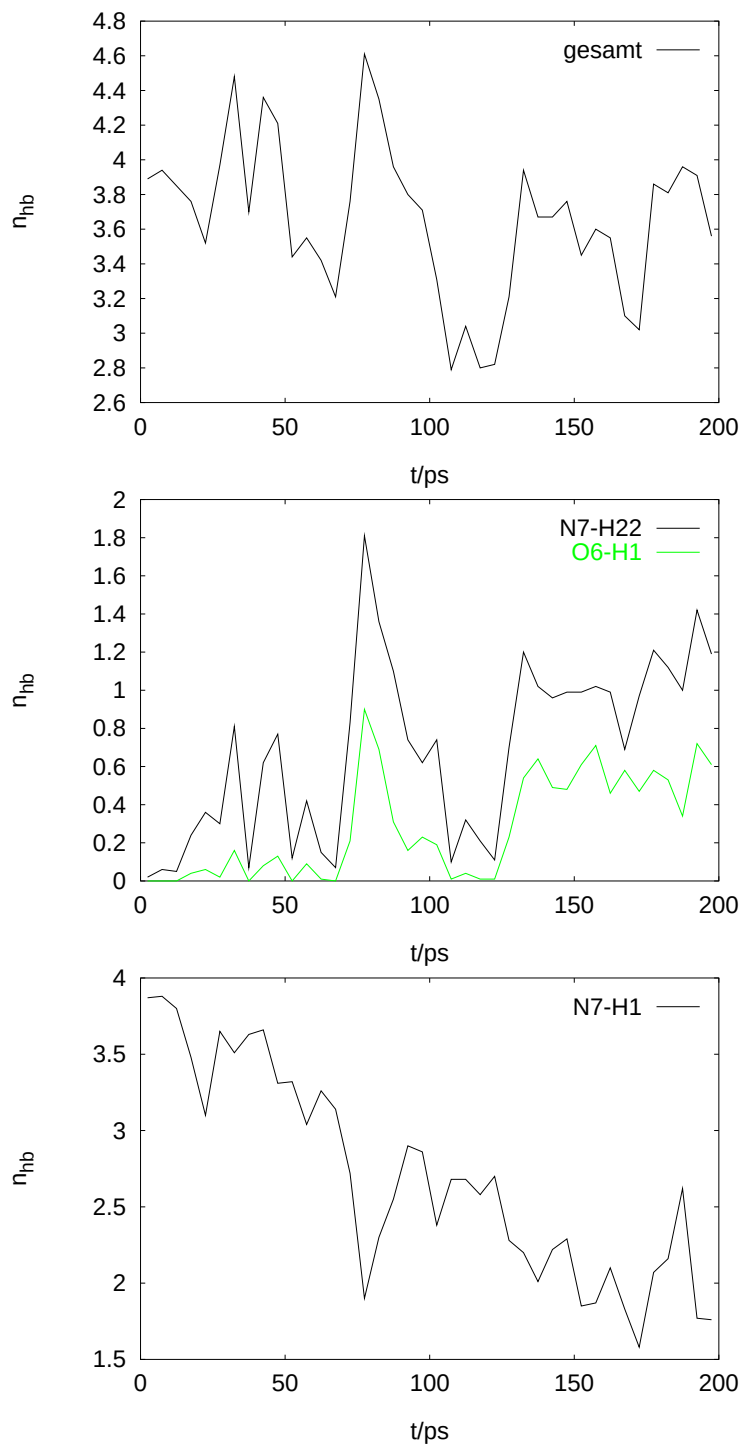


Abb. 6.9: Gesamtanzahl: Wasserstoffbrücken, Hoogsteen-Anteil, N7-H1-Anteil in Ebene 2 des K(4)-Systems, gemittelt wurde jeweils über einen Zeitbereich von 5 ps

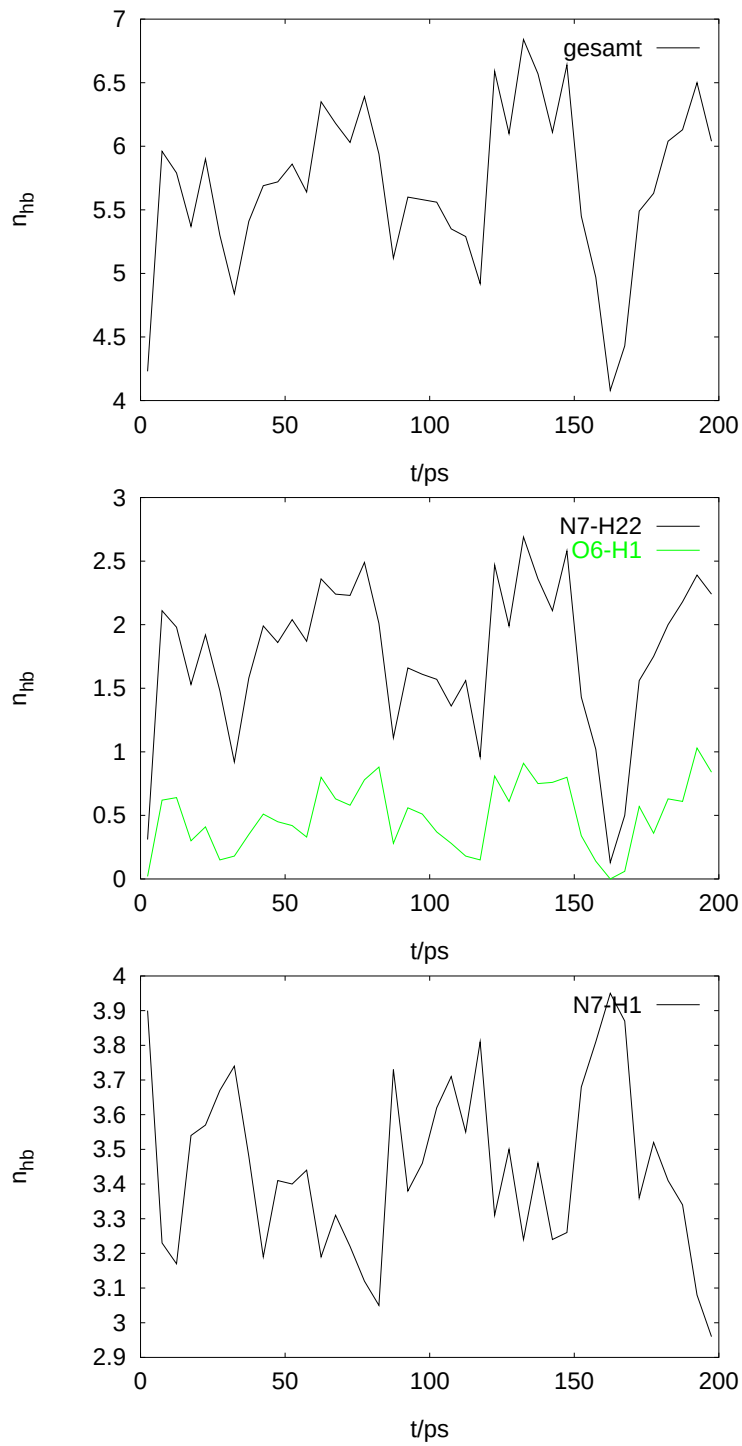


Abb. 6.10: Gesamtanzahl: Wasserstoffbrücken, Hoogsteen-Anteil, N7-H1-Anteil in Ebene 2 des K(5)-Systems, gemittelt wurde jeweils über einen Zeitbereich von 5 ps

Energetische Betrachtungen

Die Untersuchung ausgewählter gemittelter Energiebeträge zeigt quantitativ die Unterschiede der Systeme hinsichtlich der Wechselwirkungen einzelner Komponenten auf (siehe Tab. A.7 auf S. 247). Unter Berücksichtigung der Coulomb- und Lennard-Jones-Energien zwischen DNA und CI ergibt sich folgende Stabilitätsreihenfolge:

$$K(5) > K(2) > K(3) > K(1) > K(4)$$

Eine eingehendere Betrachtung der vorliegenden Ergebnisse in den beiden „Extremsystemen“ K(4) und K(5) lässt das Zusammenspiel der attraktiven und repulsiven Kräfte besser verstehen. Durch die Aufwindungserscheinungen, verbunden mit Verschiebungen der DNA-Stränge, im System K(4) kommt es zu einer verbesserten elektrostatischen Coulombanziehung zwischen den einzelnen DNA-Fragmenten. Auch die abstoßenden Kräfte zwischen den einzelnen CI's sind in diesem System weniger stark ausgeprägt, da sich die interkalierten Ionen in einem größeren Abstand zueinander befinden.

Beide Effekte geschehen jedoch auf Kosten einer weniger stark bindenden Wechselwirkung zwischen DNA und CI, der vom Betrag her maßgeblich dazu beiträgt, dass das System K(5) energetisch gegenüber K(4) als stabiler anzusehen ist. Die leicht stärker bindenden Lennard-Jones-Wechselwirkungen zwischen den DNA-Strängen im System K(4) werden durch die ungünstigere Konstellation zwischen DNA und CI sowie zwischen den CI's aufgehoben.⁷

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die hier untersuchten d[GGGG]₄/K-Quadruplexe mehrheitlich ein sehr ähnliches Verhalten aufweisen. Dies wird bedingt durch lediglich „geringe Störungen“ der Startstruktur, bzw. aufgrund entgegengerichteter Wechselwirkungen der eingelagerten Kationen mit der DNA.

Detailanalysen struktureller Veränderungen gegenüber der Startstruktur, die differierten Werte hinsichtlich geometrischer Größen aber auch die Wasserstoffbrückenmuster sowie die beobachteten Energiebeträge spiegeln jedoch die individuellen Entwicklungen der einzelnen Systeme wider, die maßgeblich durch den „Grad der Störung“ zu Beginn der Simulation bestimmt werden.

So unterstreicht insbesondere das abweichende Verhalten des Systems K(4), dass eine gleichgerichtete Veränderung der Krafteinwirkung der interkalierten Kaliumionen auf den Tetraplex zu einer „irreparablen“ Destabilisierung führen kann.

⁷Die Coulomb-Wechselwirkungen dominieren aufgrund ihres Betrages die Energetik der Systeme.

6.2 Der Temperatureinfluss

Die Variation der Simulationstemperatur ermöglicht es, Aussagen hinsichtlich des Schmelzverhaltens der untersuchten Quadruplexe zu treffen und mit experimentellen Daten zu vergleichen. Dabei lassen sich auf diese Weise wichtige Erkenntnisse in Bezug auf temperaturbedingte Veränderungen des Ionenwanderungsverhaltens sowie der sich ausbildenden Besetzungsmuster gewinnen, die mit konformativen Veränderungen des Tetraplexes korreliert werden können.

Für die Untersuchung der Temperaturabhängigkeit dient ein $d[\text{GGGG}]_4$ -System mit Natriumionen als Grundlage (siehe Tab. 4.4). Nach abgeschlossener Equilibrierung⁸ wird die Temperatur innerhalb von 10 ps jeweils um 10 K erhöht. Sobald der gewünschte Wert erreicht ist, wird die Simulation bei dieser Temperatur für die Dauer der in Tab. 4.4 dargestellten Simulationszeiten fortgeführt.

Visualisierung der Endstrukturen

Abb. 6.11 - 6.13 zeigen die Endstrukturen der Quadruplexe bei 300 K, 320 K, 340 K, 360 K und 400 K. Wie sich deutlich beobachten lässt, sind lediglich die Tetraplexe Na(300) und Na(320) über den vollen Simulationszeitraum von 530 ps stabil. Die anderen drei Systeme weisen bereits vorzeitig signifikante strukturelle Veränderungen auf, die für Na(360) sowie Na(400) besonders deutlich ausgeprägt sind. Der Zeitpunkt und der Grad der Deformation hängt dabei wesentlich von der Temperatur ab.

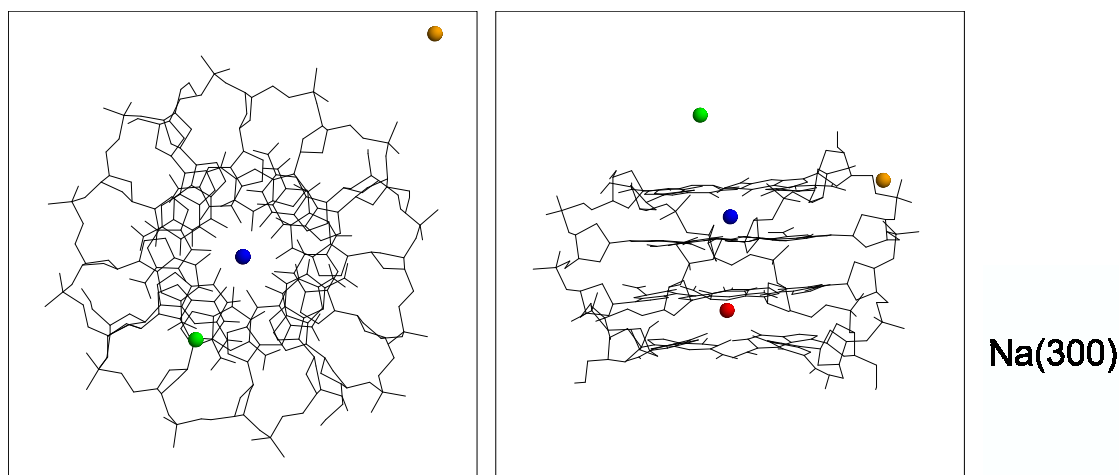


Abb. 6.11: Folgestruktur des Systems $d[\text{GGGG}]_4/\text{Na}(T)$ ($T = 300\text{K}$) nach 530 ps (Aufsicht und Seitenansicht)

⁸Entsprechend vorausgegangener Untersuchungen beträgt die Equilibrierungszeit bei 300K für das $d[\text{GGGG}]_4/\text{Na}$ -System 58 ps.

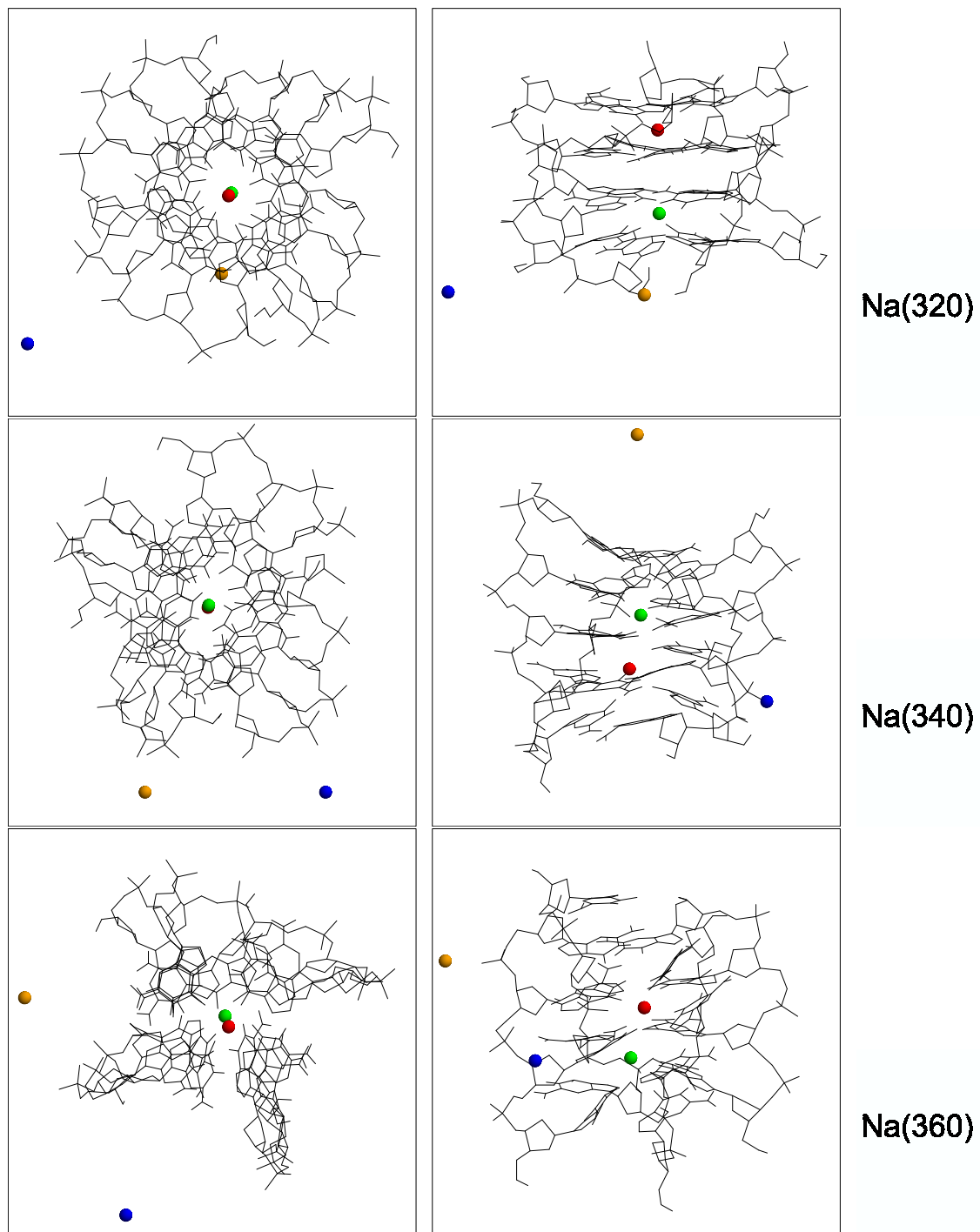


Abb. 6.12: Folgestrukturen der Systeme $d[\text{GGGG}]_4/\text{Na}(\text{T})$ ($T = 320\text{K}$) nach 530 ps, ($T = 340\text{K}$) nach 500 ps bzw. ($T = 360\text{K}$) nach 350 ps (Aufsicht und Seitenansicht)

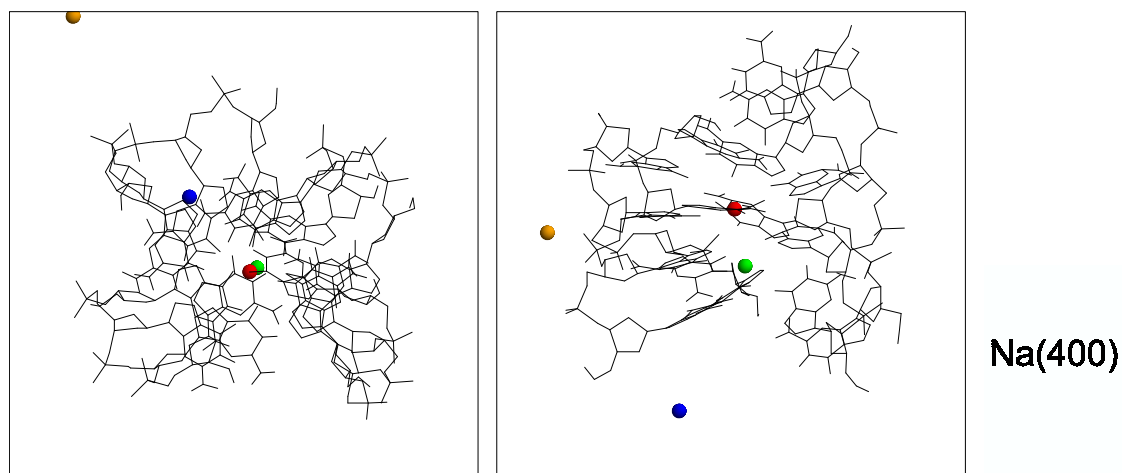


Abb. 6.13: Folgestruktur des Systems $d[GGGG]_4/Na(T)$ ($T = 400K$) nach 350 ps (Aufsicht und Seitenansicht)

Fluktuationen der Quadruplexstrukturen

Ein Vergleich der rms-Werte (siehe Abb. 6.14) unterstreicht die durch die Visualisierung der Endstrukturen angedeuteten Stabilitätsunterschiede der untersuchten Systeme.

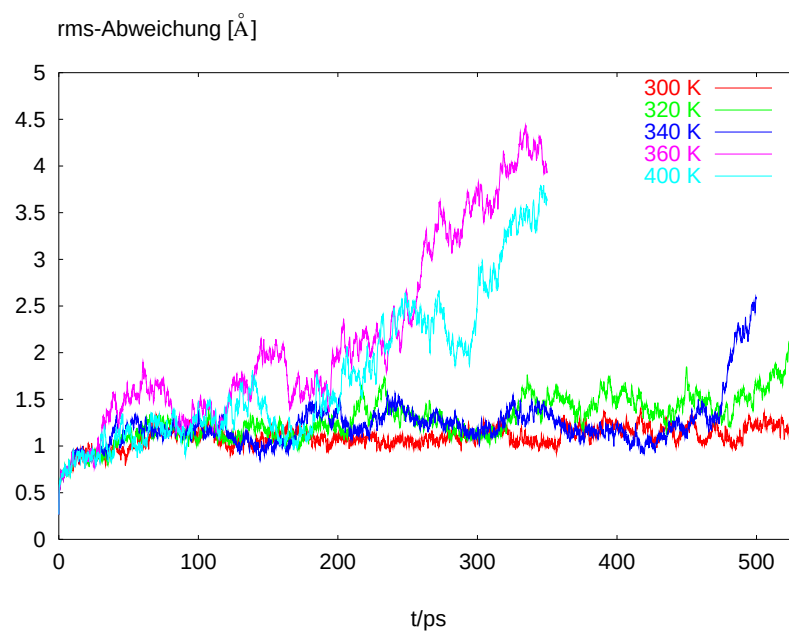


Abb. 6.14: rms-Abweichungen für die Systeme Na(300) - Na(400) mit unterschiedlichen Temperaturen

Na(300) - Na(340) weisen zunächst einen relativ einheitlichen zeitlichen Verlauf der mittleren quadratischen Abweichungen auf (leichte Unterschiede aufgrund der Temperaturdifferenzen zwischen den Systemen lassen sich erkennen). Erst nach ca. 470 ps [Na(340)] bzw. 510 ps [Na(320)] kommt es zu deutlich unterschiedlichen Kurvenverläufen.

Die Systeme Na(360) - Na(400) weichen demgegenüber schon nach kurzer Zeit in signifikanter Weise von dem Standardsystem (Simulationstemperatur 300 K) ab. Die einzelnen Graphen weisen dabei individuell ausgeprägte Schwankungen auf. Um den Vergleich untereinander zu ermöglichen, sind in Abb. 6.15 die zeitlich gemittelten rms-Werte der fünf d[GGGG]₄/Na-Systeme mit ihren zugehörigen Standardabweichungen dargestellt. Sowohl der Mittelwert als auch die Schwankungsbreite nehmen mit anwachsender Simulationstemperatur zu.⁹

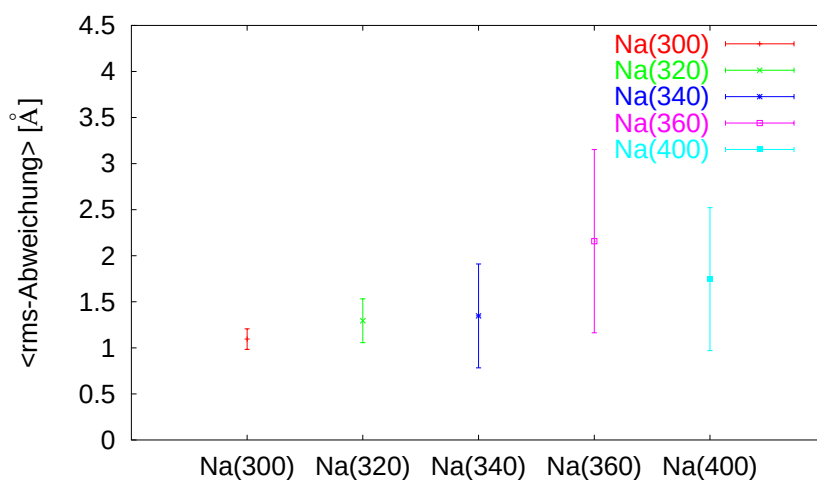


Abb. 6.15: Mittlere rms-Abweichungen mit Standardabweichungen für die Systeme Na(300) - Na(400) mit unterschiedlichen Temperaturen

Betrachtet man die Verläufe der rms-Auftragungen in Verbindung mit den Folgestrukturen, so erkennt man, dass mit zunehmender Simulationstemperatur (ab ca. 320 K) die Struktur der Tetraplexe stark fluktuiert und sich aufwindet. Das Temperaturintervall, in dem diese Destabilisierungen beobachtet werden, liegt in der Größenordnung der UV-spektroskopisch bestimmten Schmelztemperatur eines

⁹Na(360) und Na(400) bilden eine Ausnahme, da hier das höher temperierte System im Mittel geringere rms-Werte aufweist. Ein Vergleich der absoluten Werte mit einer entsprechenden Beurteilung erscheint an dieser Stelle jedoch wenig sinnvoll, weil beide Quadruplexstrukturen starken Schmelzerscheinungen unterworfen sind und die Unterschiede wohl eher auf einer zufälligen algorithmischen Entwicklung der jeweiligen Trajektorie beruhen.

d[TTGGGGTT]₄-Quadruplexs ($T_m = 326$ K) [15].¹⁰ Dies kann als Indiz dafür gewertet werden, dass die Fluktuationen der Tetraplexe erste Schmelzerscheinungen widerspiegeln und dementsprechend das Verhalten der Quadruplexsysteme in wässriger Lösung mit Hilfe der MD-Simulation korrekt beschrieben wird.¹¹

Temperaturbedingte Veränderungen des Ionenwanderungsverhaltens entlang der helikalen Achse

Wie aus Voruntersuchungen bekannt ist, weist besonders d[GGGG]₄/Na ein ausgeprägtes Ionenwanderungsverhalten auf [68]. Im Folgenden wird daher der Temperatureinfluss auf diese Verhaltensweise eingehender untersucht. Abb. 6.16 zeigt die Fluktuationen der Kationen im Kanalbereich des Na(320)-Systems.¹²

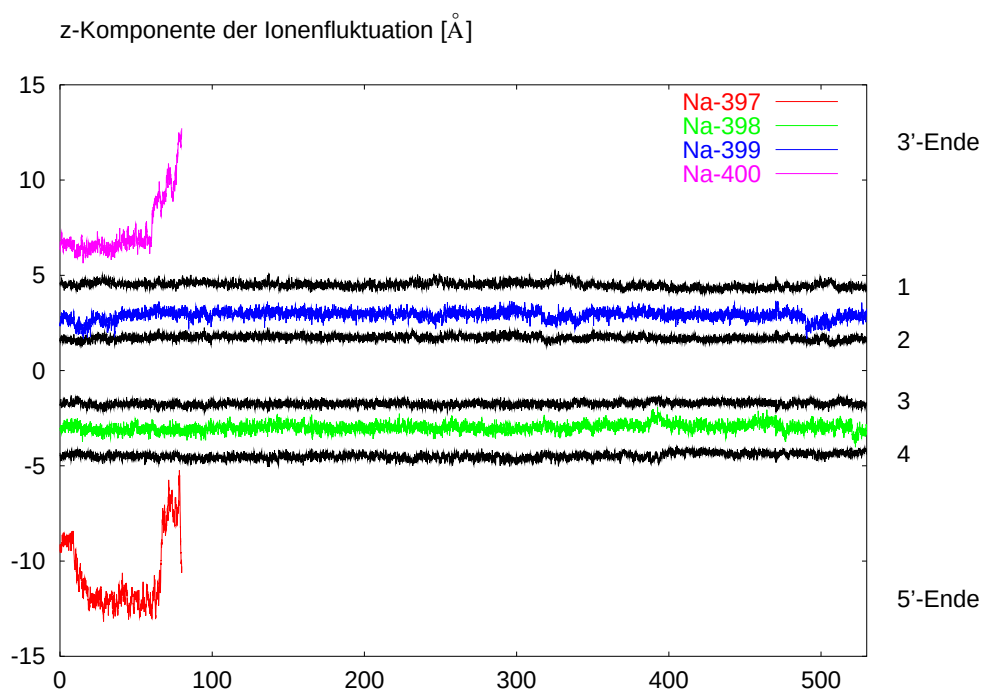


Abb. 6.16: Kationenbewegung entlang der helikalen Achse für das Na(320)-System

¹⁰Experimentell konnte in [15] ebenfalls nachgewiesen werden, dass T_m maßgeblich durch die Anzahl der ausgebildeten Guaninebenen des Quadruplexes bestimmt wird.

¹¹Dabei sollte jedoch berücksichtigt werden, dass der durch die MD-Simulation beschriebene Zeitbereich von ca. 0,5 ns lediglich einen eingeschränkten Einblick in das Schmelzverhalten erlaubt (insbesondere Schmelzvorgänge erstrecken sich in Zeitbereiche, die um einige Zehnerpotenzen erhöht sind).

¹²Die Nummerierung der interkalierten Kationen (z.B. Na-397) bezieht sich auf ihre Position in der originalen GROMOS-Koordinatendatei. Dies sollte nicht mit der abgekürzten Systembezeichnung (z.B. Na(320)) verwechselt werden.

In Analogie zu den Erdalkaliquadruplexen (vergleiche hierzu Abb. A.1 auf S. 237), wird das ursprüngliche Besetzungsmuster (die Interkalation von Ionen in den äußeren Käfighohlräumen) beibehalten. Die beiden zunächst am 3'- und 5'-Ende assoziierten Natriumionen verlassen nach ca. 80 ps die nähere Koordinationssphäre des DNA-Verbandes. Der weitere Verlauf ist gekennzeichnet durch einen „ruhigen“ Aufenthalt der verbleibenden Alkaliionen zwischen den Ebenen eins und zwei sowie zwischen drei und vier.

Die Ionenwanderungsprozesse entlang der helikalen Achse für die Systeme Na(340) - Na(400) weisen ein analoges Verhalten auf, das jedoch, aufgrund der auftretenden Deformationserscheinungen, die Lokalisierung der eingelagerten Ionen in Form von Abb. 6.16 nicht eindeutig ermöglicht. Besonders zum Ende der Simulation kommt es zu erheblichen Schmelzerscheinungen, verbunden mit der Auflösung eindeutig zuzuordnender Ebenen (siehe Abb. A.15 - A.17 in Anhang A.4.1).

Interessanterweise zeigt sich bei Betrachtung der äquivalenten Auftragung für das Na(300)-System (siehe Abb. 6.17) eine wesentlich lebhaftere Ionenwanderung innerhalb der Quadruplexstruktur, bedingt durch die reduzierte Simulationstemperatur von 300 K gegenüber den anderen d[GGGG]₄/Na-Systemen.

Das Na⁺-Ion am 5'-Ende verlässt bereits frühzeitig ($t_{Sim} = 10$ ps) die nähere Umgebung der Quadruplexstruktur. Kation Na-399 führt nach ca. 16 ps den ersten Ebenendurchtritt aus. Es wandert aus dem Käfig am 3'-Ende in den Hohlraum zwischen Ebene zwei und drei. Hierbei lässt sich sehr gut die Korrelation von Ionen- und zugehöriger Ebenenbewegung erkennen. Sowohl die Ebene zwei als auch die Ebene drei verschieben sich in Richtung dieses Alkaliions, sodass es zu einer Kontraktion des mittleren Käfigs kommt.

Durch die verstärkte elektrostatische Abstoßung zwischen Na-399 und Na-398 sowie dessen verminderter Coulombanziehung zu Ebene drei, wird das Ion im Käfig am 5'-Ende zunehmend in Richtung der Ebene vier gedrängt, was später zu seinem Austritt aus dem Quadruplex nach ca. 110 ps führt (zwischenzeitlich lässt sich nach ca. 57 ps ein kurzes Hinaus- und wieder Hineinwandern beobachten).

Das Kation Na-400 bewegt sich nach ca. 82 ps durch die Ebene eins in den zuvor von Na-399 besetzten Käfig am 3'-Ende. Diese elektrostatisch für die beiden interkalierten Ionen ungünstige Situation entspannt sich im Zeitbereich um 250 ps. Na-399 durchtritt spontan die Ebene drei in 5'-Richtung. Sowohl Na-400 als auch Na-399 bilden dadurch das für entsprechende Natriumquadruplexe charakteristische Besetzungsmuster aus, eine gleichmäßige Verteilung zweier Ionen in den jeweils endständigen Käfigbereiche.

Die Besetzung aller drei Ebenenzwischenräume ist bei d[GGGG]₄-Systemen (unabhängig von der Simulationstemperatur) aufgrund der auftretenden elektrostatischen Abstoßungseffekte ungünstig. Wie an dieser Stelle jedoch gezeigt werden konnte,

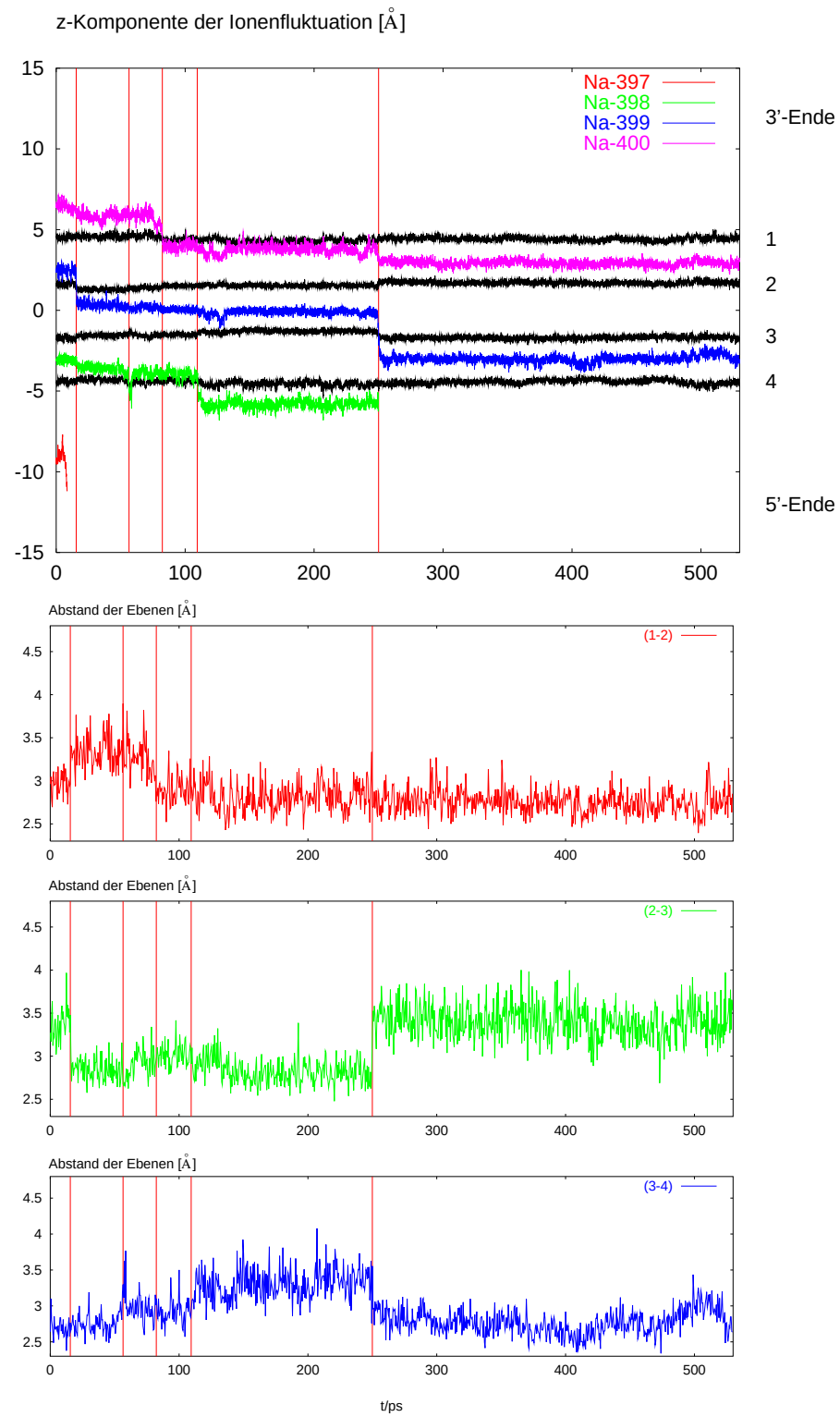


Abb. 6.17: Kationenbewegung entlang der helikalen Achse sowie Ebenenabstände im Na(300)-System

bildet sich das für eine Ionensorte bevorzugte Besetzungsmuster auf unterschiedliche Weise in Abhängigkeit von der jeweiligen Temperatur aus (bei der Betrachtung der umgebenden Hydrathülle in Kapitel 8 wird dieser Punkt noch eingehender diskutiert).

Im Vergleich zu dem von TÖHL[113] bei 300 K simulierten Natriumsystem, lässt sich in dieser Simulation eine deutlich verstärkte Ionenbewegung feststellen. Diese korrespondiert eher zu den dort ebenfalls untersuchten Kaliumsystemen.

Geometrische Eigenschaften der Quadruplexe in Abhängigkeit von der Simulationstemperatur

Allgemein erzeugen Ionenwanderungen durch die Quartettebenen hindurch deutliche Veränderungen hinsichtlich der Abstände der beteiligten Ebenen [Na(300)]. Die Entfernung eines Ions aus einem Käfig führt dabei zu einer Aufweitung des entsprechenden Hohlraumes. Der Ebenenabstand innerhalb des neu besetzten Zwischenraumes verringert sich. Gleichzeitig sind kurze Schwingungsbewegungen der Ionen mit ebenso kurzen Aufweitungerscheinungen des jeweiligen Käfigs verbunden [Na(340)].

Speziell die Steigerung der Simulationstemperatur bewirkt eine Vergrößerung der Ebenenzwischenräume. Dies stellt ein typisches Merkmal eines bevorstehenden Schmelzvorgangs dar. Abb. A.18 in Anhang A.4.2 zeigt exemplarisch für die „Hochtemperatursysteme“ Na(360) und Na(400) das zeitliche Verhalten der Abstände zwischen Ebene eins und zwei.

Die entsprechenden Mittelwerte der Ebenenabstände mit den zugehörigen Standardabweichungen können der Abb. 6.17 [Na(300)]¹³ sowie der Tab. A.8 [Na(320) - Na(400)] in Anhang A.4.2 entnommen werden. Dabei lassen sich insbesondere für die Tetraplexe oberhalb einer Simulationstemperatur von 340 K signifikante Distanzunterschiede ausmachen, bedingt durch die o.g. Schmelzerscheinungen.¹⁴

Betrachtet man die Summe aller Ebenenabstände, als Maß für die Ausdehnung des Quadruplexes entlang der helikalen Achse, so erkennt man deutlich, dass diese Größe mit zunehmender Simulationstemperatur ansteigt.¹⁵

¹³Die Mittelung erfolgt über Zeitbereiche mit konstantem Besetzungsmuster. Die Ergebnisse unterstreichen die o.g. Ausführungen hinsichtlich der Abstände gegenüberliegender Ebenen besetzter und unbesetzter Käfige. Gleichzeitig lassen sich die Auswirkungen nicht äquidistanter Ionenanordnungen (bzgl. der begrenzenden Ebenen) abschätzen, die zu geringfügigen Unterschieden der Mittelwerte vergleichbar besetzter Hohlräume führen.

¹⁴Beachtet werden sollte in diesem Zusammenhang, dass die Aufwindungserscheinungen die Zuverlässigkeit der Definition des Abstands aufgrund starker Verzerrungen einschränken.

¹⁵Die Abb. 6.11 und 6.12 verdeutlichen dies anschaulich.

- $d[\text{GGGG}]_4/\text{Na}(300) \leftrightarrow \sum_n \langle \text{Ebenenabstand} \rangle_t = (8,94 \pm 0,27) \text{ \AA}$
- $d[\text{GGGG}]_4/\text{Na}(320) \leftrightarrow \sum_n \langle \text{Ebenenabstand} \rangle_t = (9,07 \pm 0,32) \text{ \AA}$
- $d[\text{GGGG}]_4/\text{Na}(340) \leftrightarrow \sum_n \langle \text{Ebenenabstand} \rangle_t = (9,12 \pm 0,31) \text{ \AA}$
- $d[\text{GGGG}]_4/\text{Na}(360) \leftrightarrow \sum_n \langle \text{Ebenenabstand} \rangle_t = (9,22 \pm 0,58) \text{ \AA}$
- $d[\text{GGGG}]_4/\text{Na}(400) \leftrightarrow \sum_n \langle \text{Ebenenabstand} \rangle_t = (9,76 \pm 1,07) \text{ \AA}$

Ebenso zeigt sich eine Aufweitung der inneren Käfigstruktur senkrecht zur helikalen Quadruplexachse infolge steigender Simulationstemperaturen, wie Tab. 6.1 zu entnehmen ist. Während die ersten drei Tetraplexsysteme nahezu identische Werte aufweisen, treten bei den folgenden zwei Systemen [Na(360), Na(400)], bedingt durch die vorhandenen Schmelzerscheinungen, deutliche Erhöhungen der mittleren Abstände (t,n) der Carbonylsauerstoffatome auf. Diese sind verbunden mit ansteigenden Schwankungen besonders im Bereich der endständigen Ebenen.

$\langle O6 - O6 \rangle_{t,n} [\text{\AA}]$	1	2	3	4
$d[\text{GGGG}]_4/\text{Na}(300)$	$3,08 \pm 0,19$	$2,98 \pm 0,13$	$2,97 \pm 0,10$	$3,11 \pm 0,18$
$d[\text{GGGG}]_4/\text{Na}(320)$	$3,00 \pm 0,19$	$3,02 \pm 0,11$	$3,01 \pm 0,11$	$2,99 \pm 0,16$
$d[\text{GGGG}]_4/\text{Na}(340)$	$3,00 \pm 0,16$	$3,06 \pm 0,22$	$3,04 \pm 0,17$	$3,02 \pm 0,16$
$d[\text{GGGG}]_4/\text{Na}(360)$	$3,56 \pm 0,77$	$3,19 \pm 0,19$	$3,07 \pm 0,18$	$3,09 \pm 0,22$
$d[\text{GGGG}]_4/\text{Na}(400)$	$3,23 \pm 0,44$	$3,16 \pm 0,22$	$3,25 \pm 0,47$	$3,55 \pm 0,94$

Tabelle 6.1: Mittlere O6-O6-Abstände mit Standardabweichungen innerhalb der Systeme Na(320) - Na(400)

Gleichzeitig kommt es mit zunehmender Simulationstemperatur zu einer verstärkten Verzerrung der Quadruplexkäfige. Tab. A.9 in Anhang A.4.3 zeigt die zeitlich gemittelten Diederwinkel für die einzelnen Ebenen der Systeme Na(300) - Na(400), die temperaturbedingt deutlich zunehmen. Damit verbunden ist ein signifikanter Anstieg der Fluktuationen. Besonders drastisch fällt dies innerhalb der endständigen Ebenen der beiden letzten Systeme aus.¹⁶

¹⁶Diese, schon bei den Strukturuntersuchungen (vergleiche dazu Abb. 6.3) als Aufwindung qualitativ zu beobachtende Erscheinung, wird an dieser Stelle durch die quantitative Untersuchung der Diederwinkel unterstützt.

Wie schon bei den Erdalkalisystemen (siehe S. 78), lässt sich auch an dieser Stelle der Trägheitsradius zur Charakterisierung der „Kompaktheit“ einer Gesamtkonfiguration heranziehen. Inwieweit dabei das Ionenwanderungsverhalten, das daraus resultierende Besetzungsmuster sowie die differenten Temperatureinflüsse eine Rolle spielen, wird im Folgenden näher untersucht.

Abb. 6.18 verdeutlicht das Verhalten exemplarisch für das Na(300)-System, da es sich aufgrund der häufigen Ebendurchtritte von Ionen besonders hinsichtlich eines Rückschlusses auf mögliche Korrelationen eignet.

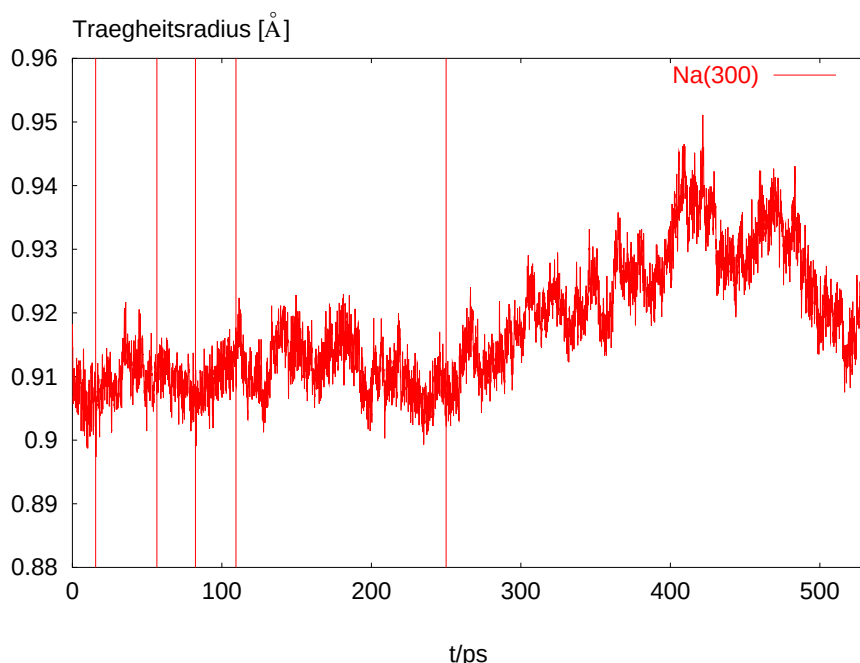


Abb. 6.18: Trägheitsradius des Systems Na(300)

Man kann erkennen, dass im Bereich der vertikalen Linien, die diese Ebenendurchtritte kennzeichnen, kurzfristig Auslenkungen des Trägheitsradius erfolgen. So führen Ioneneintritte in den Quadruplexverband (nach ca. 82 ps) zu einer kompakteren Gesamtstruktur, wohingegen entsprechende Austritte (nach ca. 110 ps) den Trägheitsradius erhöhen. Weniger stark ausgeprägte Bewegungen der Ionen innerhalb eines Käfigs haben keine Auswirkung auf die „äußere“ Gesamtausdehnung. Eine langfristige Beeinflussung des Trägheitsradius durch ein bestimmtes Besetzungsmuster kann nicht beobachtet werden.¹⁷ Offensichtlich spielen hier andere Faktoren eine Rolle (die Untersuchung der Wechselwirkung mit der umgebenden Hydrathülle wird in Kapitel 8 untersucht).

¹⁷Die anderen vier Natriumtetraplexe weisen ein analoges Verhalten auf.

Die Mittelwerte der Trägheitsradien für alle fünf Natriumsysteme sind in Tab. 6.2 aufgeführt. Die ersten drei Systeme weisen vergleichbare Werte auf. Na(360) und Na(400) zeigen leicht erhöhte Trägheitsradien in Übereinstimmung mit den auftretenden Schmelzerscheinungen.

$d[\text{GGGG}]_4$	Na(300)	Na(320)	Na(340)	Na(360)	Na(400)
$\langle r_{\text{Traegheit}} \rangle_t$ [nm]	0,918	0,922	0,917	0,938	0,930
σ	0,010	0,012	0,013	0,013	0,015

Tabelle 6.2: Mittlere Trägheitsradien mit Standardabweichungen für die Systeme Na(300) - Na(400)

Temperaturbedingte Veränderungen der Wasserstoffbrückenmuster

Neben den Wechselwirkungen zwischen den eingelagerten Kationen und den O6-Sauerstoffatomen spielen die elektrostatischen Kräfte zwischen positiv polarisierten Wasserstoffatomen und negativ polarisierten Sauerstoff- bzw. Stickstoffatomen der Guaninbasen eine wesentliche Rolle hinsichtlich der besonderen Stabilität von Quadruplexverbindungen, wie es bereits in den vorangehenden Kapiteln für vergleichbare Systeme beschrieben wurde. Aufgrund der ausgeprägten Ionendynamik des Na(300)-Systems lassen sich an dieser Stelle daher besonders gut die Auswirkungen der unterschiedlichen Besetzungsmuster auf das Muster der Wasserstoffbrücken untersuchen. Gleichzeitig ermöglicht der Vergleich mit den anderen Quadruplexen eine Abschätzung des Temperatureinflusses.

Abb. 6.19 stellt die Gesamtanzahl sowie die Verteilung auf die beiden möglichen Typen von Wasserstoffbrücken für das Natriumsystem bei 300 K dar. Innerhalb der ersten 80 ps der Simulation ist ein Übergang vom N7-H1-Typ zum Hoogsteen-Typ zu beobachten, der durch eine Veränderung des Besetzungsmusters (siehe hierzu Abb. A.19) hervorgerufen wird. Daran anschließend bewirkt der Durchgang eines Na^+ -Ions durch die Ebene eins nach ca. 82 ps (gekennzeichnet durch eine vertikale Linie) die drastische Reduzierung dieses H-Brückenmusters. Verbunden damit erfolgt zur gleichen Zeit ein Anstieg des „geräumigeren“ N7-H1-Musters aufgrund der sterischen Anforderungen dieses Kationentyps.

Im weiteren Verlauf der Simulation (bis ca. 250 ps) verbleibt das Natriumion in engem Kontakt zu Ebene eins. Dies hat zur Folge, dass der Hoogsteen-Typ in sehr starkem Maße zurückgedrängt wird. Lediglich kurzzeitige Bewegungen dieses Ions in Richtung des 5'-Endes führen zu einer sterisch weniger anspruchsvollen Situation

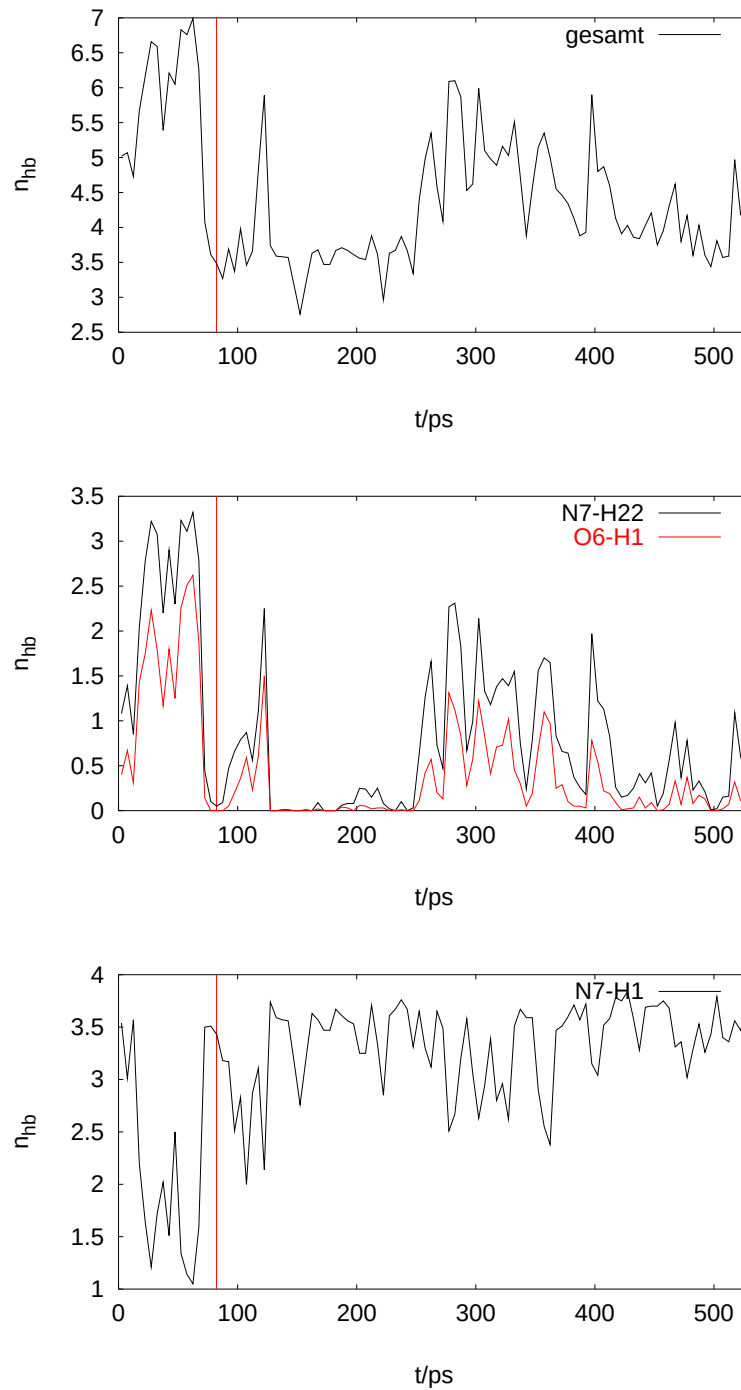


Abb. 6.19: Gesamtanzahl: Wasserstoffbrücken, Hoogsteen-Anteil, N7-H1-Anteil in Ebene 1 des Na(300)-Systems, gemittelt wurde jeweils über einen Zeitbereich von 5 ps

und damit zur Reduzierung des N7-H1-Typs. Verfolgt man die unterschiedlichen Wasserstoffbrückenbindungen bis zum Ende der Simulation, so lässt sich feststellen, dass beide H-Brücken-Muster zwischenzeitlich ausgebildet werden (Mischform), der N7-H1-Typ jedoch im Fall des vorliegenden Ionenbesetzungsmusters überwiegt.¹⁸

Abb. 6.20 verdeutlicht die Verhältnisse für die „innen liegende“ Ebene zwei des Na(300)-Systems. Der Durchtritt eines Kations durch die Ebene zwei nach ca. 15 ps führt zu keinen nennenswerten Veränderungen des Wasserstoffbrückenmusters, da zu diesem Zeitpunkt bereits der N7-H1-Typ ausgebildet ist (vertikale Linie). Die verstärkte Ausbildung eines Hoogsteen-Musters nach ca. 80 ps wird hervorgerufen durch den bereits oben beschriebenen Ionendurchtritt durch Ebene eins, der die gleichzeitige Verschiebung des interkalierten Ions im mittleren Käfig in 5'-Richtung bewirkt. Mit dem Verlassen dieses Käfigs nach ca. 250 ps verändert das Kation die sterischen Ansprüche hinsichtlich der Anordnung der O6-Atome der Ebene zwei. Das Hoogsteen-Muster „gewinnt die Oberhand“, das N7-H1-Muster wird zurückgedrängt.

Vergleicht man die bevorzugte Ausbildung einer bestimmten Form von Wasserstoffbrücken, so lässt sich feststellen, dass endständige Ebenen (zumindest für das vorliegende Besetzungsmuster und diesen Ionentyp) das N7-H1-Muster bevorzugen, wohingegen die inneren Ebenen verstärkt den Hoogsteen-Typ ausbilden.

Auch die Systeme, die bei höheren Temperaturen simuliert wurden, weisen das o.g. Verhalten auf. Abb. 6.21 verdeutlicht dies am Beispiel der Ebene zwei des Quadruplexes Na(340). Besonders auffällig sind hier die „Spitzen“ im Hoogsteen- bzw. N7-H1-Muster bei ca. 125 ps, 240 ps sowie 310 ps. Sie zeigen die verstärkte kurzfristige Ausbildung des letztgenannten Musters an, welches ansonsten eine eher untergeordnete Rolle bei den inneren Ebenen spielt.

Das Schmelzen der Quadruplexstruktur ist eng verknüpft mit dem Aufbrechen der stabilisierenden Wasserstoffbrückenbindungen. Die Abb. A.20 und A.21 in Anhang A.4.4 zeigen diese Veränderungen während des Schmelzvorgangs. Dabei wird deutlich, dass ein strukturelles Aufwinden des Systems Na(360) von dem 3'-Ende ausgeht, wohingegen im Na(400)-System bereits frühzeitig ein Rückgang der Wasserstoffbrückenbindungen in der Ebene am 5'-Ende eine deutliche Destabilisierung der Gesamtstruktur anzeigt.

¹⁸Eine eindeutige Bevorzugung wie im Fall des d[GGGG]₄/Mg-Systems (vergleiche dazu die Abb. 5.20) ist nicht zu beobachten.

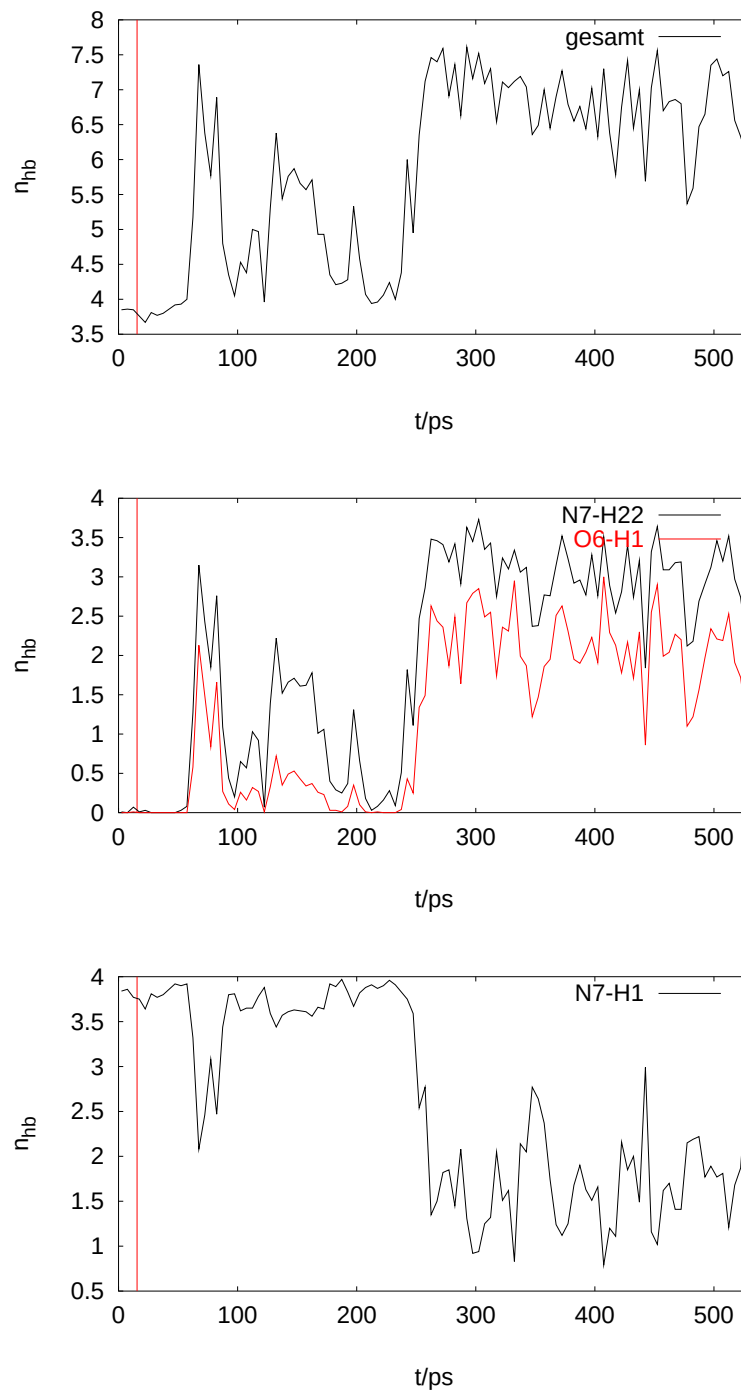


Abb. 6.20: Gesamtanzahl: Wasserstoffbrücken, Hoogsteen-Anteil, N7-H1-Anteil in Ebene 2 des Na(300)-Systems, gemittelt wurde jeweils über einen Zeitbereich von 5 ps

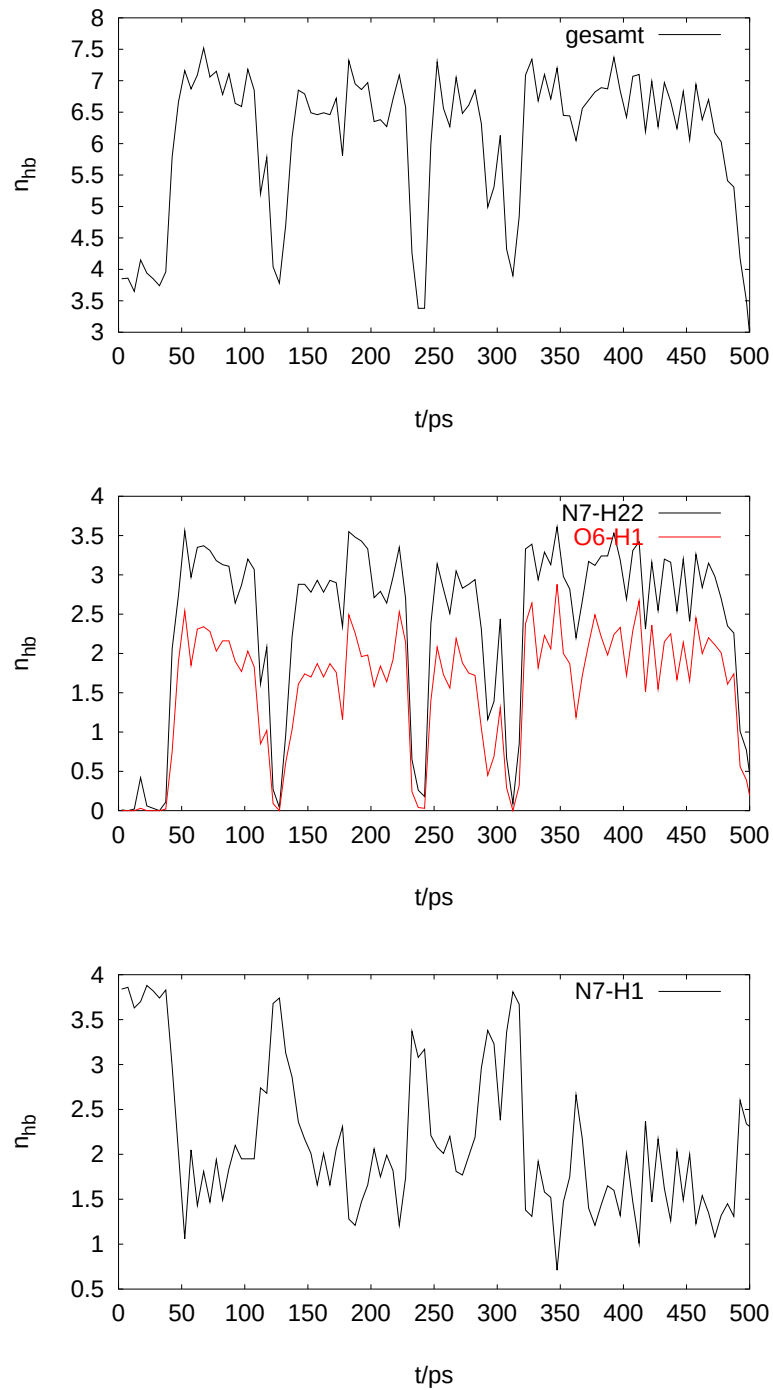


Abb. 6.21: Gesamtanzahl: Wasserstoffbrücken, Hoogsteen-Anteil, N7-H1-Anteil in Ebene 2 des Na(340)-Systems, gemittelt wurde jeweils über einen Zeitbereich von 5 ps

Energetische Betrachtungen

Untersucht man die Energieinhalte der einzelnen Systeme, so lassen sich auch an dieser Stelle deutliche Unterschiede innerhalb der Systemreihe feststellen (siehe Tab. A.10 in Anhang A.4.5).

Wie erwartet steigt die Gesamtenergie wie auch die gesamte potenzielle Energie mit zunehmender Temperatur an.¹⁹ Daraus ergibt sich eine abnehmende Stabilität der Gesamtsysteme in der Reihe von Na(300) bis Na(400). Untersucht man die Coulombwechselwirkung zwischen den DNA-Fragmenten, so weisen die „hochtemperierten“ Assoziate die stabilste Anordnung auf (im Widerspruch zu den beobachteten Endstrukturen).²⁰

Wie bereits in [68] gezeigt werden konnte, bestimmen jedoch hauptsächlich die Kräfte zwischen DNA und CI die Stabilität von Quadruplexen. Diese sind für die „Hochtemperatursysteme“ in Bezug auf die elektrostatischen Wechselwirkungen weniger bindend. Betrachtet man sie in der Summe mit den entsprechenden Lennard-Jones-Wechselwirkungen, so ergibt sich eine energetische Bevorzugung von Na(300) - Na(340), was dem Grad der beobachteten Strukturfluktuationen entspricht.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass das Verhalten der $d[\text{GGGG}]_4/\text{Na}$ -Systeme maßgeblich durch die Simulationstemperatur beeinflusst wird. Ausgeprägte konformative Veränderungen (Destabilisierungen) treten oberhalb von 320 K in Erscheinung. Sie liegen damit in der Größenordnung der experimentell bestimmten Schmelztemperatur vergleichbarer Quadruplexe, was die Vertretbarkeit der im Rahmen dieser Arbeit benutzten Annahmen unterstreicht. Zusätzlich beobachtet man sowohl Unterschiede hinsichtlich des Ionenwanderungsverhaltens (abweichender Mechanismus zum Erreichen der bevorzugten Besetzung der beiden äußeren Guaninkäfige für den Fall des Systems Na(300) im Gegensatz zu den verbleibenden vier Tetraplexen) als auch der charakteristischen geometrischen Größen. Insbesondere die Ausdehnungen der Quadruplexkäfige in Richtung der helikalen Achse sowie senkrecht dazu nehmen mit anwachsender Systemtemperatur und den damit verknüpften Schmelzerscheinungen deutlich zu. Damit verbunden ist eine signifikante Reduzierung der ausgebildeten Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den DNA-Strängen durch die Temperaturerhöhungen, was zu deutlichen Stabilitätsverlusten der entsprechenden Tetraplexstrukturen führt.

¹⁹Dieser Temperaturanstieg des Gesamtsystems wird realisiert durch eine Erhöhung der kinetischen Energie aller Teilchen in der Simulationsbox.

²⁰Hierbei ist jedoch zu beachten, dass über den gesamten Simulationszeitraum gemittelt wurde, also auch die „stabilen“ Intermediate einen großen Anteil besitzen.

Kapitel 7

$d[\text{GGGG}]_4\text{-K}^+$ in Gegenwart von Erdalkalitionen

Die Charakterisierung von $d[\text{GGGG}]_4$ -Quadruplexen mit Alkali- und Erdalkalitionen innerhalb der Simulationsbox (gemischte Systeme) ist im Folgenden das Ziel der Untersuchung. Insbesondere werden die Auswirkungen der Anwesenheit zweiwertiger Kationen außerhalb des Tetraplexes auf seine Stabilität, das Ionenwanderungsverhalten sowie mögliche geometrische Veränderungen untersucht. Ein Vergleich der Ergebnisse erfolgt sowohl untereinander als auch mit Studien an reinen Alkali-quadruplexsystemen. Dabei handelt es sich um „homogene“ Kaliumsysteme, die bereits an früherer Stelle Gegenstand einer Untersuchung waren (siehe dazu Kapitel 6.1 bzw. [113]).

Ausgehend von den bereits in den vorhergehenden Kapiteln verwendeten Grundstrukturen equilibriert man Systeme, die im Kanalbereich der DNA (interkaliert sowie an den Enden) vier Kaliumionen besitzen sowie vier weitere Erdalkalitionen beinhalten, die sich außerhalb des Quadruplexes („*bulk*“) befinden. Dies gewährleistet die Ladungsneutralität innerhalb des Gesamtsystems (siehe dazu auch Tab. 4.5).

7.1 Stabilitäten und Folgestrukturen

Die als Indikator für Stabilitätsveränderungen benutzten rms-Abweichungen von der Ausgangsstruktur (zu Beginn der Produktionsphase) sind in Abb. 7.1 dargestellt. Nach einer zunächst gleichförmigen Entwicklung der rms-Werte aller drei $d[\text{GGGG}]_4$ -Systeme ($\text{K}^+[\text{Mg}^{2+}]$, $\text{K}^+[\text{Ca}^{2+}]$, $\text{K}^+[\text{Sr}^{2+}]$), die von signifikanten Anstiegen geprägt sind, kommt es nach ca. 100 ps zu einer Aufspaltung, bedingt durch eine weniger starke Steigung des Graphen des K-Ca-Tetraplexes verglichen mit denen

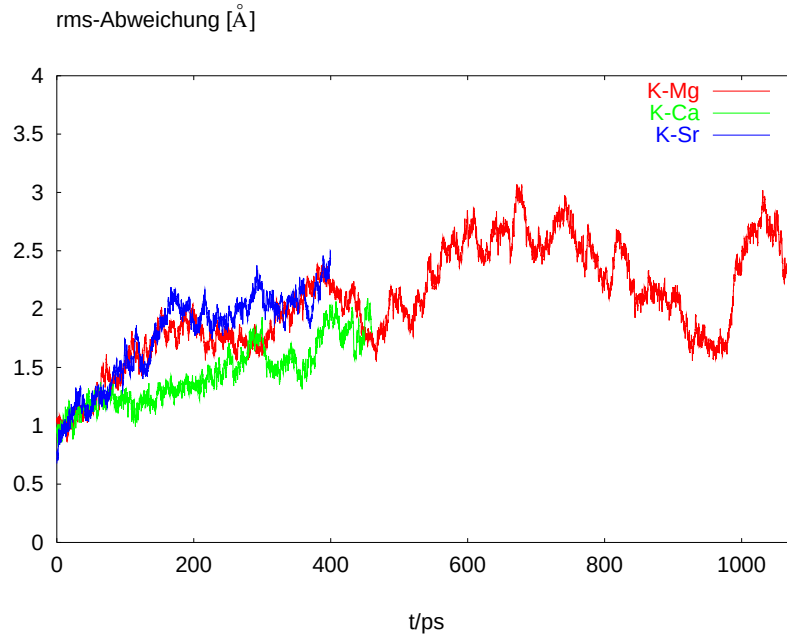


Abb. 7.1: rms-Abweichungen für die gemischten Systeme $d[\text{GGGG}]_4/\text{K-Mg}$, K-Ca , K-Sr

der Systeme K-Mg bzw. K-Sr . Die Kurvenverläufe passen sich einander mit fortschreitender Simulationsdauer wieder an. Keines der Systeme erreicht einen quasi stationären Zustand. Vielmehr sind während der gesamten Simulationszeit starke Fluktuationen zu beobachten, die auf ausgeprägte Konformationsänderungen innerhalb der Quadruplexstruktur schließen lassen. Dies steht im Gegensatz zu vergleichbaren „stabilen“ Quadruplexen, die ausschließlich Kaliumionen enthalten und ein ähnliches Besetzungsmuster aufweisen [113].

Die Mittelwerte der rms-Abweichungen betragen:¹

- $d[\text{GGGG}]_4/\text{K-Mg} \leftrightarrow \langle \text{rms} - \text{Abweichung} \rangle_t = (2,07 \pm 0,45) \text{ \AA}$
- $d[\text{GGGG}]_4/\text{K-Ca} \leftrightarrow \langle \text{rms} - \text{Abweichung} \rangle_t = (1,44 \pm 0,26) \text{ \AA}$
- $d[\text{GGGG}]_4/\text{K-Sr} \leftrightarrow \langle \text{rms} - \text{Abweichung} \rangle_t = (1,77 \pm 0,38) \text{ \AA}$

Vergleicht man diese Werte mit denen reiner Kaliumsysteme (1,2-1,3 Å, siehe Abb. 6.4), so stellt man eine deutliche Erhöhung fest. Offensichtlich werden die Stabilitäten der Quadruplexe innerhalb von gemischten Systemen erheblich durch die anwesenden Erdalkaliionen beeinflusst.

Abb. 7.2 zeigt die Strukturen zum Ende der jeweiligen Simulation.

¹Die der Mittelung zugrundeliegenden Zeitbereiche unterscheiden sich, da lediglich „weitestgehend“ intakte Quadruplexstrukturen berücksichtigt werden.

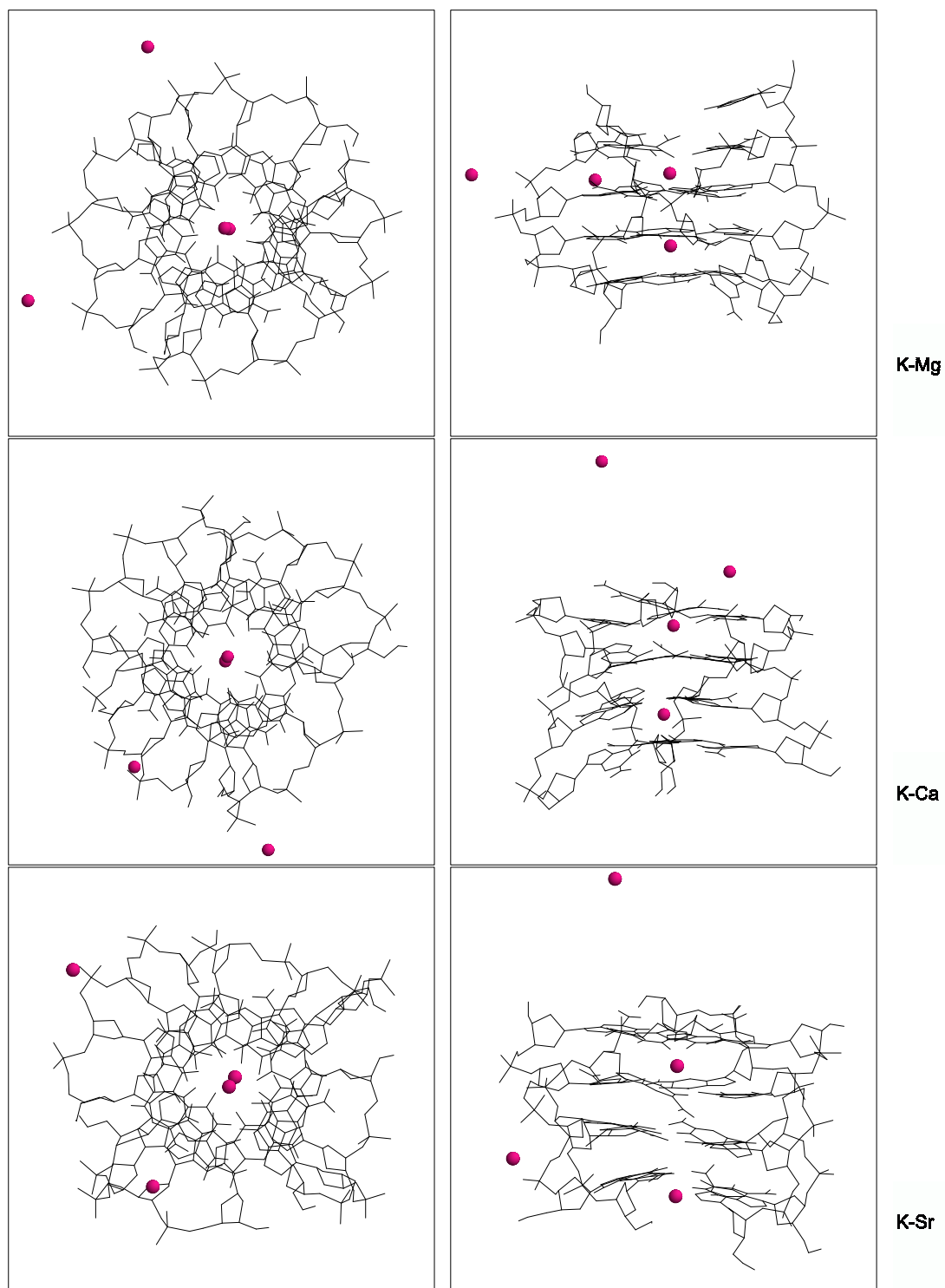


Abb. 7.2: Folgestrukturen der simulierten Systeme $d[GGGG]_4/K\text{-Mg}$ (1080 ps), $K\text{-Ca}$ (460 ps), $K\text{-Sr}$ (400ps); lediglich die K^+ -Ionen sind eingezeichnet (Aufsicht und Seitenansicht (3'-Ende oben))

Alle gestapelten Tetramereinheiten bleiben größtenteils erhalten. Die Strukturen weisen jedoch mehr oder weniger stark ausgeprägte Deformationen auf.

Das System mit Magnesiumionen lässt nach 1080 ps Aufwindungserscheinungen am 3'-Ende erkennen. Der K-Sr-Tetraplex neigt am 5'-Ende zu Verzerrungen. Der Austritt eines Kations aus diesem Quadruplexverband leitet die sich rasch anschließende Auflösung einer „geordneten“ Struktur ein, die bereits nach 420 ps stark destruktive Merkmale aufweist. Der $d[\text{GGGG}]_4/\text{K}$ -Quadruplex mit externen Calciumionen zeigt erste Aufwindungserscheinungen nach 480 ps.

Die sich anschließend entwickelnden stark „deformierten“ Strukturen werden nicht zur weiteren Auswertung herangezogen. Vielmehr wird der Untersuchungsbereich auf 400 ps (K-Sr) bzw. 460 ps (K-Ca) beschränkt.

Abb. A.22 auf S. 255 zeigt die Quadruplexstrukturen der letztgenannten Einheiten nach 480 ps (K-Sr) und 760 ps (K-Ca) (sowie zum Vergleich (K-Mg) nach 610 ps). Dabei ist eine deutliche Erniedrigung des helikalen Winkels α für einen Strang des $d[\text{GGGG}]_4/\text{K}$ -Mg-Systems zu beobachten (dieser normalisiert sich jedoch im weiteren Simulationsverlauf). Im Gegensatz dazu neigt der K-Ca-Quadruplex zu ausgeprägten Aufwindungstendenzen im Bereich aller $d[\text{GGGG}]$ -Sequenzen. Das gemischte System mit Strontiumionen hingegen weist, aufgrund des o.g. Hinauswanderns eines Kations, eine nach innen, auf das verbleibende Ion gerichtete Stranggeometrie auf, die zu einer kompletten Auflösung der Ebene am 5'-Ende führt.

Hinterfragt man die Ursachen für die auftretenden Instabilitäten, so liegt die Vermutung nahe, dass sich durch die zusätzliche Anwesenheit zweiwertiger Kationen im Umfeld des Quadruplexes gravierende strukturelle Verzerrungen ergeben. Offensichtlich bewirken die langreichweitigen elektrostatischen Kräfte, die von den Erdalkalitionen ausgehen, entsprechende geometrische Veränderungen im Bereich der DNA, die durch die eingelagerten Kaliumionen nicht kompensiert werden können. Eine eingehendere Betrachtung der energetischen Verhältnisse zwischen den „bulk“-Ionen und der DNA erfolgt an späterer Stelle (siehe S. 142).

7.2 Ionenwanderung

Um mögliche Rückschlüsse auf die Ursachen dieser „destruktiven“ Systementwicklung ziehen zu können, die für $d[\text{GGGG}]_4$ -Quadruplexe mit interkalierten Kaliumionen ungewöhnlich sind, werden das Besetzungsmuster sowie die Ionenbewegungen innerhalb des Quadruplexverbandes untersucht. Gleichzeitig stellt sich die Frage nach der Rolle, die die Erdalkalitionen im „bulk“ hinsichtlich der auftretenden, deutlich labileren Konstitution der Tetramereinheiten spielen.

7.2.1 Ionenwanderungsprozesse entlang der helikalen Achse

Betrachtet man das $d[\text{GGGG}]_4/\text{K-Mg}$ -System, so zeigt sich zunächst ein stabiles Verhalten für nahezu 500 ps (siehe Abb. 7.3). Im Gegensatz zu den reinen Kaliumsystemen, die von TÖHL[113] simuliert wurden, beobachtet man jedoch eine deutliche Reduzierung der Häufigkeit von Ebenendurchtritten der K^+ -Ionen.² Offensichtlich bewirkt die Anwesenheit von Mg^{2+} -Ionen im „bulk“ eine veränderte Dynamik des Systems.

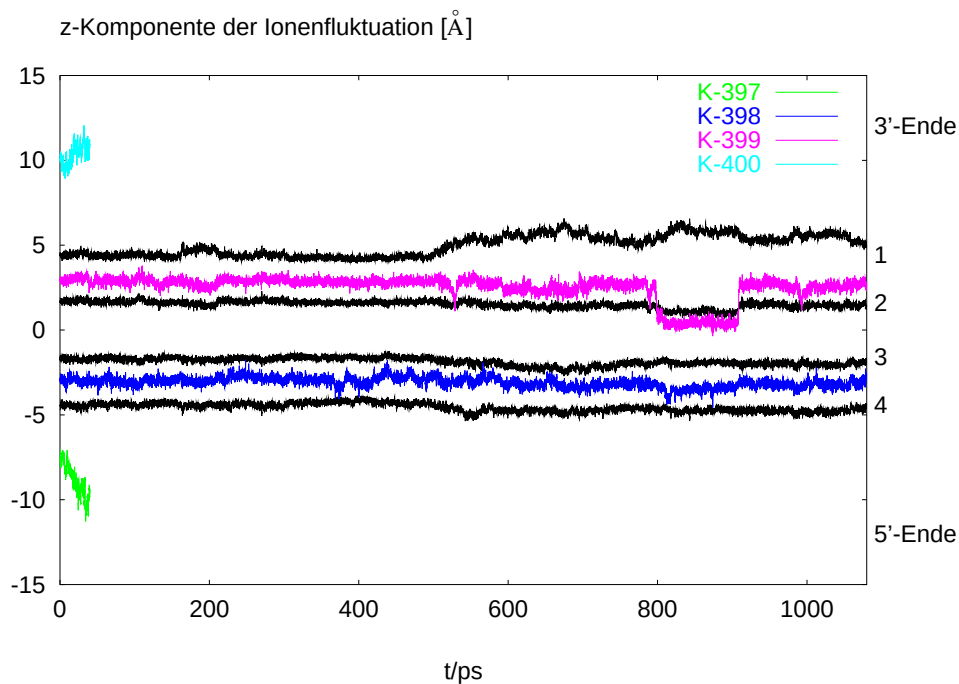


Abb. 7.3: Kationenbewegung entlang der helikalen Achse für das $d[\text{GGGG}]_4/\text{K-Mg}$ -System

Nach wenigen Picosekunden verlassen die Ionen an den Enden der DNA (K-397, K-400) den Nahbereich des Quadruplexes. Der weitere Simulationsverlauf ist gekennzeichnet durch die Ausbildung des für ein $d[\text{GGGG}]_4$ -System bevorzugten Musters, die Besetzung der Käfige am 3'- und 5'-Ende.³ Unterbrochen von leichten Fluktuationen der Ionen, verbunden mit entsprechenden Ausweichbewegungen der Ebenen, beobachtet man keine „ungewöhnlichen“ Ereignisse innerhalb der ersten

²Ähnliche Unterschiede konnten bereits bei den Untersuchungen zu den Auswirkungen veränderter Starbedingungen auf die weitere Systementwicklung beobachtet werden (vergleiche dazu Kapitel 6.1).

³Dieses Besetzungsmuster ist sowohl bei den reinen $d[\text{GGGG}]_4$ -Quadruplexen mit Alkaliionen, als auch bei denen mit Erdalkaliionen weit verbreitet.

500 ps. Dann kommt es jedoch zu einer seitlichen Öffnung des Quadruplexverbandes verbunden mit der Annäherung eines Magnesiumions (siehe Abb. A.22 in Anhang A.5.1 auf Seite 255)⁴. Trotz dieser konformativen Veränderung verbleibt das Kaliumion (K-399) im Hohlraum zwischen Ebene eins und zwei. Nach ca. 800 ps tritt es durch die Ebene zwei hindurch und verbleibt für ca. 100 ps im mittleren Käfig. Dem Magnesiumion gelingt es während dieser Zeit nicht, den nun freigewordenen Platz einzunehmen. Vielmehr wandert das Kaliumion anschließend zurück an seine „vorherige“ Position. Gleichzeitig entfernt sich das Mg^{2+} -Ion wieder, ohne dass die Guaninbase vollends in die weitestgehend planare Anordnung ihrer Nachbarbasen zurückkehrt (vergleiche dazu auch Abb. 7.2).

Das entsprechende System mit Calciumionen zeigt ein ähnliches Verhalten (siehe Abb. 7.4). Auch hier entfernen sich die angelagerten Ionen an den Enden bereits nach wenigen Picosekunden aus dem Nahbereich des Quadruplexes. Über den gesamten dargestellten Zeitbereich von 460 ps bleibt die Besetzung der äußeren beiden Hohlräume erhalten. Danach erfolgt, wie bereits weiter oben beschrieben, ein Aufbrechen der wohlgeordneten Symmetrie.

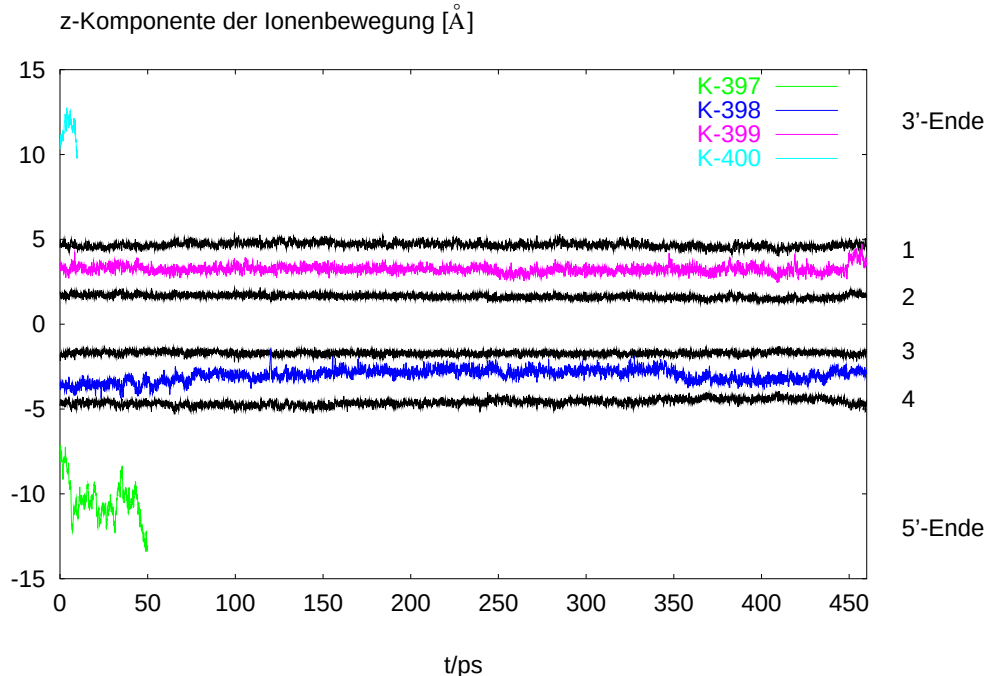


Abb. 7.4: Kationenbewegung entlang der helikalen Achse für das $\text{d[GGGG]}_4/\text{K-Ca}$ -System

⁴Das Magnesiumion ist entsprechend seines Ionenradius raumfüllend dargestellt, um die Motivation für eine Ausweichbewegung einer Guaninbase am 3'-Ende zu verdeutlichen.

Betrachtet man das System mit Strontiumionen (siehe Abb. A.23 in Anhang A.5.2 auf Seite 256), so stellt sich auch hier zunächst das gewohnte Besetzungsmuster für $d[\text{GGGG}]_4/\text{K}^+$ -Systeme ein. Nach ca. 360 ps kommt es jedoch zum Herauswandern eines Kaliumions aus dem Quadruplex am 5'-Ende, woraufhin sich die gesamte Struktur anschließend im Verlauf der nächsten 100 ps aufwindet.

7.2.2 Ionenwanderungsprozesse im „bulk“

Innerhalb der Systemreihen mit gemischten Ionentypen beobachtet man eine starke Affinität der Erdalkaliionen im „bulk“ zu negativ polarisierten Atompositionen der DNA-Stränge.

So zeigt sich etwa, dass die außerhalb der DNA-Anordnung befindlichen Calciumionen in Wechselwirkung mit Sauerstoffatomen der Phosphatgruppen im „backbone“ treten (siehe Abb.A.22 in Anhang A.5.1 auf Seite 255). Allerdings erfolgt dieser Angriff in Höhe der mittleren Phosphatgruppe, woraus resultiert, dass sich ein gesamter Strang aus der Struktur löst. Des weiteren lässt sich auf der gegenüberliegenden Seite eine zusätzliche Annäherung eines Erdalkaliions beobachten, das auch dort eine Verzerrung verursacht.

Untersucht man die Wechselwirkungen der Strontiumionen mit der DNA (siehe Abb. A.22), so stellt man ein ausgeprägtes Wanderungsverhalten dieser Ionensorte hin zu speziellen Positionen der DNA-Stränge fest. In noch ausgeprägterem Maße als bei Magnesium- bzw. Calciumionen kommt es zu Annäherungen zwischen Sr^{2+} -Ionen und Atomen des „backbone“-Bereichs, welche zu extrem starken Verzerrungen der Gesamtstruktur führen.

Abb. 7.5 verdeutlicht die Unterschiede anhand der Abstände zwischen ausgewählten „bulk“-Ionen und der DNA. Dabei fällt insbesondere der gleichbleibend geringe Abstand des untersuchten Strontiumions zur DNA auf. Im Gegensatz dazu zeigen die beiden anderen Systeme stärker ausgeprägte Fluktuationen hinsichtlich der Distanzen zwischen den ausgewählten zweiwertigen Ionen außerhalb des Quadruplexes und dem zentralen Biomolekül.

Das Mg^{2+} -Ion verbleibt über einen Zeitraum von 680 ps in einem Abstand von ca. 4,5 Å und entfernt sich anschließend aus dem „Nahbereich“ des Quadruplexes, wohingegen das Ca^{2+} -Ion kurzfristig im Zeitintervall von 370-390 ps seine Distanz zur DNA auf weniger als 3 Å verkürzt.

In allen Systemen kann die Beeinflussung der Quadruplexkonformation durch die Erdalkaliionen im „bulk“ beobachtet werden. Die Konsequenzen hinsichtlich der Stabilitätsänderungen der Tetramereinheiten hängen jedoch in individueller Art und Weise von dem Ort der Wechselwirkung sowie der Erdalkaliionensorte ab.

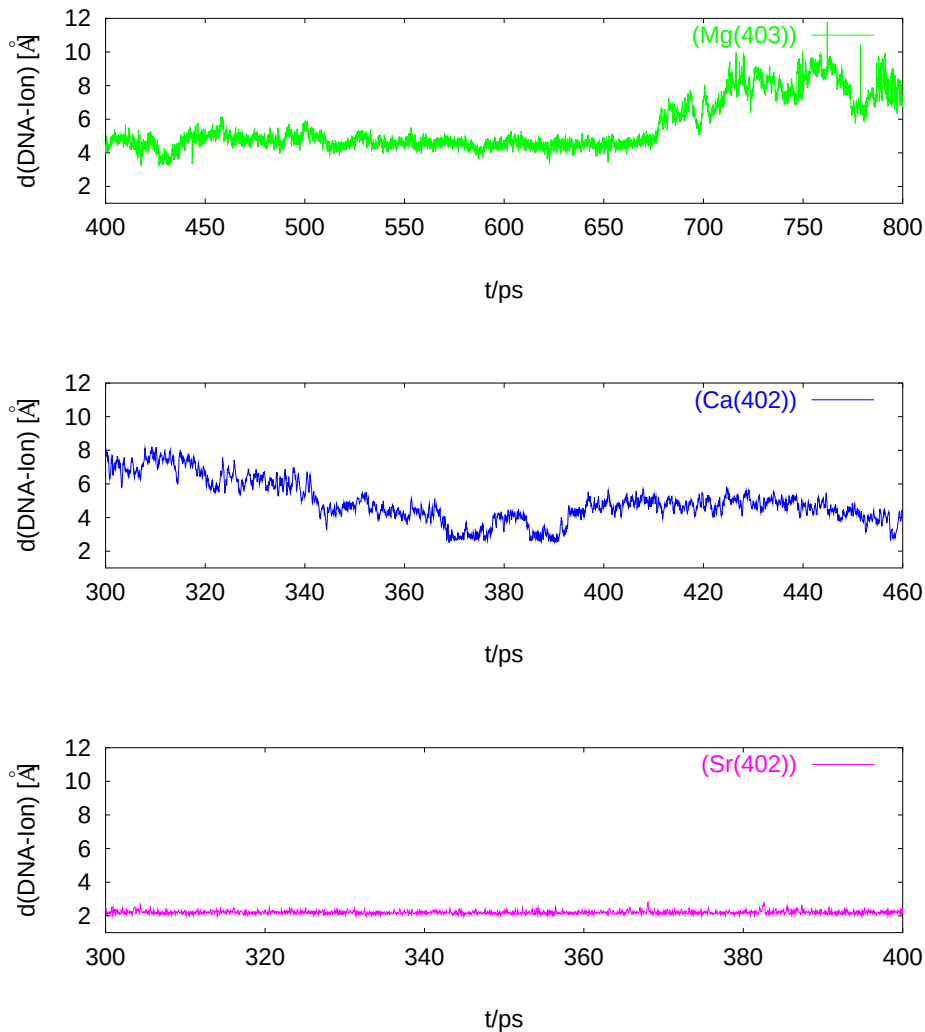


Abb. 7.5: Abstände zwischen speziellen „bulk“-Ionen und der DNA für die gemischten Systeme (beachtet werden sollten die unterschiedlichen Achsenskalierungen)

Anhand von Filmsequenzen kann für die ausgewählten Ca^{2+} - und Sr^{2+} -Ionen eine ausgeprägte Tendenz festgestellt werden, mit einem Phosphatsauerstoffatom in Wechselwirkung zu treten. Das Magnesiumion hingegen interagiert verstärkt mit einem $\text{O5}'$ -Atom einer Desoxyriboseeinheit.

Berücksichtigt man die bisherigen Ergebnisse, so besitzen offensichtlich Strontiumionen das höchste „Deformationspotenzial“, also das stärkste Bestreben, mit der DNA in Wechselwirkung zu treten, gefolgt von Magnesiumionen und Calciumionen, was sich durch energetische Betrachtungen untermauern lässt (siehe Abb. 7.12 auf S. 142).

7.3 Geometrische Auswirkungen

Der Einfluss der differenten Erdalkali-„bulk“-Ionen auf die geometrische Anordnung der Quadruplexstruktur werden im Folgenden untersucht und mit den bereits vorhandenen Ergebnissen der reinen Kaliumsysteme verglichen.

Betrachtet man die auftretenden Ebenenabstände im $d[\text{GGGG}]_4/\text{K-Mg}$ -System in Analogie zu Abb. 5.9, so fallen die bereits bei den Ionenfluktuationen beschriebenen Abstandsvergrößerungen durch entsprechende Verzerrungen in Ebene eins auf. Abb. 7.6 zeigt das zeitliche Abstandsverhalten.

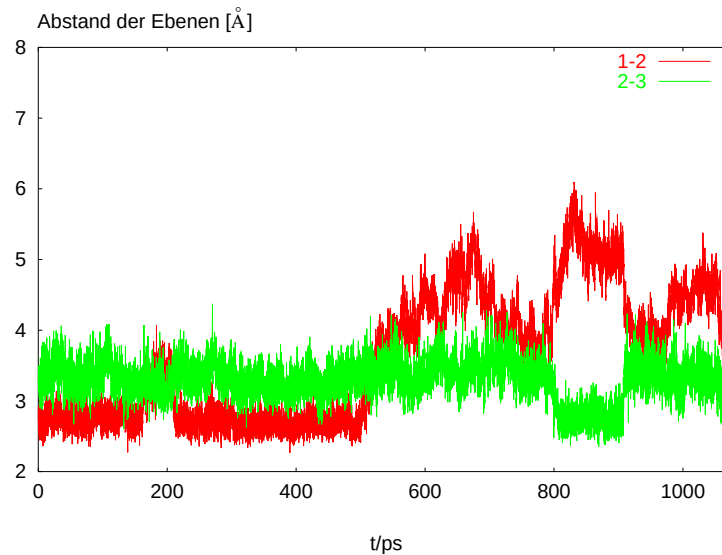


Abb. 7.6: Abstände zwischen den Ebenen 1-2 sowie 2-3 für das $d[\text{GGGG}]_4/\text{K-Mg}$ -System

Deutlich erkennbar sind die auftretenden Vergrößerungen zwischen der Ebene eins und zwei ab 500 ps. Gleichzeitig weist der Abstand zwischen Ebene zwei und drei zwischen 800 ps und 900 ps eine signifikante Erniedrigung auf, die durch die Besetzung dieses Zwischenraumes mit einem Kation hervorgerufen wird.

Die zeitlichen Untersuchungen des Abstands für die beiden anderen Systeme ($d[\text{GGGG}]_4/\text{K-Ca}$, K-Sr) weisen über den betrachteten stabilen Zeitbereich hinweg keine nennenswerten Veränderungen auf und werden daher an dieser Stelle nicht näher betrachtet.

Tab. 7.1 liefert die zeitlich gemittelten Ebenenabstände für alle drei Systeme. Zusätzlich sind die Werte für das $d[\text{GGGG}]_4/\text{K(1)}$ -System aufgeführt (siehe Abb. 6.7), die den Vergleich zu einem reinen Kaliumsystem erlauben. Dabei lassen sich insbesondere hinsichtlich der Ergebnisse der Simulation mit Calciumionen

(Eb. 1-2, 3-4) im „bulk“ signifikante Abstandserhöhungen feststellen. Anwesende Magnesium- bzw. Strontiumionen hingegen bedingen, verglichen mit dem reinen Kaliumsystem, keine relevanten Veränderungen der Ebenenabstände im Quadruplex.

$\langle \text{Ebenenabstand} \rangle_t$ [Å]	1 - 2	2 - 3	3 - 4
d[GGGG] ₄ /K-Mg	2,78 ⁵ ± 0,23	3,30 ± 0,28	2,77 ± 0,16
d[GGGG] ₄ /K-Ca	3,08 ± 0,18	3,33 ± 0,21	2,93 ± 0,21
d[GGGG] ₄ /K-Sr	2,74 ± 0,14	3,35 ± 0,22	2,74 ± 0,20
d[GGGG] ₄ /K(1)	2,69 ± 0,14	3,36 ± 0,21	2,62 ± 0,13

Tabelle 7.1: Mittlere Ebenenabstände mit Standardabweichungen innerhalb der Systeme mit gemischten Ionentypen (zum Vergleich sind die Werte für ein reines Kaliumsystem ebenfalls angegeben)

Eine eingehendere Untersuchung der Abstände der Carbonylsauerstoffatome innerhalb der jeweiligen Ebene zeigt für das K-Mg-System die in Abb. 7.7 dargestellten Verläufe. Abgesehen von den Abständen innerhalb der Ebene eins (auftretende Verzerrungen), weisen die Graphen einen sehr gleichmäßigen Verlauf auf, der lediglich durch Annäherungen von Ionen an die jeweilige Ebene kurzzeitig verändert wird. So erhöht sich z.B. der Abstand der O6-Atome in der Ebene zwei nach ca. 800 ps, da ein Kation durch sie hindurchwandert und anschließend in geringem Abstand verweilt. Die O6-O6-Distanzen „normalisieren“ sich erst durch die Rückkehr dieses Ions in seine „angestammte“ Position.

Die von TÖHL [113] beschriebene generelle Unabhängigkeit der Carbonylsauerstoffabstände bei Annäherungen von Kaliumionen können an dieser Stelle nicht bestätigt werden. Schnelle Ebenendurchtritte solcher Ionen bewirken keine signifikanten Veränderungen, wohingegen der „längere“ Aufenthalt in unmittelbarer Nähe der O6-Atome zu Distanzvergrößerungen zwischen den Carbonylsauerstoffatomen dieser Ebene führt.

Ein analoges Verhalten wird auch bei den beiden anderen Systemen beobachtet. Wie Abb. A.24 in Anhang A.5.3 auf Seite 257 zu entnehmen ist, kommt es zu einer deutlichen Aufweitung der Ebene vier des K-Ca-Systems im Bereich der ersten 40 ps durch die unmittelbare Nähe eines Kaliumions am 5'-Ende. Ebenso weist die

⁵Es wurde über die ersten 500 ps gemittelt, um Effekte, die durch die Deformation der Ebene eins hervorgerufen wurden, auszuschließen.

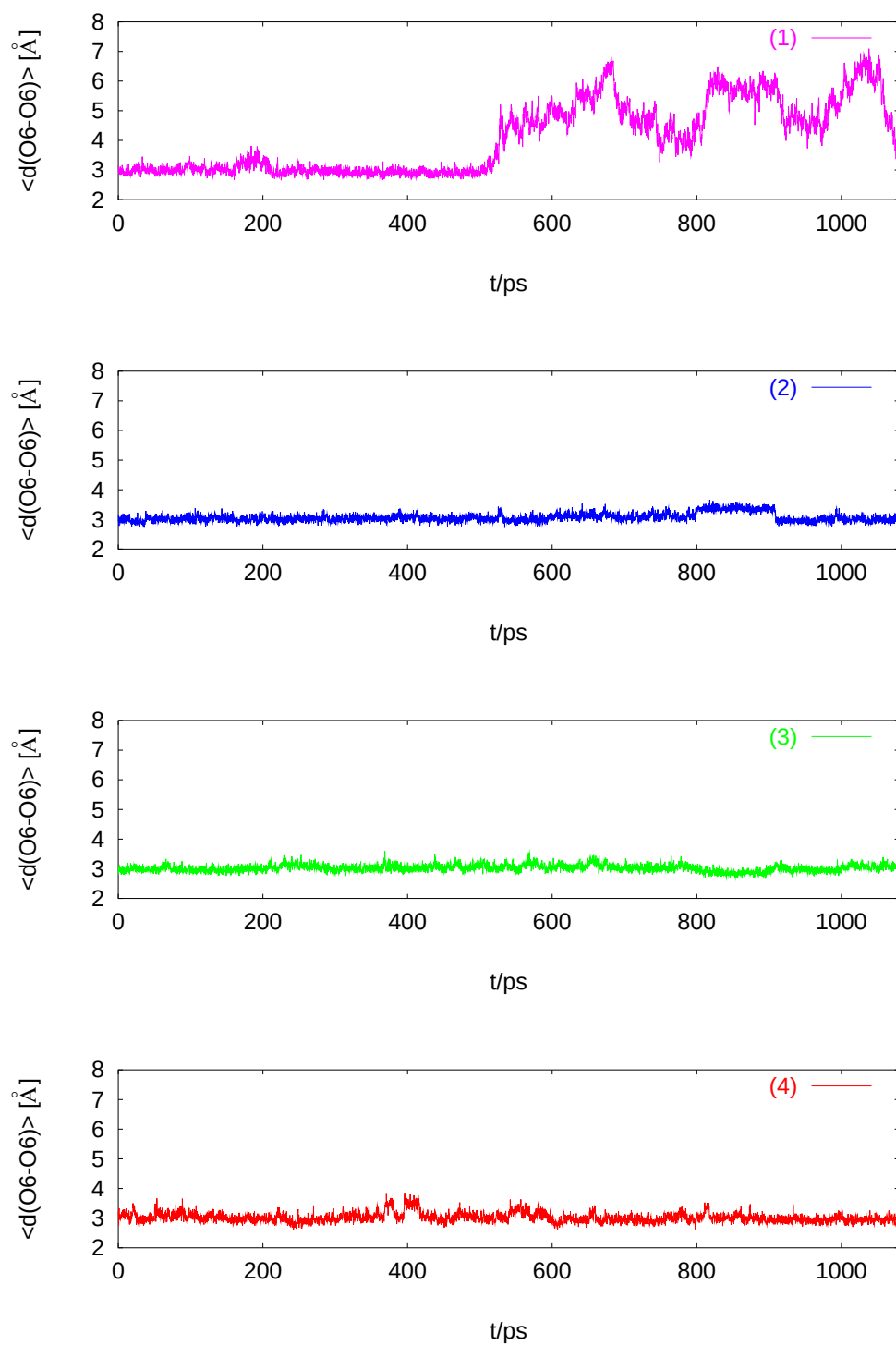


Abb. 7.7: Mittlere O6-O6-Abstände innerhalb der einzelnen Ebenen des Systems $d[\text{GGGG}]_4/\text{K-Mg}$

Ebene vier des K-Sr-Systems eine Vergrößerung des Carbonylsauerstoffabstandes im Zeitbereich zwischen 200 ps und 240 ps auf, die ebenfalls auf die Annäherung eines K^+ -Ions zurückzuführen ist. Der schnelle Durchtritt dieses Kations durch die Ebene nach 375 ps ruft hingegen keine Aufweitung hervor.

Verbunden mit Aufweitungserscheinungen der Käfiggeometrie, kommt es auch bei dem gemischten Systemen zu Fluktuationen hinsichtlich der Diederwinkel. Die Tab. 7.2 listet die mittleren Diederwinkel mit den zugehörigen Standardabweichungen auf.

d[GGGG] ₄		Ebene 1 (3')	Ebene 2	Ebene3	Ebene 4 (5')
K-Mg	$\langle\delta\rangle_t$	42,48°	-2,71°	-2,50°	-0,94°
	σ	41,29°	11,74°	11,88°	12,27°
K-Ca	$\langle\delta\rangle_t$	-2,98°	0,68°	-0,62°	-0,33°
	σ	15,64°	10,60°	11,50°	11,20°
K-Sr	$\langle\delta\rangle_t$	-3,57°	0,51°	-2,32°	-3,35°
	σ	11,66°	10,68°	10,70°	10,28°

Tabelle 7.2: Mittlere Diederwinkel mit Standardabweichung für die gemischten Systeme

Anders als bei den temperaturvariierten Natriumsystemen kann hier kein eindeutiger Trend innerhalb der Systemreihe festgestellt werden. Lediglich die Auslenkungen im 3'-Bereich der jeweiligen Quadruplexe scheinen gegenüber den anderen Ebenenfluktuationen ausgeprägter zu sein. Sowohl die Mittelwerte als auch die Standardabweichungen zeichnen sich durch deutlich erhöhte Werte innerhalb des zugehörigen Systems aus. Beachtet werden sollte an dieser Stelle die extrem starke Auslenkung innerhalb der Ebene eins des K-Mg-Systems, die die entsprechenden Beobachtungen an den visualisierten Folgestrukturen unterstreicht. Wie in Abb. A.25 in Anhang A.5.4 auf Seite 257 dargestellt, kommt es besonders im Zeitbereich ab 500 ps zu einer stark gerichteten Verzerrung der Carbonylsauerstoffebene.

Wie bereits bei den Untersuchungen an Erdalkalisystemen gezeigt wurde (siehe Kapitel 5.4.4), beeinflusst die Art der interkalierten Kationen die äußere Struktur des Quadruplexes nur in geringem Umfang. Inwiefern eine Korrelation zwischen den Kationen im „bulk“ und den Positionen der einzelnen Phosphoratome zueinander besteht, soll an dieser Stelle eingehender untersucht werden.

Tab. 7.3 zeigt die mittleren P-P-Abstände in den jeweiligen Ebenen der gemischten Systeme. Im Vergleich zu den intakten Erdalkalisystemen (siehe Tab. 5.2 auf S. 76) fallen die leicht erhöhten Abstandswerte auf.

Besonders der K-Ca-Tetraplex weist durchgängig höhere P-P-Abstände auf, als direkte Folge des zunehmenden Auswanderns eines gesamten Stranges. Gleichzeitig deutet sich auch an dieser Stelle die geringere Stabilität gegenüber den bislang diskutierten Systemen an.

d[GGGG] ₄	K-Mg	K-Ca	K-Sr
Ebene	$\langle d_{(P-P)} \rangle_{t,n} [\text{\AA}]$	$\langle d_{(P-P)} \rangle_{t,n} [\text{\AA}]$	$\langle d_{(P-P)} \rangle_{t,n} [\text{\AA}]$
1 (3')	15,83 ± 0,40	16,23 ± 0,24	15,94 ± 0,30
2	16,42 ± 0,31	16,38 ± 0,36	16,69 ± 0,33
3 (5')	16,38 ± 0,28	16,58 ± 0,39	16,63 ± 0,24

Tabelle 7.3: Mittlere P-P-Abstände mit Standardabweichung innerhalb einer Ebene für die Systeme d[GGGG]₄/K-Mg, K-Ca, K-Sr

Betrachtet man dagegen die Abstände der Phosphoratome (siehe Tab. 7.4) innerhalb der einzelnen DNA-Stränge, so stellt man fest, dass sie sich kaum von denen der Erdalkalisysteme unterscheiden (vergleiche dazu Tab. 5.3 auf Seite 77). Die Art der interkalierten sowie der restlichen Kationen im „bulk“ besitzt keinen signifikanten Einfluss auf die P-P-Abstände innerhalb der d[GGGG]-Stränge.

d[GGGG] ₄	K-Mg	K-Ca	K-Sr
Strang	$\langle d_{(P-P)} \rangle_{t,n} [\text{\AA}]$	$\langle d_{(P-P)} \rangle_{t,n} [\text{\AA}]$	$\langle d_{(P-P)} \rangle_{t,n} [\text{\AA}]$
1	6,81 ± 0,34	6,79 ± 0,18	6,86 ± 0,23
2	6,84 ± 0,30	6,88 ± 0,20	6,75 ± 0,18
3	6,73 ± 0,20	6,89 ± 0,23	6,91 ± 0,20
4	6,72 ± 0,27	6,79 ± 0,18	6,75 ± 0,24

Tabelle 7.4: Mittlere P-P-Abstände mit Standardabweichung innerhalb eines Stranges für die Systeme d[GGGG]₄/K-Mg, K-Ca, K-Sr

Untersucht man zusätzlich die Trägheitsradien der gemischten Systeme, in die alle Teilchen der DNA einbezogen werden, so erhält man die in Abb. 7.8 dargestellten Verläufe.

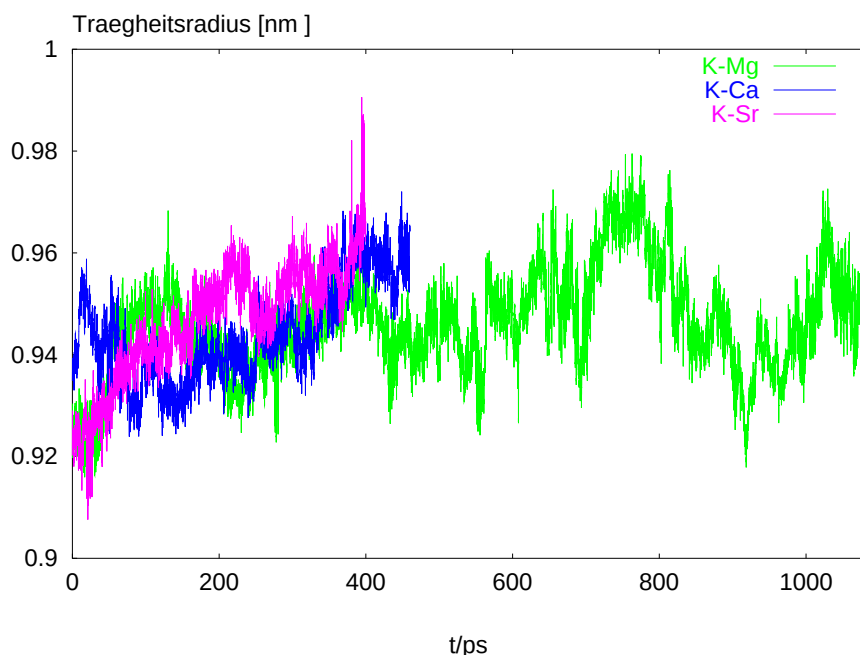


Abb. 7.8: Trägheitsradien für die gemischten Systeme

Auffallend sind hier die deutlichen Anstiege der Kurven bereits nach wenigen Picosekunden. Das System $d[\text{GGGG}]_4/\text{K-Sr}$ ist geprägt von einer fast monotonen weiteren Zunahme des Radius, die lediglich durch die Ausbildung eines schwach ausgeprägten Minimums nach ca. 280 ps kurzzeitig unterbrochen wird, jedoch keiner Ionenbewegung eindeutig zugeordnet werden kann. Die starke Erhöhung zum Ende des Beobachtungszeitraumes hin kann dagegen auf den Austritt eines Kaliumions am 5'-Ende des Quadruplexverbandes zurückgeführt werden.

Das gemischte System mit Magnesiumionen weist, ähnlich wie der K-Ca-Tetraplex, einen deutlich unstetigeren Verlauf auf, der in anschaulicher Weise das wechselseitige Bemühen der eingelagerten Kaliumionen und der „externen“ Mg^{2+} -Ionen dokumentiert, mit den DNA-Strängen zu interagieren. Der Zeitbereich zwischen 500 ps und 750 ps zeigt eine deutliche Vergrößerung des Trägheitsradius auf, in guter Übereinstimmung mit der bereits diskutierten Annäherung eines Erdalkalions (vergleiche dazu S. 126). Erst durch das Hinauswandern eines K^+ -Ions aus dem Käfig am 3'-Ende in den mittleren Hohlraum wird die Kompaktheit der

Gesamtstruktur erhöht.⁶ Das Zurückwandern dieses Ions nach ca. 900 ps kehrt das eben beschriebene Verhalten des Trägheitsradius erneut um. Daraus resultiert ein Anstieg dieses Wertes.

Wie die Untersuchungen verdeutlichen, hängt die Veränderung des Besetzungsmusters in sehr komplexer Weise mit strukturellen Veränderungen des gesamten Systems zusammen.

Betrachtet man hingegen die gemittelten Trägheitsradien (Tab. 7.5), so fällt auf, dass die Werte nahezu identisch sind. Im Vergleich zu den Trägheitsradien der Erdalkali- (siehe Tab. 5.4 auf Seite 78) sowie der Alkalisysteme (vergleiche dazu Tab. 6.2 auf Seite 115) zeigt sich eine reduzierte „Kompaktheit“ der Gesamtstrukturen, infolge einer Erhöhung des mittleren Abstands aller DNA-Atome vom Schwerpunkt des Quadruplexes. Die Fluktuationen bewegen sich in der gleichen Größenordnung, weisen also nicht auf reduzierte Systemstabilitäten hin.

d[GGGG] ₄	K-Mg	K-Ca	K-Sr
$\langle r_{\text{Traegheit}} \rangle_t$ [nm]	0,946 ± 0,010	0,944 ± 0,010	0,947 ± 0,011

Tabelle 7.5: Mittlere Trägheitsradien mit Standardabweichung für die Systeme d[GGGG]₄/K-Mg, K-Ca, K-Sr

Insgesamt lässt sich feststellen, dass singuläre Ereignisse (Annäherung von „bulk“-Ionen an den Tetraplex bzw. Ionenwanderungen im Kanalbereich) den Trägheitsradius des Quadruplexes beeinflussen. Eine generelle Abhängigkeit von der Ionensorte im „bulk“ kann hingegen nicht beobachtet werden.

7.4 Wasserstoffbrückenbindungen

Welchen Einfluss die Anwesenheit der zweiwertigen Kationen im „bulk“ auf die Wechselwirkungen der DNA-Stränge untereinander ausübt, kann anhand einer Betrachtung der Wasserstoffbrückenbindungen für die gemischten Systeme untersucht werden.

Abb. 7.9 zeigt die Anzahl der verschiedenen H-Brückenmuster für die Ebene eins des K-Mg-Systems. Obwohl, wie zuvor bereits diskutiert, eine Guanineinheit aus dem Verband der Ebene eins ausgetreten ist, bilden die restlichen Basen H-Brücken aus. Es zeigt sich, dass auch in diesem System der Abstand der Kationen zu den

⁶Der Austritt kann evtl. auch als Folge der Reduzierung des Trägheitsradius interpretiert werden.

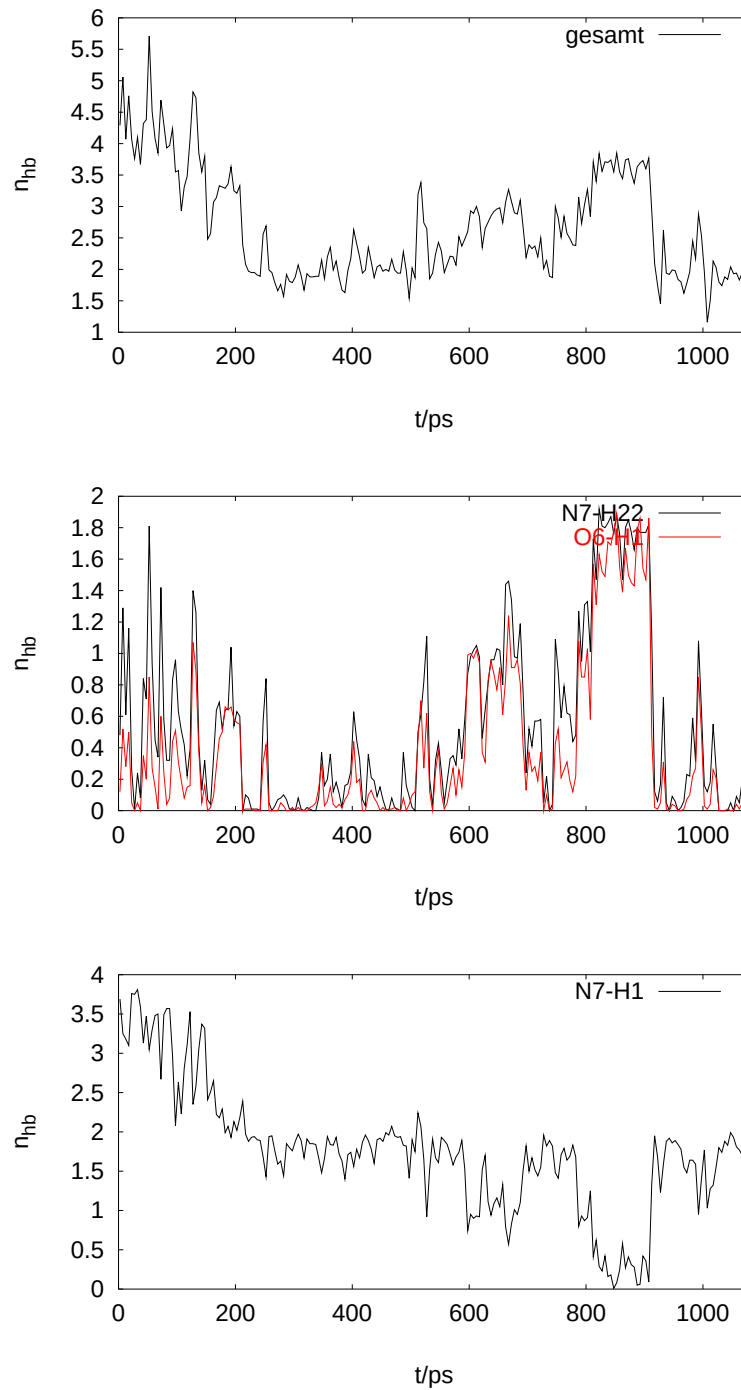


Abb. 7.9: Gesamtanzahl: Wasserstoffbrücken, Hoogsteen-Anteil, N7-H1-Anteil in Ebene 1 des d[GGGG]₄/K-Mg-Systems, gemittelt wurde jeweils über einen Zeitbereich von 5 ps

Ebenen den Typ des bevorzugten Anordnungsmusters bestimmt. So wird durch den Durchtritt eines Kaliumions durch Ebene zwei nach ca. 800 ps die sterische Situation in dem Käfig am 3'-Ende entspannt, sodass sich das Hoogsteen-Muster ausbilden kann, auf Kosten einer kompletten Reduzierung des N7-H1-Anteils. Das Zurückwandern dieses Kations nach ca. 900 ps kehrt die Situation erneut um, der alte Zustand stellt sich wieder ein. Obgleich auch hier, ähnlich wie bei den zuvor untersuchten Alkalisystemen, keine Etablierung einer „reinen“ Form wie etwa bei den Erdalkalisystemen zu beobachten ist, kann doch eine Bevorzugung des N7-H1-Musters ausgemacht werden.

Die Abb. 7.10 und 7.11 zeigen die Verhältnisse in den innen liegenden Ebenen auf. Anders als im Fall der Ebene eins, weist die Ebene zwei bevorzugt H-Brücken vom Hoogsteen-Typ auf. Lediglich für den o.g. Ebenendurchtritt eines Kations kommt es zu einer zeitweiligen Veränderung in Form der Ausbildung von N7-H1-Wasserstoffbrücken. Betrachtet man die Ebene drei, so fällt die deutlich erhöhte Anzahl des letztgenannten Typs über weite Teile des Beobachtungsbereichs auf. Insbesondere bewirkt die Ausweichbewegung des Kaliumions im Hohlraum zwischen Ebene eins und zwei einen Anstieg des N7-H1-Musters in Ebene drei. Ein vergleichbarer Effekt kann im Zeitbereich zwischen 800 ps und 900 ps beobachtet werden. Auch hier erfolgt, quasi vorbereitend auf die bevorstehende Aufnahme eines Ions in den mittleren Käfig, die Aufweitung der Ebenenstruktur durch die Carbonylsauerstoffatome. Dem vorausgehend bedingt die weitere Entfernung eines K^+ -Ions im Zwischenraum von Ebene drei und vier in 5'-Richtung die Ausbildung eines Hoogsteen-Musters im Bereich der Ebene drei.

Untersucht man das Calciumsystem, so sind deutliche Unterschiede zu dem $d[GGGG]_4/K-Mg$ -System zu erkennen. In Ebene eins (siehe Abb. A.26 in Anhang A.5.5 auf Seite 258) herrscht, bis auf die anfängliche Ausbildung des Hoogsteen-Typs, das N7-H1-Muster vor. Vom Grad der Bevorzugung her gesehen, erinnert dies eher an die Erdalkalisysteme als an die meist stark fluktuierende Mischformen ausbildenden Alkaliquadrupele.

Der Trend zur Präferenz einer „Monoform“ setzt sich auch bei den beiden innen liegenden Ebenen fort. Die Abb. A.27 und A.28 auf Seite 258 f. verdeutlichen dies. Während in Ebene zwei der Hoogsteen-Typ weitestgehend vertreten ist, wird die Ebene drei, bedingt durch die Nähe eines Kations, größtenteils durch das N7-H1-Muster dominiert (größere Abstände bringen kurzzeitig auch N7-H22- und O6-H1-Brücken hervor).

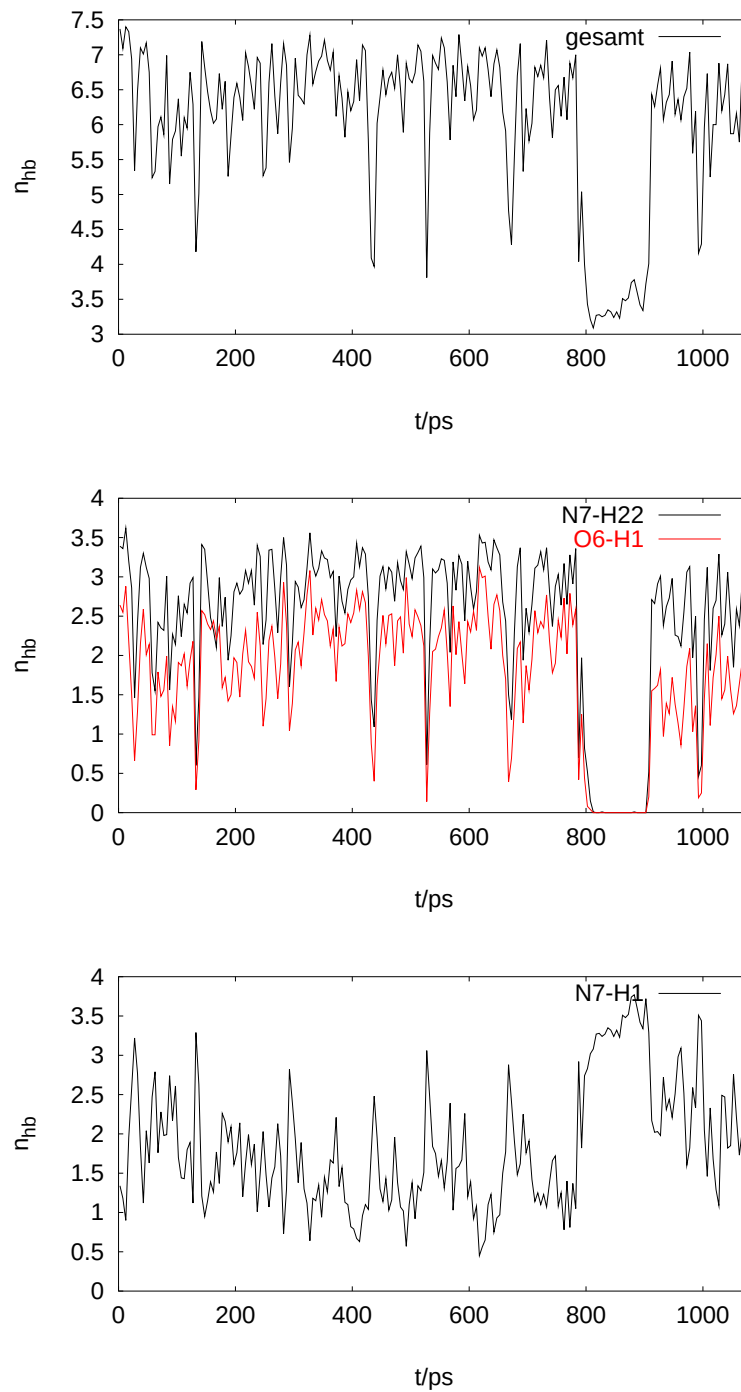


Abb. 7.10: Gesamtanzahl: Wasserstoffbrücken, Hoogsteen-Anteil, N7-H1-Anteil in Ebene 2 des d[GGGG]₄/K-Mg-Systems, gemittelt wurde jeweils über einen Zeitbereich von 5 ps

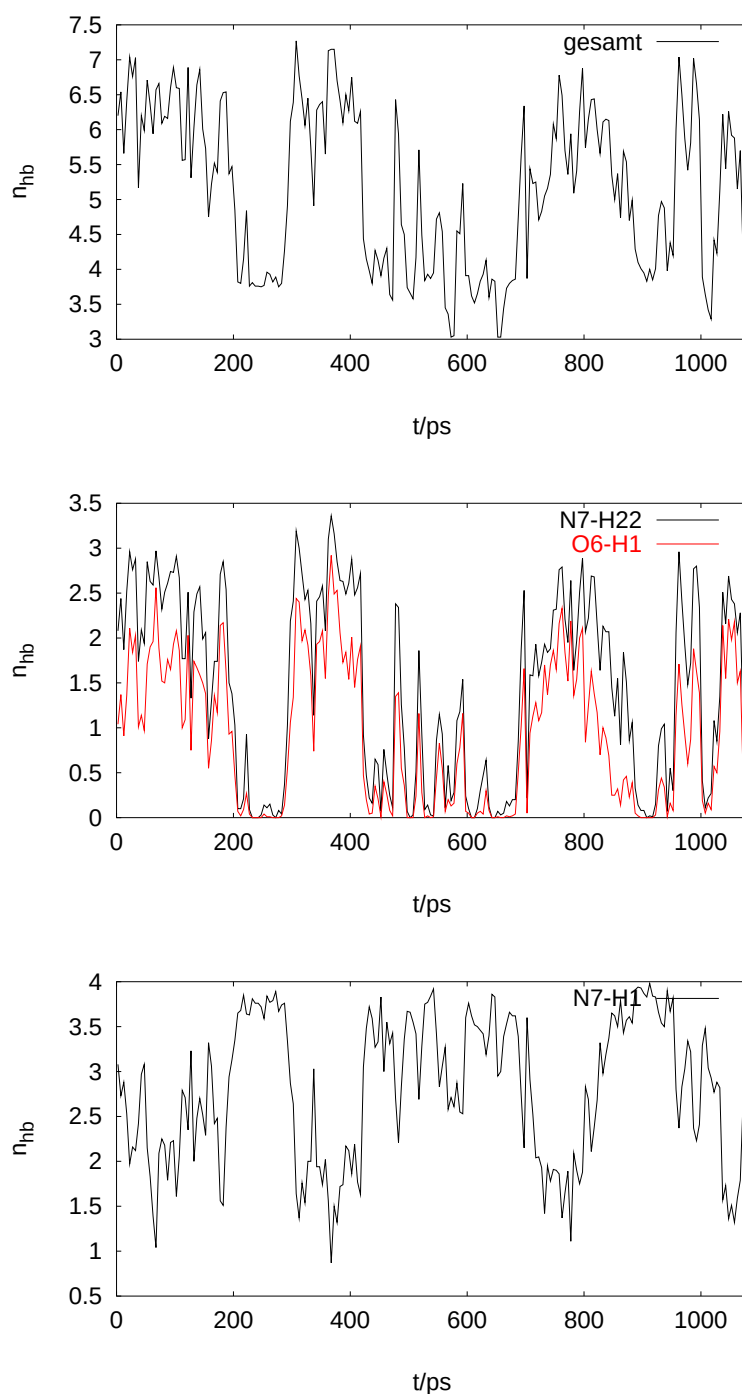


Abb. 7.11: Gesamtanzahl: Wasserstoffbrücken, Hoogsteen-Anteil, N7-H1-Anteil in Ebene 3 des d[GGGG]₄/K-Mg-Systems, gemittelt wurde jeweils über einen Zeitbereich von 5 ps

Die H-Brückenmuster des $d[\text{GGGG}]_4/\text{K-Sr}$ -Systems weisen starke Ähnlichkeiten zu dem analogen Assoziat mit Kalium- und Magnesiumionen auf. Auch hier ist keine eindeutige Bevorzugung eines bestimmten H-Brückentyps zu beobachten. Auf eine detaillierte Betrachtung wird daher an dieser Stelle verzichtet.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass nicht allein die Art der interkalierten Ionen für die Ausbildung eines bevorzugten Musters der Wasserstoffbrücken in den Quadruplexebenen verantwortlich ist. Vielmehr spielt, wie hier gezeigt werden konnte, die Art der umgebenden Kationen eine wichtige Rolle. Ihre Wechselwirkungen mit den einzelnen DNA-Strängen führen zu konformativen Veränderungen der gesamten Quadruplexstruktur, die sich insbesondere in der Ausbildung individueller Wasserstoffbrückenmuster äußern.

7.5 Energetische Betrachtungen

Die Betrachtung einzelner Energieterme ermöglicht, die Ursachen für auftretende Veränderungen auf quantitativer Ebene zu analysieren (siehe Tab. 7.6).

Sie enthält Mittelwerte ausgesuchter Coulomb- und Lennard-Jones-Energien der untersuchten Quadruplexe sowie eine Übersicht der Gesamtenergieinhalte.

Vergleicht man die Werte der Gesamtenergien, so würde sich hinsichtlich der Stabilität eine Reihenfolge ergeben, die das $d(\text{GGGG})_4/\text{K-Sr}$ gegenüber dem $d(\text{GGGG})_4/\text{K-Mg}$ -System bevorzugen würde. Das instabilste Assoziat würde der Quadruplex mit K^+ - und Ca^{2+} -Ionen bilden. Wie sich bereits in den zurückliegenden Diskussionen gezeigt hat, ist dies jedoch nicht die geeignete Größe zur Beurteilung der Stabilitäten von Quadruplexen mit interkalierten Kationen. Vielmehr muss auch an dieser Stelle besonders auf die Wechselwirkungen zwischen DNA und CI eingegangen werden. Unter Berücksichtigung der Summe mittlerer Coulomb- und Lennard-Jones-Beiträge erhält man nahezu identische Werte für die drei untersuchten gemischten Systeme. Die sich aus den geringfügigen Differenzen ergebende Stabilitätsreihenfolge

$$\text{K-Mg} > \text{K-Sr} > \text{K-Ca}$$

sollte daher kritisch interpretiert werden, da die beobachteten Unterschiede hinsichtlich der Strukturfluktuationen und -deformationen wesentlich ausgeprägter „zu Tage treten“.⁷

⁷Im Vergleich zu den „reinen“ Kaliumsystemen (siehe Tab. 5.5 auf Seite 89), ergeben sich weniger stark bindende Wechselwirkungen zwischen DNA und interkalierten Kationen, in Übereinstimmung mit den beobachteten Strukturentwicklungen.

d[GGGG] ₄	K-Mg	K-Ca	K-Sr
$\overline{E}_{tot}[kJ/mol]$	$-6,07 \cdot 10^4$	$-5,50 \cdot 10^4$	$-6,27 \cdot 10^4$
σ	$0,06 \cdot 10^4$	$0,04 \cdot 10^4$	$0,06 \cdot 10^4$
$\overline{E}_{pot-tot}[kJ/mol]$	$-6,94 \cdot 10^4$	$-6,36 \cdot 10^4$	$-7,13 \cdot 10^4$
σ	$0,07 \cdot 10^4$	$0,04 \cdot 10^4$	$0,06 \cdot 10^4$
$\overline{E}_{coul-DNA/DNA}[kJ/mol]$	$-3,13 \cdot 10^3$	$-3,24 \cdot 10^3$	$-3,42 \cdot 10^3$
σ	$0,27 \cdot 10^3$	$0,27 \cdot 10^3$	$0,33 \cdot 10^3$
$\overline{E}_{coul-DNA/CI}[kJ/mol]$	$-5,56 \cdot 10^3$	$-5,56 \cdot 10^3$	$-5,45 \cdot 10^3$
σ	$0,29 \cdot 10^3$	$0,43 \cdot 10^3$	$0,25 \cdot 10^3$
$\overline{E}_{coul-CI/CI}[kJ/mol]$	$4,88 \cdot 10^2$	$3,86 \cdot 10^2$	$4,77 \cdot 10^2$
σ	$1,97 \cdot 10^2$	$1,22 \cdot 10^2$	$1,82 \cdot 10^2$
$\overline{E}_{lj-DNA/DNA}[kJ/mol]$	$-1,31 \cdot 10^3$	$-1,32 \cdot 10^3$	$-1,31 \cdot 10^3$
σ	$0,03 \cdot 10^3$	$0,04 \cdot 10^3$	$0,04 \cdot 10^3$
$\overline{E}_{lj-DNA/CI}[kJ/mol]$	$7,77 \cdot 10^1$	$10,10 \cdot 10^1$	$7,22 \cdot 10^1$
σ	$1,61 \cdot 10^1$	$1,92 \cdot 10^1$	$1,51 \cdot 10^1$
$\overline{E}_{lj-CI/CI}[kJ/mol]$	$-35,20 \cdot 10^{-4}$	$-9,54 \cdot 10^{-4}$	$-18,10 \cdot 10^{-4}$
σ	$36,41 \cdot 10^{-4}$	$14,55 \cdot 10^{-4}$	$17,46 \cdot 10^{-4}$
$\overline{\mathbf{E}}_{coul} + \overline{\mathbf{E}}_{lj}[\mathbf{kJ/mol}]$	$-94,33 \cdot 10^2$	$-96,29 \cdot 10^2$	$-96,33 \cdot 10^2$
$(\overline{\mathbf{E}}_{coul} + \overline{\mathbf{E}}_{lj})_{DNA/CI}[\mathbf{kJ/mol}]$	$-54,79 \cdot 10^2$	$-54,68 \cdot 10^2$	$-53,78 \cdot 10^2$

Tabelle 7.6: Mittlere Gesamtenergie, gesamte potentielle Energie sowie Coulomb- (DNA/CI) (CI/CI) (DNA/DNA) und entsprechende Lennard-Jones-Energien für die gemischten Systeme

Wie schon bei der Untersuchung der Endstrukturen deutlich wurde, muss die Ursache für Stabilitätsunterschiede gegenüber vergleichbaren Quadruplexen des Mono-Iontentyps in der Wechselwirkung zwischen den DNA-Strängen und den Kationen im „bulk“ (BI) gesucht werden. Abb. 7.12 zeigt zu diesem Zweck exemplarisch den zeitlichen Verlauf der Coulombenergie zwischen DNA und BI des d(GGGG)₄/K-Mg- sowie des d(GGGG)₄/K-Sr-Systems.

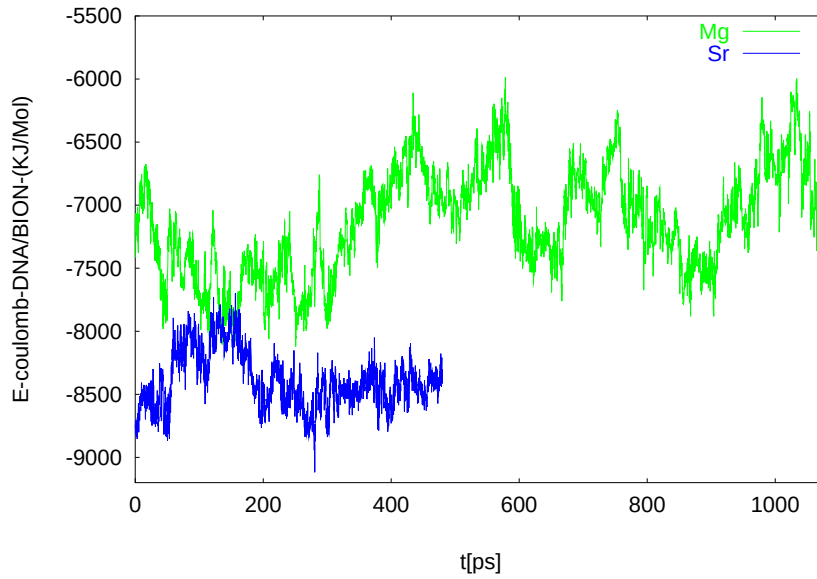


Abb. 7.12: Verlauf der Coulombenergie DNA/BI für die Systeme $d[\text{GGGG}]_4/\text{K-Mg}$ und $d[\text{GGGG}]_4/\text{K-Sr}$

Hieran lässt sich anschaulich ablesen, dass die Strontiumionen in wesentlich stärkerem Maße bindende Wechselwirkungen mit der DNA eingehen als die Magnesiumionen. Daraus resultiert das beobachtete erhöhte Bestreben, negativ polarisierte Bereiche der Basenstränge in die eigene Koordinationssphäre aufzunehmen. Dies führt zwangsläufig zu starken Deformationen des Quadruplexes, die durch die eingelagerten Kaliumionen nur bedingt kompensiert werden können.

Vergleicht man die zeitlich gemittelten Coulombenergien zwischen DNA und BI der gemischten Systeme mit einem „reinen“ Kaliumsystem (K1), so fallen die stärker bindenden Wechselwirkungen der zweiwertigen Kationen auf. Die dargestellten Energierterme beziehen sich auf die Summe der Coulomb-Wechselwirkungen zwischen den DNA-Strängen und den Ionen im „bulk“. Dabei ist die Anzahl der Erdalkalikationen vier, wohingegen acht Kaliumionen außerhalb des DNA-Quadruplexes angesiedelt sind. Dementsprechend ist der Betrag der Coulombenergie eines einzelnen K^+ -Ions deutlich gegenüber dem eines zweiwertigen Mg^{2+} - bzw. Sr^{2+} -Ions reduziert.

- $d[\text{GGGG}]_4/\text{K-Mg}$: $\overline{E}_{\text{coul-DNA/BI}} = -7,13 \cdot 10^3 \text{ [kJ/mol]}$
- $d[\text{GGGG}]_4/\text{K-Sr}$: $\overline{E}_{\text{coul-DNA/BI}} = -8,39 \cdot 10^3 \text{ [kJ/mol]}$
- $d[\text{GGGG}]_4/\text{K(1)}$: $\overline{E}_{\text{coul-DNA/BI}} = -7,14 \cdot 10^3 \text{ [kJ/mol]}$

Dies führt zu einer erhöhten Beeinflussung der Geometrie der DNA-Stränge durch einzelne Erdalkalitionen und damit verbunden zu Deformationen der gesamten Quadruplexkonformation.

Innerhalb der reinen Erdalkalisysteme treten die oben beschriebenen Phänomene nicht auf, da die von innen auf den Quadruplex wirkenden, stabilisierenden Kräfte der Kationen die von außen wirksam werdenden anziehenden Kräfte der „bulk“-Ionen in stärkerem Maße kompensieren (siehe Tab. 5.5 auf S. 89 sowie Abb. A.10 und A.11 in Anhang A.2.6 auf S. 244).⁸

Die erhöhte Affinität der Erdalkalitionen in gemischten Systemen gegenüber dem Bereich des „backbones“ sowie der Guaninbasen im Vergleich zu reinen Erdalkalisystemen wird bedingt durch die reduzierte Abstoßung zwischen den interkalierten einwertigen Kationen und den zweiwertigen außerhalb des Quadruplexes. Eine Annäherung der „bulk“-Ionen wird dadurch erleichtert. Die anziehende Wechselwirkung zwischen diesen geladenen Teilchen und bestimmten Bereichen der DNA erhöht sich. Daraus resultiert insgesamt eine stärkere Beeinflussung der d[GGGG]₄-Struktur, die demzufolge zu konformativen Änderungen neigt.

Wie in diesem Kapitel gezeigt werden konnte, besitzen die Kationen im „bulk“ eine eminente Bedeutung hinsichtlich der Stabilität sowie konformativer Eigenschaften des Quadruplexes. Besonders durch die differenten Ladungen der interkalierten einwertigen K⁺-Ionen im Vergleich zu den die DNA-Struktur umgebenden zweiwertigen Erdalkalitionen, ergeben sich deutliche Unterschiede gegenüber dem Verhalten reiner Kaliumsysteme. Diese äußern sich insbesondere durch eine reduzierte Ionenbewegung entlang der helikalen Achse. Insgesamt ist eine deutlich gesteigerte Tendenz zur Destabilisierung zu beobachten, die auf die erhöhte Wechselwirkung zwischen den zweiwertigen Kationen und dem „backbone“-Bereich des Quadruplexes zurückgeführt werden kann. Daraus ergeben sich konformative Veränderungen, die sowohl die Geometrie der einzelnen Stränge als auch die Anordnung zueinander (Ebenenabstände, Wasserstoffbrückenbindungen) prägen.

Durch eine eingehende Untersuchung einzelner Energieterme konnte eine reduzierte Coulombwechselwirkung zwischen DNA und interkalierten Kaliumionen als mögliche Ursache für die verringerte Stabilität dieser Quadruplexsysteme identifiziert werden. Sie resultiert aus dem Wechselspiel abstoßender Kräfte zwischen ein- und zweiwertigen Kationen auf der einen Seite sowie bindenden Kräften zwischen

⁸Aufgrund der Anzahl (8) der mit einem Kation in Wechselwirkung tretenden Carbonylsauerstoffatome im Inneren des Quadruplexverbandes, im Gegensatz zu Sauerstoffatomen einer Phosphatgruppe (2), kann ein einzelnes interkaliertes Ion die Gesamtstruktur sehr effektiv stabilisieren.

DNA-Fragmenten und Erdalkaliionen auf der anderen, die in äußerst komplexer Weise zusammenhängen.

Eine allgemeine Gültigkeit dieser Ergebnisse im Hinblick auf Stabilität sowie Quadruplexgeometrien sollte mit Vorsicht beurteilt werden, da das verwendete Kraftfeld für Biomoleküle optimiert wurde. Wie die vorausgehenden Kapitel gezeigt haben, eignet sich die implementierte Parametrisierung zur Beschreibung der Entwicklung von Quadruplexsystemen mit gleichartigen Ionentypen. Inwieweit die gleichzeitige Wechselwirkung sowohl zwischen verschiedenen Arten von Kationen untereinander als auch mit geladenen DNA-Strängen korrekt durch die Kraftfeldparameter berücksichtigt wird, kann an dieser Stelle nicht abschließend beurteilt werden. Dementsprechend bedarf es weiterer eingehender Studien hinsichtlich der Gültigkeit der Kraftfeldparameter der zweiwertigen Kationen für diese Simulationssysteme.

Kapitel 8

Die Rolle der umgebenden Hydrathülle

Die Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen komplexen, biologisch relevanten Molekülen und der sie umgebenden Wasserhülle ist schon seit mehreren Jahren Gegenstand ausgedehnter Forschungsaktivitäten. Bereits in den fünfziger Jahren stellte man fest, dass Stabilitäten und konformative Änderungen von „Biomolekülen“ sehr stark von dem Grad der Hydratation abhängig sind [44]. Für ein tiefgreifendes Verständnis des Verhaltens von DNA- bzw. RNA-Molekülen muss daher insbesondere die umgebende Hydrathülle berücksichtigt werden, die durch vielfältige Wechselwirkungen die Solvatstruktur beeinflusst und so für die Funktionalität der gelösten Spezies maßgeblich mitverantwortlich ist.

Zahlreiche Informationen zur Hydratation doppelhelikaler DNA-Strukturen konnten mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse [24], der IR- UV- sowie NMR-Spektroskopie [38][37][53] sowie Computersimulationen [42] gewonnen werden.

Die Ausbildung geordneter, bindender Wechselwirkungen zwischen den Basenpaaren in der kleinen Furche (hier speziell zu den Sauerstoff bzw. Stickstoffatomen) von DNA-Strängen in der B-Form, die bevorzugt in wässriger Lösung ausgebildet wird, und umgebenden Wassermolekülen konnte experimentell beobachtet werden [96][123]. Demgegenüber stellt man in der näheren Umgebung der Phosphatgruppen (große Furche) keine geordneten Strukturen fest [23].

Aufenthaltssorte in der ersten Hydratschale der DNA, die sich durch eine ausgeprägte Verweildauer der angelagerten Wassermoleküle auszeichnen, befinden sich in der Nähe der Basen, des „backbones“ sowie der Phosphatgruppen [96].

Eine andere „Sorte“ Wassermoleküle, die über Wasserbrücken „lose“ an die DNA-Stränge assoziiert ist, bildet eine zweite Hydratschale aus [97].

Hinsichtlich der Hydratation von Quadruplexstrukturen hingegen liegen bislang erst wenige Untersuchungsergebnisse vor. Besonders hervorzuheben ist hier die Röntgenstrukturanalyse eines $d[\text{TGGGGT}]_4$ -Systems, die assoziierte Wassermoleküle („spine of hydration“) in den Furchen des Quadruplexes nachweist [70].

Inwiefern diese kristallinen Eigenschaften auf das Verhalten in wässriger Lösung übertragen werden können, wird im Folgenden eingehender untersucht. Dabei können durch zweidimensionale „scatterplots“ [67] die bevorzugten Positionen für eine Hydratation sichtbar gemacht werden.

Ergänzend dazu lässt sich gezielt die Dynamik der Hydratation innerhalb lokaler Bereiche des Quadruplexes qualitativ mit Hilfe von Filmsequenzen untersuchen, die einen dreidimensionalen Einblick in relevante Systemkomponenten erlauben. So sind sehr anschaulich Korrelationen zwischen Strukturmerkmalen der DNA, interkalierten Ionen sowie umgebenden Wassermolekülen nachzuweisen.

Die Untersuchung des Hydratationsgrades, der Ausdehnung der Hydratschalen und der Verweilzeit spezieller Wassermoleküle in Bezug auf individuelle Teilstrukturen liefern wertvolle Informationen hinsichtlich des Stabilisierungseinflusses der Solvenshülle auf die Quadruplexstruktur.

Der Vergleich unterschiedlicher Systeme bietet dabei eine interessante Möglichkeit, den Einfluss variierender Ionensorten und Temperaturen auf das Hydratationsverhalten von $d[\text{GGGG}]_4$ -Strukturen zu charakterisieren.

8.1 Solvatstrukturen

Die Betrachtung einzelner Momentaufnahmen der Quadruplexe zu verschiedenen Zeitpunkten ist sinnvoll, um konformative Änderungen der DNA im Verlauf der Simulation sichtbar zu machen. Für eine Untersuchung der Hydratisierung der DNA-Stränge kann man jedoch aufgrund der Vielzahl an umgebenden Wassermolekülen und der daraus resultierenden Komplexität mit Hilfe dieser Darstellungsart keine zuverlässigen Aussagen hinsichtlich exponierter Aufenthaltsorte der Solvensmoleküle treffen.

Eine alternative Art der Darstellung bieten die bereits zuvor erwähnten „scatterplots“. Ausgehend von einer Startkonfiguration wird der Schwerpunkt des Quadruplexes in den Ursprung des Koordinatensystems verschoben. Anschließend werden die Hauptträgheitsachsen mit Hilfe einer Rotationsmatrix über die Koordinatenachsen gelegt. Weitere Konfigurationen werden durch einen „least square fit“ optimal mit der Ausgangsstruktur zur Deckung gebracht, so dass die Summe der Abstände der DNA-Atome zeitlich aufeinander folgender Strukturen minimiert wird (siehe dazu auch Kapitel 5.1.1).

Dies Verfahren erlaubt, unterschiedliche Schichten der Simulationsbox zu untersuchen, indem die Positionen aller Atome im betrachteten Volumenelement als Punktprojektionen in eine Ebene dargestellt werden und diese über ein bestimmtes Zeitintervall gesammelt werden. Die bevorzugten Positionen der Solvensmoleküle werden ebenso wie die der interkalierten bzw. assoziierten Ionen in Relation zu den DNA-Strängen bestimmt.¹

Hydratisierung der Ionen an den Kanalenden des Quadruplexes

Zunächst werden dabei Schnitte parallel zur helikalen Achse untersucht. Für das System d[GGGG]₄/Ca zeigt Abb. 8.1 eine entsprechende Auftragung, die 200 Konfigurationen des Simulationsintervalls von 300-340 ps berücksichtigt.

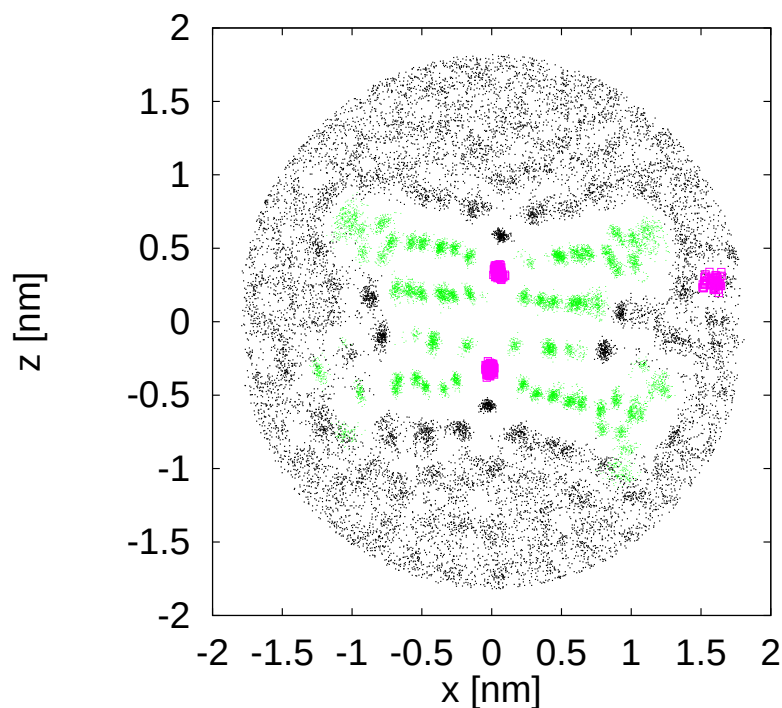


Abb. 8.1: „scatterplot“ für das System d[GGGG]₄/Ca (300-340 ps, 200 Konfigurationen, Schichtdicke 2.6 Å, DNA: grün, H₂O: schwarz, Ionen: pink, 3'-Ende: oben)

Gut erkennbar sind die vier Quadruplexebenen mit den beiden interkalierten Calciumionen. Ein weiteres Ion befindet sich am rechten Bildrand ca. 5 Å von den nächsten Atomen der DNA entfernt. Die Wassermoleküle werden durch die

¹Translations- und Rotationsbewegungen der Tetramereinheit werden somit ausgeglichen.

punktförmig dargestellten Positionen der jeweiligen Sauerstoffatome repräsentiert. Man erkennt deutlich die bevorzugte Ausrichtung der Basenebenen in Richtung der eingelagerten Ca^{2+} -Ionen. Gleichzeitig fällt auf, dass die Käfigausgänge jeweils durch ein Wassermolekül blockiert werden (vergleiche dazu auch [113]). Dies bewirkt eine ungleichmäßige Koordination der beiden endständigen Ionen. Zu den acht Koordinationsstellen der Carbonylsauerstoffatome kommt so eine weitere hinzu, die zu einer neunfachen Koordination der Ionen an den Quadruplexenden führt. Für die beiden anderen Erdalkalisysteme ergibt sich bei gleichartigem Besetzungsmuster eine vergleichbare Hydratisierung. Sie weisen ebenfalls jeweils ein Wassermolekül an den 3'- und 5'-Enden auf. Auf eine explizite Darstellung wird daher an dieser Stelle verzichtet.

Für das Natriumsystem bei 300 K verdeutlicht Abb. 8.2 über das Zeitintervall von 150-190 ps die Solvatisierung der endständigen Kationen.

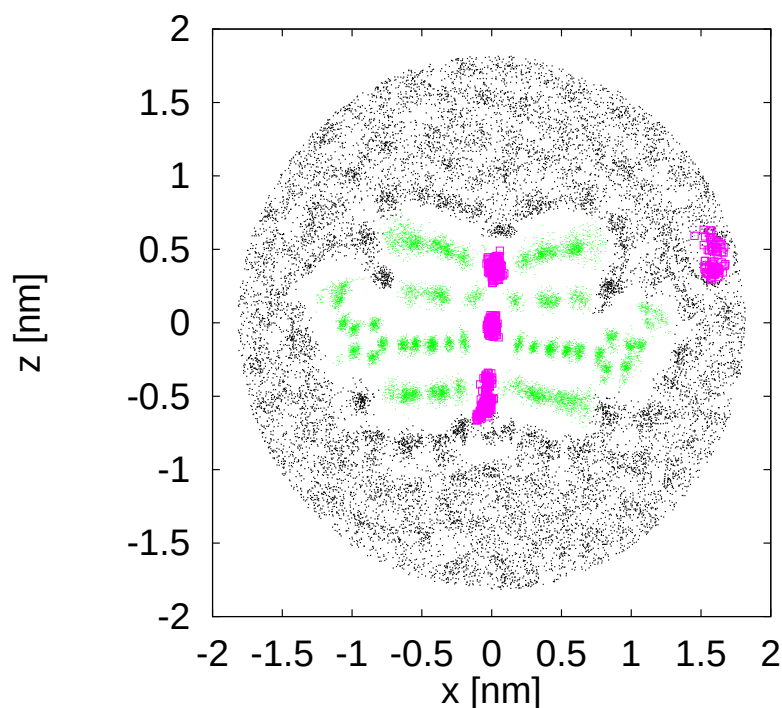


Abb. 8.2: „scatterplot“ für das System $d[\text{GGGG}]_4\text{-Na}(300)$ (150-190 ps, 200 Konfigurationen, Schichtdicke 2.6 Å, DNA: grün, H_2O : schwarz, Ionen: pink, 3'-Ende: oben)

Gegenüber den Assoziaten mit zweiwertigen Ionen fällt auf, dass die Positionen der drei zentralen Na^+ -Ionen weniger stark determiniert sind und deutlich stärkere

Ortsfluktuationen aufweisen. Besonders am 5'-Ende (unten liegend) werden die Fluktuationen des Ions und der umgebenden Basen sichtbar, die sich durch die reine Betrachtung der Ionenstellung in Bezug auf die Carbonylsauerstoffe nicht so deutlich äußern (vergleiche dazu Abb. 6.17).

Das Natriumion am 5'-Ende wird durch mehrere Wassermoleküle solvatisiert, wohingegen das interkalierte Ion am 3'-Ende sehr spezifisch durch ein H₂O-Molekül zusätzlich koordiniert wird. Dessen Position ist jedoch im Vergleich zu den Erdalkalisystemen weitaus weniger festgelegt. Dies ist offensichtlich ein Resultat der geringeren Ladungszahl, die zu einer reduzierten Wechselwirkung mit dem negativ polarisierten Sauerstoffatom des Wassers führt.

Die Ergebnisse eines analogen Natriumsystems bei erhöhter Temperatur ($T = 360$ K; Bereich des Schmelzpunktes) sind in Abb. 8.3 dargestellt. Die gesteigerte thermische Gesamtenergie des Systems lässt kaum noch exponierte Positionen der Wassermoleküle in Bezug auf die DNA-Struktur erkennen. Insbesondere ist die Besetzung der „freien“ Koordinationsstellen durch spezielle Wassermoleküle nicht mehr zu erkennen. Die Gestalt der Hydrathülle „verschwimmt“, die Solvensmoleküle passen sich der Verteilung im „bulk“ an.

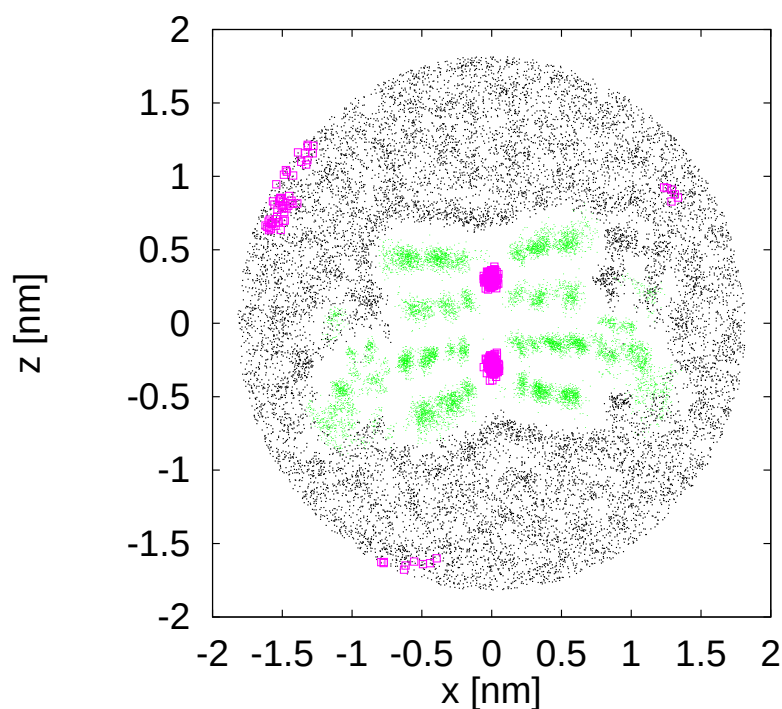


Abb. 8.3: „scatterplot“ für das System d[GGGG]₄-Na(360) (150-190 ps, 200 Konfigurationen, Schichtdicke 2.6 Å, DNA: grün, H₂O: schwarz, Ionen: pink, 3'-Ende: oben)

Allgemein lässt sich feststellen, dass ein hohes Bestreben der umgebenden Solvensmoleküle besteht, die terminalen Kationen innerhalb des d[GGGG]₄-Quadruplex-Kanals zu komplexieren. Dieses Verhalten wird bei einer Temperatur von 300 K sowohl für Alkali- als auch Erdalkali-Quadruplexe beobachtet.

Hinsichtlich der Stärke mit der die einzelnen Ionen koordiniert werden, lassen sich indes individuelle Unterschiede erkennen. So beobachtet man bei einwertigen Kationen eine deutlich stärkere Ausprägung von Ortsfluktuationen der assoziierten Wassermoleküle im Vergleich zu den entsprechenden zweiwertigen Kationen. Offensichtlich vermögen die Erdalkaliionen aufgrund ihrer erhöhten Ladung, ein H₂O-Molekül besonders effektiv in ihrer Koordinationssphäre zu binden.

Die zusätzliche Koordination durch ein Wassermolekül trägt zu einer Stabilisierung des Quadruplexes bei, da es die Enden der Tetramereinheiten blockiert und so zusätzlich² die interkalierten Kationen an einem Verlassen des Quadruplexkanals hindert.

Temperaturerhöhungen lassen die geordneten Solvatstrukturen wie erwartet verschwinden. Die stabilisierenden Effekte der Solvensmoleküle auf den Quadruplex sowie die interkalierten Kationen reduzieren sich. Dementsprechend wird das „Schmelzen der Zentralstruktur unterstützt“.

Solvatstruktur im Bereich der Furchen („spine of hydration“)

Die DNA-Atome werden ebenfalls durch eine Hydrathülle solvatisiert, deren Wassermoleküle sich jedoch weitaus diffuser um das „zentrale“ Biomolekül anordnen. Wie man bereits Abb. 8.1 entnehmen konnte, lassen sich assoziierte Wassermoleküle in den Furchen der DNA identifizieren. Um die Anordnung dieser Wassermoleküle zu untersuchen, wird ein Schnitt senkrecht zur helikalen Achse vorgenommen.

Abb. 8.4 zeigt für das System d[GGGG]₄/Sr eine entsprechende Auftragung. Man erkennt deutlich vier Wassermoleküle, die sich in der Nähe der N2-Stickstoffatome der Guaninbasen innerhalb exponierter Bereiche aufhalten. Gleichzeitig sorgen weitere Solvensmoleküle für eine zusätzliche Verbrückung zwischen den benachbarten Guaninsträngen.

Abb. 8.5 verdeutlicht die geometrische Anordnung der Wassermoleküle um die Ebene zwei innerhalb des o.g. Systems nach 325 ps, welche exemplarisch für den Zeitbereich von 300-340 ps anzusehen ist.³ Hierbei werden Solvensmoleküle berück-

²Die bindenden Wechselwirkungen zwischen Carbonylsauerstoffatomen und den Kationen sind maßgeblich für deren Verbleiben im Kanal verantwortlich.

³Zum besseren Verständnis sind die vier besonderen Wassermoleküle in zylindrischer Form dargestellt.

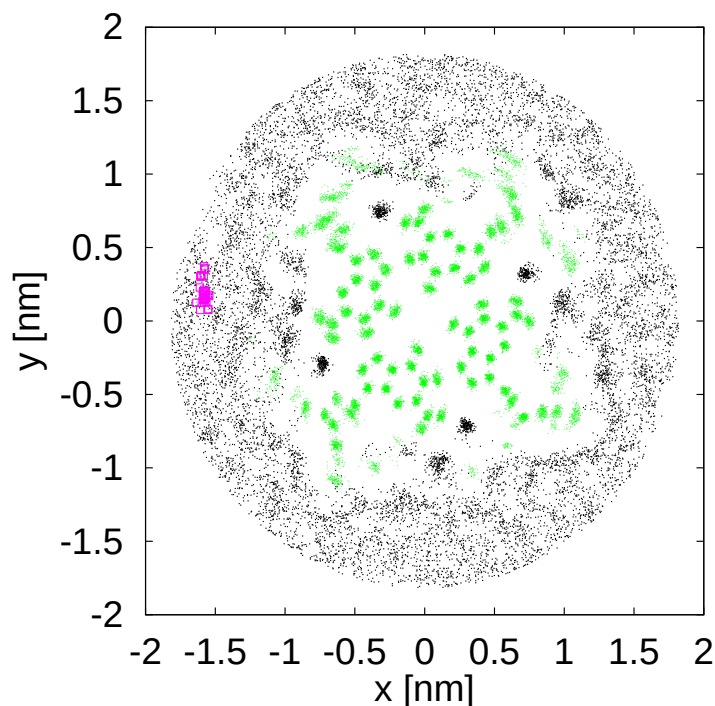


Abb. 8.4: „scatterplot“ für das System $d[\text{GGGG}]_4/\text{Sr}$ senkrecht zur helikalen Achse (Ebene zwei, 300-340 ps, 200 Konfigurationen, Schichtdicke $2.5 \text{ \AA}$, DNA: grün, H_2O : schwarz, Ion: pink)

sichtigt, die sich in einem Zylinder um das Zentrum des mittleren Käfigs befinden und gleichzeitig einen Abstand von weniger als $3,5 \text{ \AA}$ zu einem DNA-Atom der Ebene zwei aufweisen.⁴

Die auftretenden Wasserstoffbrückenbindungen der DNA-Stränge untereinander, der H_2O -Moleküle zur DNA sowie die zwischen den Wassermolekülen sind gestrichelt dargestellt (vergleiche dazu S. 79).

Im betrachteten Zeitintervall herrscht das alternative N7-H1-Wasserstoffbrückenmuster vor. Anders als im Fall einer Hoogsteenordnung stehen die beiden Aminowasserstoffatome (H21 bzw. H22) für die Wechselwirkung mit der umgebenden Hydrathülle zur Verfügung und sind so in der Lage, eine Wasserstoffbrücke zu den sie umgebenden Solvensmolekülen auszubilden.

Es zeigt sich, dass die besonders hervorgehobenen vier Wassermoleküle (durch Pfeile gekennzeichnet) eine verbrückende Funktion zwischen den „innen liegenden“ Basen und dem Bereich des „backbones“ besitzen. Dabei treten direkte Verknüpfungen über ein einzelnes H_2O -Molekül zwischen einem Wasserstoffatom der NH_2 -Gruppe

⁴Zylinderradius: $6 \text{ \AA}$, Zylinderlänge: $11,5 \text{ \AA}$

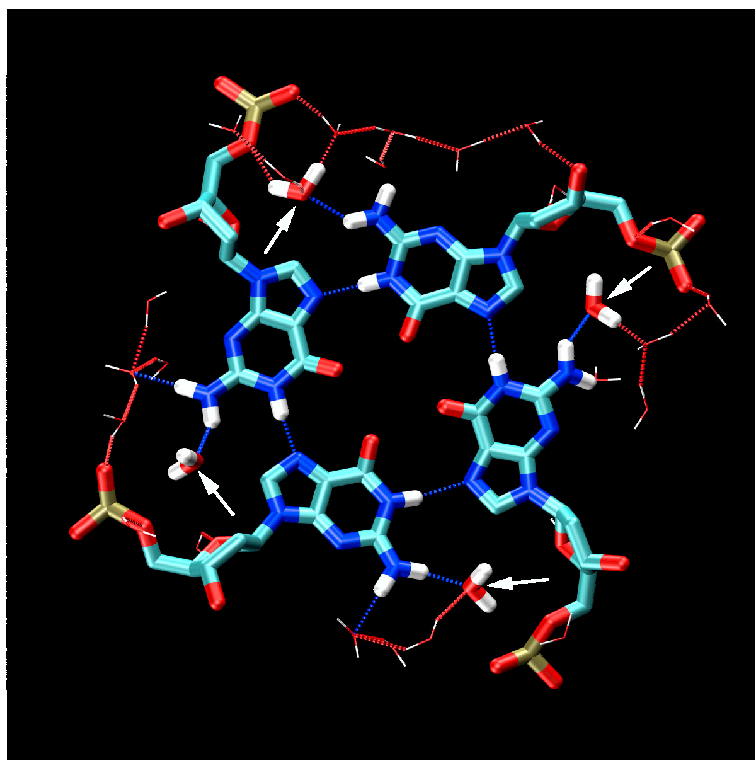


Abb. 8.5: Ebene zwei des Systems $d[GGGG]_4/Sr$ nach 325 ps

und einem Sauerstoffatom der Phosphordiesterbrücke ($O5^*$) eines benachbarten Strangs auf, die zu einer Stabilisierung der Tetrameranordnung führen (Planarisierung der Basenebene).

Innerhalb des $d[GGGG]_4/Mg$ -Systems wird das $O4^*$ -Atom der Pentose als zusätzlicher Anknüpfungspunkt im Bereich des „backbones“ beobachtet (siehe dazu Abb. A.29 in Anhang A.6 auf S. 261).⁵

Des weiteren treten indirekte Verbrückungen über eine Kette von H_2O -Molekülen auf, die die $O3^*$ - und $O5^*$ -Atome benachbarter Stränge miteinander verknüpfen. Diese können sich sowohl innerhalb einer Ebene ausbilden, wie in der Abbildung dargestellt, als auch komplexe „dreidimensionale“ Netzwerkstrukturen ausformen, die die Strangkongformationen zusätzlich stabilisieren.

Allgemein lässt sich feststellen, dass Wassermoleküle in der Lage sind, unterschiedliche Atomgruppen der DNA miteinander zu verknüpfen. Dieser hochdynamische

⁵Es sollte beachtet werden, dass der gewählte Systemausschnitt lediglich eine Momentaufnahme darstellt. Rotationsbewegungen der Wassermoleküle führen zu häufigen Veränderungen der Verknüpfungsmuster, insbesondere der Andockpunkte im Rückgrat der DNA-Stränge.

Prozess spielt eine eminent wichtige Rolle bei der Ausbildung spezieller Quadruplexkonformationen, wie hier für das N7-H1-Wasserstoffbrückenmuster gezeigt werden konnte. Dabei lassen sich besonders die Aminogruppen sowie verschiedene Sauerstoffatome im „backbone“-Bereich als Anknüpfungspunkte für Wassermoleküle ausmachen, die in direkter als auch indirekter (Kettenbildung) Art und Weise Verbrückungen zwischen den DNA-Strängen bzw. den Tetramerebenen herstellen können.

Untersucht man Ebenen über Zeiträume, in denen dagegen das Hoogsteen-Muster dominiert⁶, so treten koordinierte Wassermoleküle im Bereich der NH_2 -Gruppen auf, ebenso werden N3-Atome vermehrt in Wechselwirkungen mit Solvensmolekülen beobachtet. Die Abb. 8.6 verdeutlicht dies am Beispiel der Ebene zwei des Systems $\text{d}[\text{GGGG}]_4/\text{Na}(300)$ nach 333 ps.

Die direkte Verbrückung zweier benachbarter DNA-Stränge durch ein einzelnes Wassermolekül tritt an dieser Stelle nicht in Erscheinung. Vielmehr lassen sich vermehrt längere Ketten von Wassermolekülen ausmachen, die relativ unspezifisch an die Basenbereiche „andocken“.

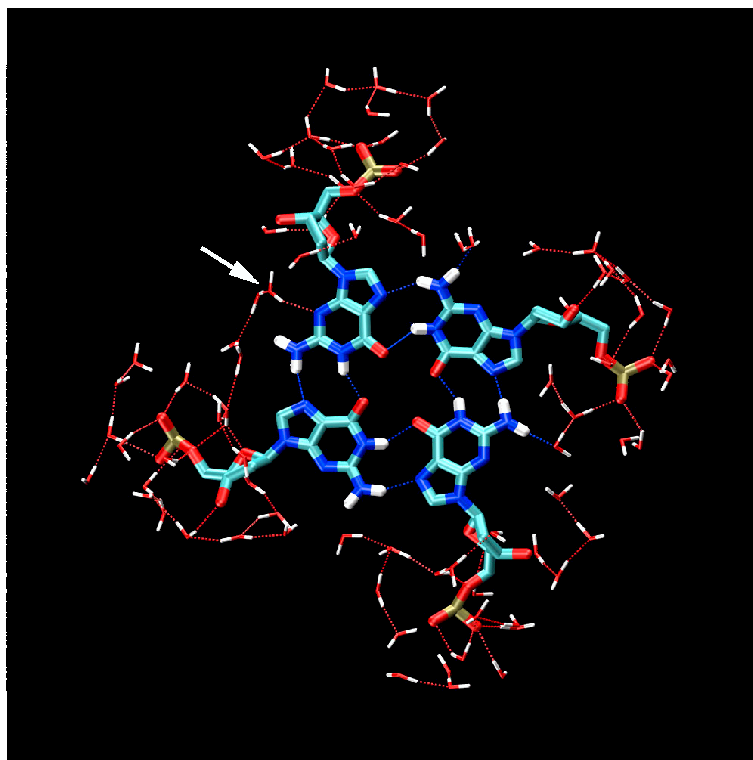


Abb. 8.6: Ebene zwei des Systems $\text{d}[\text{GGGG}]_4/\text{Na}(300)$ nach 333 ps

⁶Systeme: $\text{d}[\text{GGGG}]_4$ -Alkaliionen bzw. -gemischte Ionentypen

Durch die Betrachtung der Oberfläche⁷ eines Quadruplexes am Beispiel des $d[\text{GGGG}]_4/\text{Mg}$ -Systems (Abb. 8.7) lassen sich die polaren Atomgruppen, die sowohl an den Enden des Quadruplexes, als auch im Bereich der Furchen für Wassermoleküle zugänglich sind, sehr gut erkennen. Diese bilden potenzielle Ankerpunkte für die bereits oben angesprochenen dreidimensionalen Solvensnetzwerke.

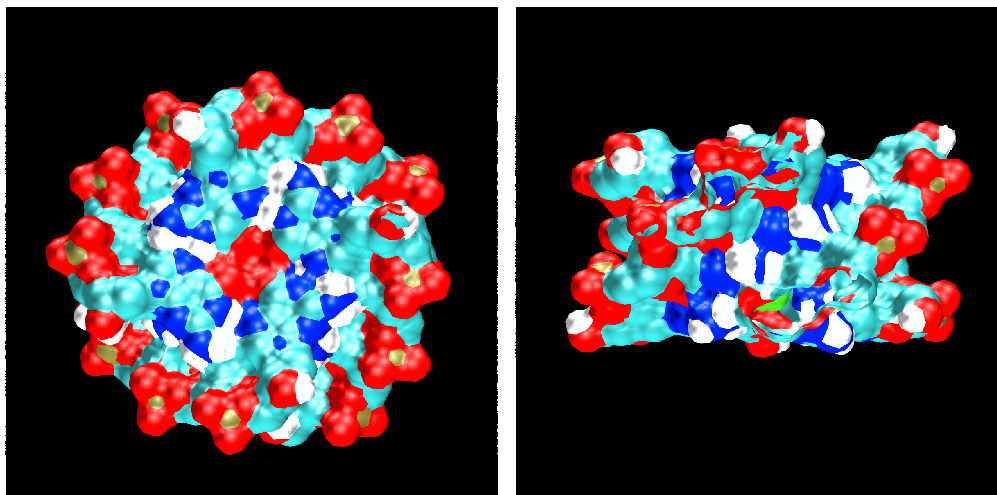


Abb. 8.7: Van-der-Waalssche Oberfläche eines $d[\text{GGGG}]_4$ -Systems (Kohlenstoff: mintgrün, Wasserstoff: weiß, Stickstoff: blau, Sauerstoff: rot, Phosphor: gold, Ionen: grün)

In den kleinen Furchen doppelhelikaler DNA, die hinsichtlich ihrer Ausmaße in der B-Form denen eines Quadruplexes entsprechen, hat man mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse [24] sowie der NMR-Spektroskopie [8] Wassermoleküle identifiziert, die strukturierte Hydratstrukturen ausbilden. Darüber hinaus konnten entsprechende Solvenskonformationen auch mit Hilfe der MD-Simulation an A- und B-DNA [42] sowie Tripelhelizes [84] vorausgesagt werden. Diese als „spine of hydration“ bezeichnete Anordnung hängt jedoch stark von den vorliegenden Basensequenzen ab [96].

Abb. 8.8 zeigt eine Momentaufnahme dieser „Hydratkette“ in den Quadruplexfurchen. Durch die Untersuchung der zeitlichen Entwicklung mit Hilfe von Filmsequenzen lässt sich beobachten, dass ihre Form sehr stark variiert. Entsprechend den Bewegungen der DNA-Stränge ändert sich die Zugänglichkeit der polaren Quadruplexpositionen für Wassermoleküle. Dies löst Konformationsänderungen in der benachbarten Solvensstruktur aus, die sich jedoch rasch auf die neuen ste-

⁷Unter Benutzung der Van-der-Waals Radien der Atome wird mit Hilfe einer Spline-Funktion, die die Überlappungsbereiche der Kugeloberflächen „glättet“, die Oberfläche simuliert.

rischen Anforderungen einzustellen vermag. So trägt dieser dynamische Prozess wesentlich zu einer Stabilisierung des Gesamtsystems bei, indem durch die bindenden Wechselwirkungen zwischen DNA-Atomen und umgebenden Wassermolekülen zusätzliche Verbrückungen zwischen den Guaninsträngen geschaffen werden. Der energetische Beitrag liegt dabei in einer Größenordnung, die dem Coulombanteil DNA/CI entspricht (vergleiche dazu Tab. 5.5 auf S. 89).

Die Existenz einer „spine of hydration“ kann in allen simulierten d[GGGG]₄-Systemen beobachtet werden, das Ausmaß wird jedoch durch die Art der interkalierten Ionen beeinflusst.

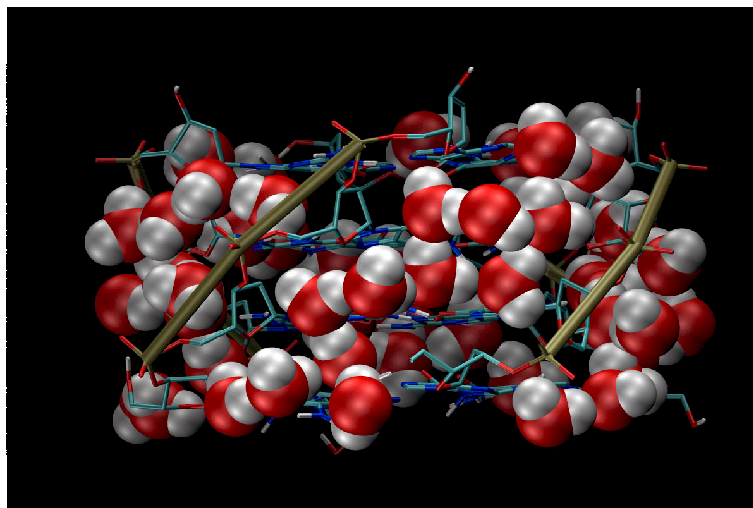


Abb. 8.8: „spine of hydration“ am Beispiel des Systems d[GGGG]₄/Sr, 5'-Ende unten

8.2 Hydratationsradien

Bei Betrachtung der „scatterplots“ im vorhergehenden Abschnitt, konnten Bereiche erhöhter Punktdichten über bestimmte Zeitintervalle beobachtet werden. Diese lassen sich zu speziellen Atomgruppen der DNA bzw. Solvensmolekülen in Beziehung setzen. Im Gegensatz zu den Wassermolekülen im „bulk“, die keine erkennbaren bevorzugten Positionen besetzen, können so bestimmte Bereiche des Quadruplexes identifiziert werden, die eine erhöhte Attraktion auf die Wassermoleküle in ihrer Nachbarschaft ausüben. Die Verweildauer dieser H₂O-Moleküle in den zugehörigen Hydrathüllen sollte daher gegenüber den „frei beweglichen“ Analogen deutlich erhöht sein.

Aussagen hinsichtlich der Ausdehnung der Hydrathülle lassen sich mit Hilfe der radialen Verteilungsfunktion $g_{xy}(r)$ treffen (siehe Gl. 3.36 auf S. 37). Sie gibt die Wahrscheinlichkeit an, ein Atom x in einem Abstand r zu einem anderen Atom y zu finden, bezogen auf eine komplette Wahrscheinlichkeitsverteilung bei gleicher Dichte. Im Hinblick auf ein Wassermolekül ergeben sich dementsprechend zwei unterschiedliche Funktionen. Zum einen kann man die Verteilung der Abstände zwischen einem bestimmten Atom und dem Sauerstoffatom des Wassers untersuchen, zum anderen den zu dem Wasserstoffatom des Lösungsmittels.

Abb. 8.9 zeigt diese Paarkorrelationsfunktionen für die Strontiumionen-Wasser-Verteilung im „bulk“.

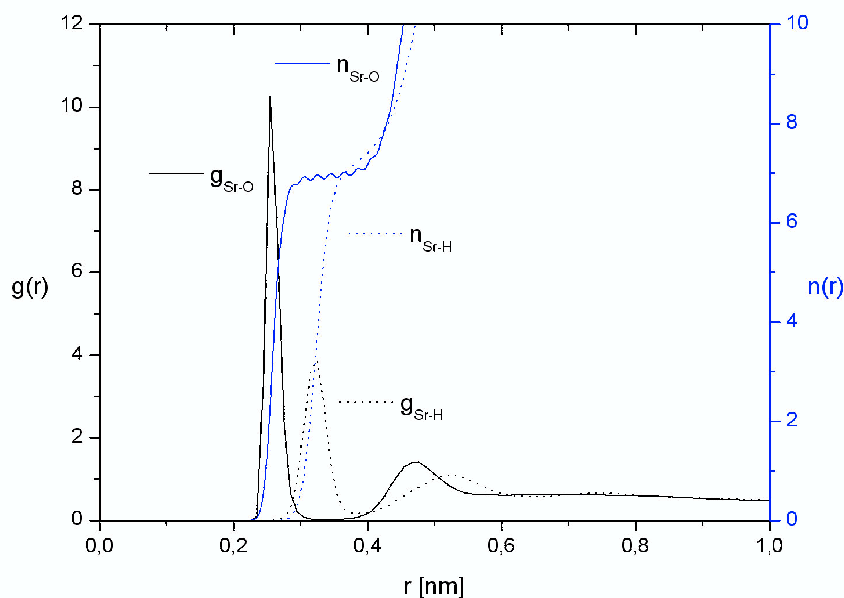


Abb. 8.9: Radiale Verteilungsfunktion für das Strontiumsystem mit den zugehörigen Integrationszahlen

Die Funktion g_{Sr-O} weist zwei Maxima auf. Dies zeigt die Ausbildung von zwei Hydratschalen an. Betrachtet man die Schärfe der Maxima, die ein Maß für die Stärke der Wasserstoffbrückenbindung darstellt, so lassen sich deutliche Unterschiede feststellen. Maximum eins ist sehr stark ausgeprägt, seine Breite ist gering. Gleichzeitig deutet der Abfall der Funktion auf nahezu Null an, dass die erste Koordinationssphäre wohl definiert ist. Das zweite Maximum zeigt eine deutlich breitere Verteilung, dementsprechend lässt sich der Hydratationsradius der zweiten Koordinationsschale nicht eindeutig festlegen.

In äquivalenter Weise beschreibt g_{Sr-H} die Verteilung eines Wasserstoffatoms relativ zu dem zentralen Strontiumion. Das Maximum ist zu größeren Werten von r hin verschoben, bedingt durch die bevorzugte Ausrichtung des Solvens-Sauerstoffatoms zu dem Ion.

Durch Integration (siehe Gl. 3.36 auf S. 38) erhält man die Anzahl der Solvensmoleküle im Abstand r zum untersuchten Teilchen. Bezogen auf das Intervall bis zum ersten Minimum r_{min1} spiegelt $n(r_{min1})$ die Koordinationszahl des untersuchten Teilchens hinsichtlich der ersten Hydratschale [51] wider. Für Sr^{2+} -Ionen ergibt sich in diesem Fall eine Zahl von ca. sieben.

Vergleicht man die Form der radialen Verteilungsfunktion („bulk-Ion“-Wasser) der drei simulierten d[GGGG]₄-Erdalkalisysteme untereinander, so stellt man eine große Ähnlichkeit zwischen dem Magnesium- und Strontiumsystem fest. Der Funktionsverlauf bzgl. der Calciumionen ist hingegen durch deutlich schwächer ausgeprägte Maxima gekennzeichnet. Eine zweite Hydratschale ist kaum noch erkennbar (siehe Abb. A.30 in Anhang A.6 auf S. 261).

Die Untersuchungen an dieser Stelle zeigen, dass das SPC/E-Modell zusammen mit den Kraftfeldparametern für eine Beschreibung der Hydratation von Ionen geeignet ist. Die Bildung unterschiedlich stark ausgeprägter erster und zweiter Hydrathüllen stimmt mit Beobachtungen an wässrigen Elektrolytlösungen überein [51]. Insbesondere liegt die o.g. Anzahl der Wassermoleküle in der ersten Hydratschale der Strontiumionen in einem für verdünnte Lösungen charakteristischen Bereich ($n_{H_2O} = 9$) [51].⁸

Wie bereits im vorhergehenden Abschnitt erwähnt wurde, bilden sich im „Nahbereich“ der DNA-Stränge komplexe Solvensnetzwerke aus (siehe dazu Abb. 8.5). Quantitativ lässt sich die Hydrathülle beschreiben, indem der Ursprung des Koordinatensystems in das geometrische Zentrum des inneren O6-O6-Käfigs verschoben und das Gesamtsystem so rotiert wird, dass die helikale Achse der neuen z-Achse entspricht. Anschließend werden die Sauerstoffatome des Wassers (stellvertretend für das jeweilige Molekül) in die xy-Ebene (durch den Ursprung) projiziert. Die Häufigkeiten, mit der Solventeilchen in Elementarzellen eines xy-Histogramms auftreten, werden gesammelt.⁹

⁸Die Hydratzahlen sollten nicht als absolut betrachtet werden, da die Umgebung, in diesem Fall der zentrale Quadruplex, die Hydratisierung der Ionen beeinflusst.

⁹Es werden Wassermoleküle berücksichtigt, die sich zwischen den durch die Phosphoratome am 3'- und 5'-Ende aufgespannten Ebenen befinden (Der Ebenenabstand beträgt ca. 10 Å). Die Kantenlänge einer Histogrammzelle beträgt 0,1 Å.

Abb. 8.10 zeigt die Verteilung dieser Projektionsdichte am Beispiel des Magnesiumsystems. Es ist deutlich erkennbar, dass die Verteilung der Wassermoleküle um die DNA-Stränge nicht gleichmäßig erfolgt. Besonders im Bereich der Furchen ergeben sich ausgeprägte Häufungspunkte. Nähert man sich dem Zentrum des Quadruplexes bzw. bewegt sich weiter von ihm weg, so reduziert sich die Punktdichte.

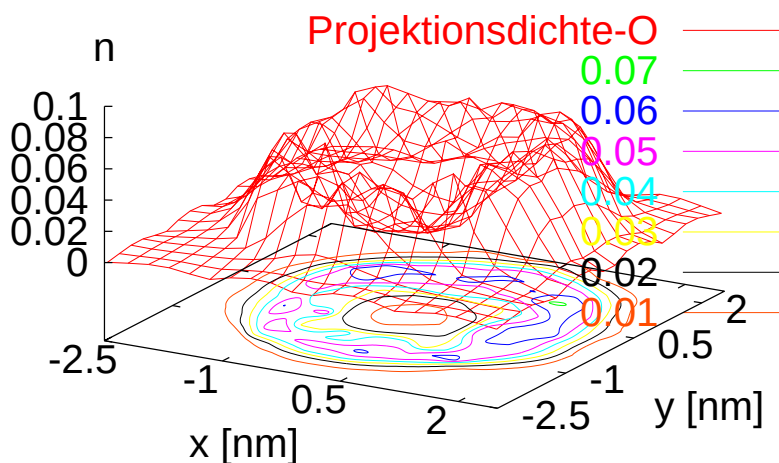


Abb. 8.10: Projektionsdichte im System $d[GGGG]_4/Mg$; n kann als zeitlicher Mittelwert der Teilchen betrachtet werden, die innerhalb des jeweiligen Histogrammelementes mit der Kantenlänge $0,1 \text{ \AA}$ auftreten.

Um konkrete Aussagen hinsichtlich des Hydratationsradius des gesamten Quadruplexes zu machen, werden anstatt der quadratischen Histogrammflächen Kreisringe um den Ursprung gelegt.¹⁰ Diese dienen dazu, die radialsymmetrische Verteilung der Wassermoleküle senkrecht zur helikalen Achse des Quadruplexes zu bestimmen.

Wie Abb. 8.11 zu entnehmen ist, bilden die Magnesium- und die Strontiumsysteme zwei Hydratschalen aus. Das analoge Calciumsystem hingegen weist eine breite Hydratationssphäre auf.

Die Ursache für die unterschiedliche Ausbildung der Hydrathüllen ist dabei in der Bevorzugung differenter H-Brückenmuster im jeweiligen System zu suchen. Wie

¹⁰In diesem Fall erfolgt die Normierung mit Hilfe der mittleren Teilchendichte, die sich durch die Projektion der Solvensmoleküle innerhalb eines Volumenelementes gleicher Schichtdicke in einen Kreisring gleicher Fläche ergeben würde. Für die Kreisringe gilt: $\Delta r = 0,01 \text{ \AA}$.

bereits in Abschnitt 5.5 diskutiert wurde, neigen die Systeme mit Magnesium- bzw. Strontiumionen zur Etablierung des geräumigeren N7-H1-Musters.

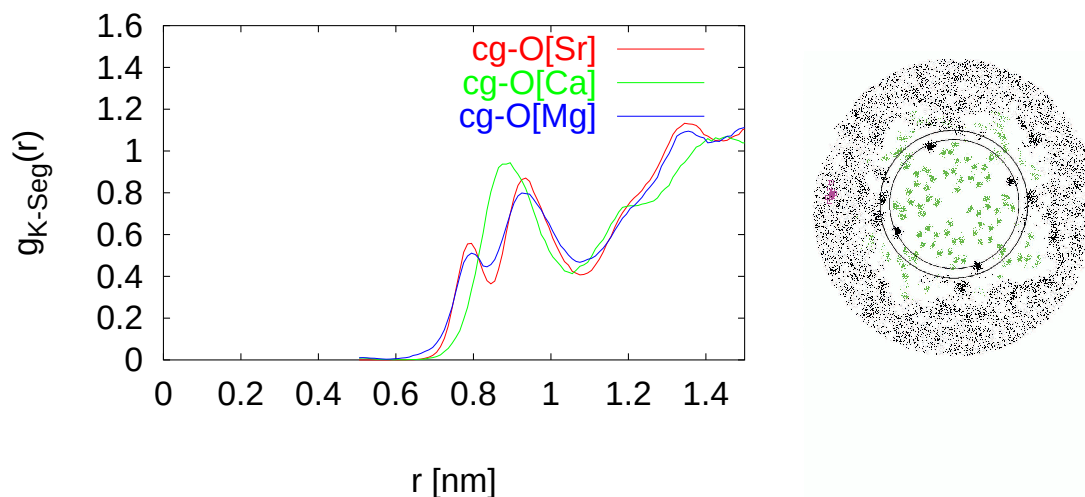


Abb. 8.11: Radialsymmetrische Verteilung der Projektionen (Wassermoleküle) in eine Ebene senkrecht zur helikalen Achse durch den Ursprung für die Systeme d[GGGG]₄-Erdalkalitionen. Die Histogrammflächen besitzen die Form von Kreisringen.

Dementsprechend lassen sich die vier Wassermoleküle in der Nähe der N2-Stickstoffatome der Guaninstränge dem ersten Maximum zuordnen (vergleiche dazu Abb. 8.4). Die weiter von der helikalen Achse des Quadruplexes entfernten Solvensmoleküle, die über mehrere intermolekulare Verbrückungen die DNA-Stränge verbinden, bilden eine zweite Hydrathülle aus. Diese ist jedoch wesentlich diffuser ausgeprägt, was sich in einer breiteren Verteilung um das zweite Maximum in Abb. 8.11 äußert.

Demgegenüber neigt das System d[GGGG]₄/Ca zu einer Bevorzugung des Hoogsteen-Musters. Dies führt zur Ausbildung einer einzelnen breiten Hydrathülle. Die Form der zugehörigen Verteilungsfunktion lässt keine besonders exponierten Wassermoleküle erkennen, was auf eine sehr dynamische Solvatisierung schließen lässt, die von stärkeren Fluktuationen im Hydratationsmuster geprägt wird.

Eine analoge Untersuchung der d[GGGG]₄-Systeme mit interkalierten Kaliumionen sowie Erdalkalitionen außerhalb der Tetramereinheiten ermöglicht eine Abschätzung des Einflusses verschiedener Ionensorten im „bulk-Bereich“ auf die Hydratation in den Furchen des Quadruplexes zu.

Dabei ergeben sich leichte Unterschiede in der Ausprägung als auch der Anzahl der Maxima für die drei gemischten Systeme. Das d[GGGG]₄/K-Ca-System zeigt

gegenüber den anderen beiden ein etwas schwächeres und breiteres erstes Maximum. Das Mischassoziat mit Strontiumionen wie auch das mit Magnesiumionen lässt die Ausbildung einer zweiten, schwach ausgebildeten Hydrathülle erkennen (siehe dazu Abb. A.31 in Anhang A.6 auf S. 262).

Wie bereits bei den reinen Erdalkalisystemen ausgeführt, bestimmen die H-Brückenmuster innerhalb der Quadruplexebenen ganz wesentlich die Form der Hydrathülle. Entsprechend der Neigung der Systeme mit nicht einheitlichen Gegenionen zur Ausbildung von „Mischformen“ bzgl. der Wasserstoffbrückenmuster lässt sich eine erste, breite Hydratsphäre beobachten. Individuelle Unterschiede der Systeme untereinander, insbesondere die verschieden stark ausgeprägten Tendenzen zur Ausbildung einer zweiten Hydratschale, lassen sich auf die jeweils vorhandene Erdalkaliionensorte im „bulk“ zurückführen. Diese „externen“ Ionen beeinflussen die Konformation des Quadruplexes in nicht zu unterschätzender Weise, wie bereits in Kapitel 7.4 ausgeführt wurde.

Die Abb. A.31 zeigt ebenfalls die Auswirkung thermischer Einflüsse auf die Gestalt der radialen Verteilungsfunktion am Beispiel zweier Natriumsysteme. Dabei führt eine Temperaturerhöhung zu einer deutlichen Reduktion der Höhe des ersten Maximums, die mit einer gleichzeitigen Verbreiterung verbunden ist. Die Steigerung der kinetischen Energie der Solvensteilchen bewirkt eine wesentlich diffusere Verteilung der Wassermoleküle um den Quadruplex, die die stabilisierende Wirkung der H_2O -Moleküle schwächt. Der „Schmelzvorgang“ des zentralen Biomoleküls wird so zusätzlich forciert.

Untersucht man die Verteilung der Wassermoleküle um spezielle Positionen in den Furchen der DNA, so stellt man fest, dass bestimmte Atompositionen im Bereich des „backbones“ sowie der Guaninbasen in sehr individueller Art und Weise solvatisiert werden (vergleiche dazu S 152).

Abb. 8.12 verdeutlicht am Beispiel des Magnesiumsystems die radiale Verteilungsfunktion für drei Strangpositionen innerhalb des Quadruplexes.¹¹

Dabei weist die Hydrathülle um das O4^* -Atom der Desoxyribose ein schwach ausgeprägtes erstes Maximum auf, an das sich ein nicht klar zu definierendes Minimum anschließt. Insgesamt lassen sich drei Hochpunkte im Kurvenverlauf identifizieren. Die erste Solvationssphäre um das N2 -Atom ist demgegenüber gekennzeichnet von einem sehr steilen Anstieg der Verteilungsfunktion, einem schmalen Bereich um den Hochpunkt sowie einem Abfall mit geringerer Steigung, was zu einer breiten Gesamtausprägung des ersten Maximums führt.

Für die Phosphoratome ist die Verteilung um den ersten Hochpunkt wesentlich symmetrischer. Das schmale erste Minimum lässt die Grenzen dieser Hydratschale

¹¹Es wurde über alle N2 -, O4^* -, und P-Atome gemittelt.

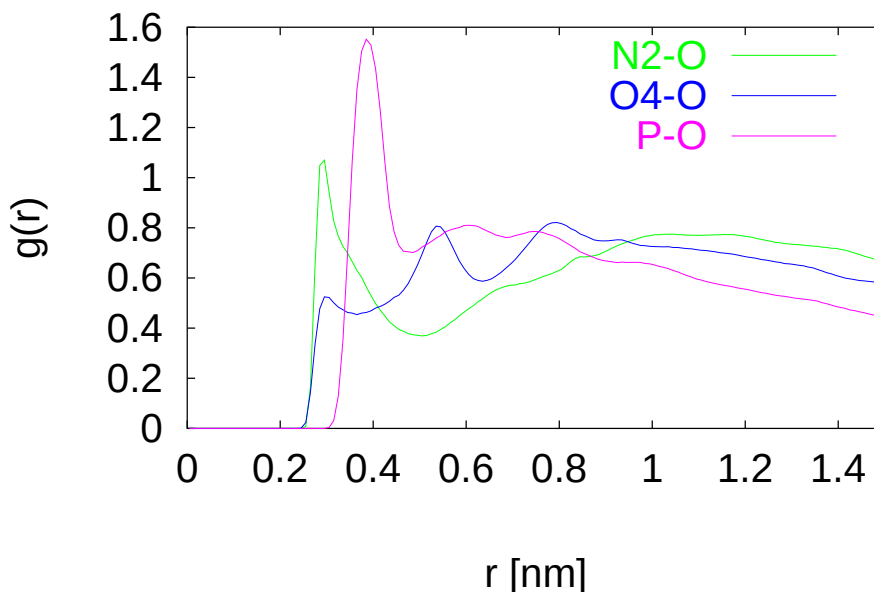


Abb. 8.12: Radiale Verteilungsfunktion um ausgewählte Atompositionen der DNA-Stränge am Beispiel des Systems d[GGGG]₄/Mg

deutlich erkennen. Weitere bevorzugte Solvenspositionen in radialer Richtung um die P-Atome besitzen dagegen nur eine sehr schwache Ausprägung.

Die Kurvenverläufe sind charakteristisch für die jeweilige Atomsorte der DNA und können auf die anderen simulierten d[GGGG]₄-Systeme mit Alkali- sowie Erdalkalitionen übertragen werden. Die Höhen und Tiefen der Maxima und Minima sowie deren konkrete Lage werden jedoch durch die individuellen Systemeigenschaften terminiert. Die Art der anwesenden Ionen (interkaliert sowie im „bulk“) übt dabei einen geringen, jedoch signifikanten Einfluss auf die Solvensstruktur um spezielle DNA-Bereiche aus.

Tab. 8.1 gibt einen Überblick über die Hydratationsradien, die sich aus dem ersten Minimum der Sauerstoff-Verteilungsfunktionen ergeben, für die Erdalkalisysteme sowie die Tetraplexe mit gemischten Ionensorten. Zu diesen so ermittelten Radien wird ein Korrekturterm ($\Delta r_{RT} = 0,5 \text{ \AA}$) addiert, der thermische Fluktuationen berücksichtigt [17].

$$r_{Hyd} = r_{min1} + \Delta r_{RT} \quad (8.1)$$

Zusätzlich ist jeweils die mittlere Anzahl der Wassermoleküle in der so festgelegten Hydratsphäre angegeben.¹²

¹²Die sich durch Integration der radialen Verteilungsfunktion ergebenden laufenden Integrationszahlen stimmen dabei sehr gut mit den direkt aus den Trajektorien bestimmten zeitlichen Mittelwerten der Anzahl an H₂O-Molekülen im vorgegebenen Volumenbereich überein.

d[GGGG] ₄	Mg		Ca		Sr	
Bereich	r_{Hyd} [nm]	n_{H_2O}	r_{Hyd} [nm]	n_{H_2O}	r_{Hyd} [nm]	n_{H_2O}
Ion 3'-Ende	0,35	1	0,37	0,29	0,35	1
Ion 5'-Ende	0,33	2,19	0,41	0,96	0,36	1
Ionen im „bulk“	0,36	7,04	0,39	6,73	0,36	6,96
N2	0,55	10,23	0,55	9,17	0,55	9,95
O4*	0,42	3,64	0,40	3,02	0,42	3,02
P	0,54	15,58	0,52	13,23	0,54	15,89
	h_{Zyl}/r_{Zyl} [nm]	n_{H_2O}	h_{Zyl}/r_{Zyl} [nm]	n_{H_2O}	h_{Zyl}/r_{Zyl} [nm]	n_{H_2O}
Furchen _{in}	1,0/0,875	12,53			1,0/0,900	13,55
Furchen _{ges}	1,0/1,125	44,77	1,0/1,100	40,60	1,0/1,138	43,47

d[GGGG] ₄	K-Mg		K-Ca		K-Sr	
Bereich	r_{Hyd} [nm]	n_{H_2O}	r_{Hyd} [nm]	n_{H_2O}	r_{Hyd} [nm]	n_{H_2O}
Ion 3'-Ende	0,39	0,51	0,39	0,26	0,39	0,13
Ion 5'-Ende	0,41	0,29	0,41	0,50	0,38	0,62
Ionen im „bulk“	0,39	7,06	0,38	6,25	0,27	5,30
N2	0,57	10,55	0,57	10,03	0,57	10,50
O4*	0,40	3,07	0,38	2,33	0,40	3,07
P	0,52	13,70	0,52	13,22	0,52	13,64
	h_{Zyl}/r_{Zyl} [nm]	n_{H_2O}	h_{Zyl}/r_{Zyl} [nm]	n_{H_2O}	h_{Zyl}/r_{Zyl} [nm]	n_{H_2O}
Furchen _{ges}	0,97/1,09	40,65	0,934/1,09	33,59	0,884/1,11	40,21

Tabelle 8.1: Hydratationsradien der Erdalkalisysteme sowie der gemischten Systeme inkl. der Anzahl eingelagerter Wassermoleküle

Die Furchen werden mit Hilfe eines Zylindermodells definiert. Dabei entspricht die Höhe h_{Zyl} der Summe der Ebenenabstände. Der Zylinderradius r_{Zyl} basiert auf den Werten, die sich aus der entsprechenden radialsymmetrischen Verteilung der Projektionen ergeben (siehe Abb. 8.11).

Tab. 8.2 zeigt analog zu Tab. 8.1 die Hydratationsradien und Koordinationszahlen für zwei ausgewählte Natriumsysteme (unterschiedliche Temperaturen).

d[GGGG] ₄	Na(300)		Na(360)	
Bereich	r_{Hyd} [nm]	n_{H_2O}	r_{Hyd} [nm]	n_{H_2O}
Ion 3'-Ende	0,50	1,45	0,50	0,80
Ion 5'-Ende	0,50	1,55	0,50	1,3
Ionen im „bulk“	0,37	5,73	0,37	5,70
N2	0,55	9,08	0,55	9,66
O4*	0,68	25,91	0,68	25,04
P	0,52	13,89	0,52	12,84
	h_{Zyl}/r_{Zyl}	n_{H_2O}	h_{Zyl}/r_{Zyl}	n_{H_2O}
	[nm]		[nm]	
Furchen _{ges}	1,00/1,11	39,65	1,00/1,11	48,64

Tabelle 8.2: Hydratationsradien der Systeme Na(300) und Na(360) inkl. der Anzahl eingelagerter Wassermoleküle

Bei einer Betrachtung der zeitlichen Entwicklung der Anzahl an Solvensmolekülen in den jeweiligen Hydratschalen ergeben sich jedoch besonders für den Bereich der Furchen ausgeprägte Schwankungen.

Abb. 8.13 verdeutlicht dies am Beispiel des Systems d[GGGG]₄/Mg. Korreliert man den Verlauf mit dem der rms-Werte (vergleiche dazu Abb. 5.1 auf S. 55), so lassen sich deutliche Parallelen feststellen (Steigerung der Anzahl an Wassermolekülen ↔ Erhöhung des rms-Wertes). Wahrscheinlich bedingt dabei die stärkere „Verzerrung“ des Quadruplexes eine „offenere“ Struktur, was zur vermehrten Einlagerung von H₂O-Molekülen in den Furchenbereich führt.

Abb. 8.14 stellt die Größenverhältnisse der Solvenshüllen, auf Basis der durch die radiale Verteilungsfunktion bestimmten Ausdehnung der ersten Hydratschale, im

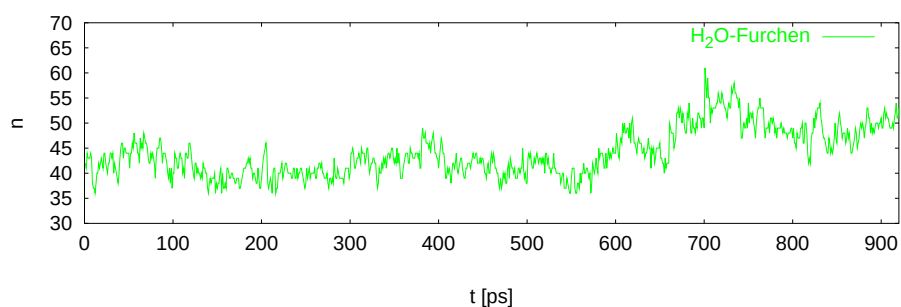


Abb. 8.13: Zeitliche Entwicklung der Anzahl an Wassermolekülen in den Furchen des Systems $d[GGGG]_4/Mg$

Verhältnis zu den Dimensionen des Quadruplexes dar. Die verwendeten Hydrationsradien lassen dabei Überlappungen der Solvathüllen individueller DNA-Atome erkennen. Zum Vergleich sind die Van-der-Waalsschen Radien einzelner polarer Atome (bzw. interkalierter Ionen) ebenfalls eingezeichnet.

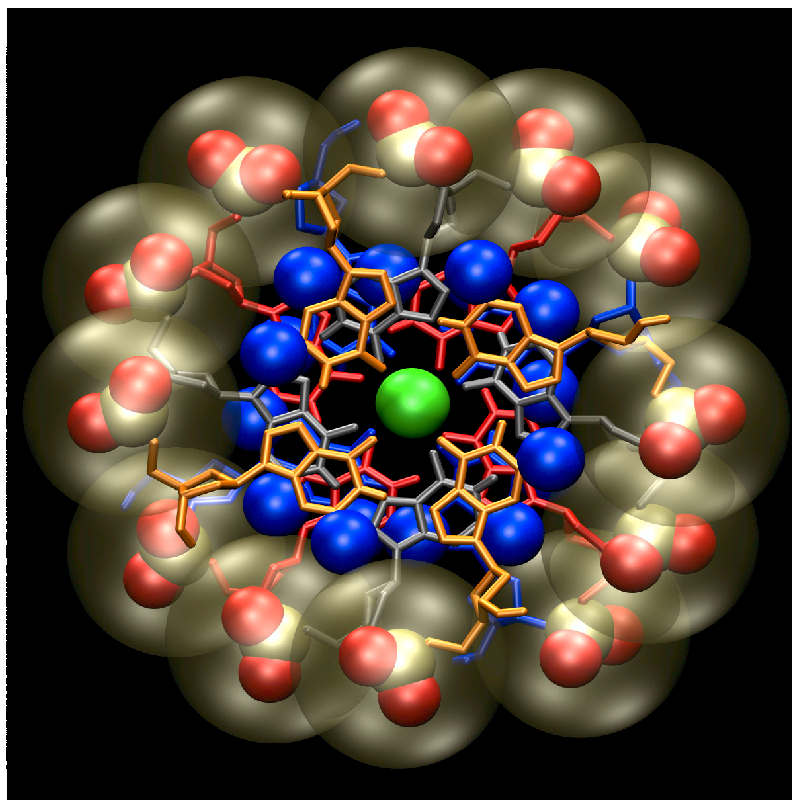


Abb. 8.14: Größenverhältnisse der für die Berechnung der Residenzzeitverteilungen verwendeten Hydrationsradien gegenüber den Van-der-Waalsschen Radien; Phosphor: $r_{Hyd} = 5,4 \text{ \AA}$ (Mg^{2+} -Ionen sowie N2-Atome zum Vergleich)

8.3 Residenzzeiten

Die Hydratationsradien bilden die Grundlage für die Bestimmung der Residenzzeitverteilungen¹³ von Solvensmolekülen, die einen Einblick in die Dynamik der Hydratationsvorgänge erlaubt. Um sie zu berechnen, wird für jedes Wassermolekül die Position hinsichtlich des zu untersuchenden Volumenelementes zu allen Zeitpunkten t bestimmt. Diese Information wird auf eine Größe $\eta_i(t)$ übertragen, die den Wert 1 erhält, wenn sich das Sauerstoffatom des Solvensmoleküls i in der betreffenden Hydrathülle aufhält (ansonsten gilt: $\eta_i(t) = 0$). Die Verteilungsfunktion ergibt sich als Korrelationsfunktion der Größe $\eta_i(t)$ (siehe Gl. 8.2).

Sie stellt die Anzahl der Wassermoleküle $n(t_k)$ dar, die sich sowohl zu dem Zeitpunkt t_a als auch zu dem Zeitpunkt $t_a + t_k$ in der Hydratsphäre aufhalten [57]. Das Produkt $k \cdot \Delta\tau$ steuert dabei die Größe des Korrelationsbereiches, der mit einer „Schrittlänge“ ($\Delta\tau$) von 5 ps untersucht wird.

$$n(t_k) = \frac{1}{N_{tmax} - k} \sum_{a=1}^{N_{tmax}-k} \sum_{i=1}^{N_{H_2O}} \eta_i(t_a) \cdot \eta_i(t_a + t_k) \quad (8.2)$$

$$\text{mit } k = 0, 1, \dots, (N_{tmax} - 1)$$

$$t_k = k \cdot \Delta\tau$$

Die Bestimmung der Größe $n(t_k)$ ist äußerst zeitaufwendig, da für jeden einzelnen Wert eine Doppelsumme berechnet werden muss.¹⁴ Durch die Verwendung eines Normierungsfaktors $\frac{1}{N_{tmax}-k}$ lässt sich $n(t_k)$ als Teilchenzahl interpretieren, wobei $n(0)$ als zeitlicher Mittelwert der Anzahl an koordinierten Wassermolekülen betrachtet werden kann.

Unter der Annahme, dass die Austauschgeschwindigkeit proportional zur Teilchenzahl in der untersuchten Hydrathülle ist (Reaktion 1. Ordnung), ergibt sich für die Residenzzeitverteilung ein exponentieller Abfall.

$$n(t_k) = n(0) \cdot e^{(-t_k/\tau_r)} \quad (8.3)$$

Durch Umformung von Gl. 8.3 erhält man die Wahrscheinlichkeit $p(t_k)$ dafür, dass sich ein Solvensmolekül nach der Zeit t_k in der Hydrathülle aufhält, wenn es sich zum Zeitpunkt $t_0 = 0$ bereits dort befunden hat.

$$p(t_k) = \frac{n(t_k)}{n(0)} \quad (8.4)$$

¹³Sie kann als Maß für die Stabilität der Hydrathülle angesehen werden, wobei der Diffusionskoeffizient der Wassermoleküle in radialer Richtung und die Ausdehnung der betrachteten Hydratationssphäre die Form maßgeblich mitbestimmen.

¹⁴Die erste Summe, deren obere Grenze selbst zeitabhängig ist, verläuft über die Zeit, die zweite jeweils über alle Solvensmoleküle N_{H_2O}

Die Residenzzeit τ_r kann dann durch die Anpassung an eine entsprechende Exponentialfunktion bestimmt werden.¹⁵

Abb. 8.15 zeigt die Residenzzeitverteilungen für ausgewählte Wassertypen des Systems d[GGGG]₄/Mg (zusätzlich ist die Verteilung um die „bulk-Ionen“ im System Na(300) eingezeichnet). Dabei handelt es sich um Wassermoleküle, die sich im Furchenbereich der DNA aufhalten sowie um Solvensmoleküle, die sich in Bereichen nicht interkalierter Ionen befinden.

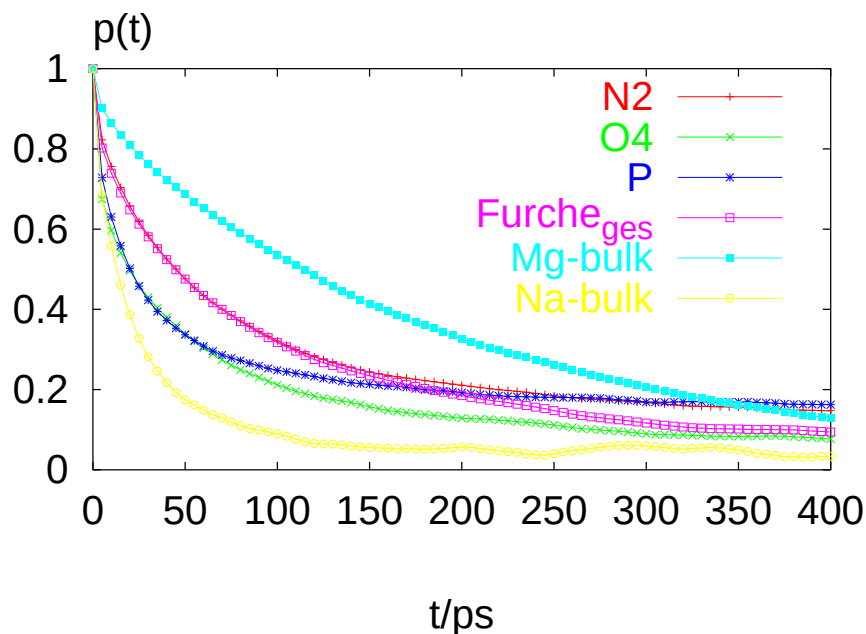


Abb. 8.15: Residenzzeitverteilungen für verschiedene Wassertypen des Systems d[GGGG]₄/Mg; zum Vergleich ist die Verteilung um die „bulk-Ionen“ im System Na(300) ebenfalls eingezeichnet

Alle Kurvenverläufe weisen einen exponentiellen Abfall auf, der jedoch unterschiedlich stark ausgeprägt ist, entsprechend den damit verbundenen differenten Verweildauern. Insbesondere zeigen sich deutliche Unterschiede in den Kurvenverläufen der ein- und zweiwertigen Ionensysteme.

Die erhöhte Ladungsdichte der Mg²⁺-Ionen führt zu längeren Verweilzeiten von Solvensmolekülen in der ersten Hydratschale im Vergleich zu Na⁺. Ebenso lassen sich differente Residenzzeiten der Wassermoleküle in Bezug auf spezielle Furchenpositionen feststellen. Besonders die Hydrathülle um die N2-Atome ist gekennzeichnet durch eine große Residenzzeit, Solvensmoleküle um die P- bzw. O4*-Atome weisen demgegenüber kürzere Aufenthaltszeiten auf.

¹⁵Die Anpassung erfolgte mit Hilfe des Programms Origin 6.0 der Fa. Microcal Software.

Im Bereich der Furchen und um die Magnesiumionen herum fällt die Verteilungsfunktion nicht auf Null ab, ein Effekt, der sich über den gesamten Simulationszeitraum hinweg beobachten lässt. Aufgrund der extrem langen Residenzzeit der Wassermoleküle an bestimmten Systempositionen, sollten die diskreten Werte nicht als absolut betrachtet werden. Die Simulationszeit ist insbesondere für lange Verweilzeiten nicht ausreichend, um durch eine Anpassung eine hinreichende Genauigkeit zu erzielen. Grundlegende Tendenzen hinsichtlich der Besetzung exponierter Volumenelemente lassen sich jedoch ausmachen.

Die Tab. 8.3 - 8.5 geben einen Überblick über die Residenzzeiten der verschiedenen $d[\text{GGGG}]_4$ -Systeme.

Betrachtet man die einzelnen Erdalkalisysteme (siehe Tab. 8.3), so fällt erneut die große Ähnlichkeit im Verhalten derer mit Magnesium- bzw. Strontiumionen auf. Das Calciumsystem weist auch hier eine Sonderstellung auf.

$d[\text{GGGG}]_4$	Mg	Ca	Sr
Bereich	τ_r [ps]	τ_r [ps]	τ_r [ps]
Ion 3'-Ende	$\approx t_{Sim}^{16}$	$43,86 \pm 3,04$	$\approx t_{Sim}$
Ion 5'-Ende	$425,94 \pm 5,48$	$114,19 \pm 3,03$	$\approx t_{Sim}$
Ionen im „bulk“	$182,78 \pm 1,75$	$20,63 \pm 1,19$	$132,67 \pm 2,55$
N2	$118,44 \pm 5,71$	$74,85 \pm 4,73$	$124,60 \pm 6,01$
O4*	$57,08 \pm 2,75$	$33,31 \pm 1,72$	$60,86 \pm 3,00$
P	$79,15 \pm 6,11$	$48,13 \pm 4,27$	$78,32 \pm 6,09$
Furchen _{in}	$142,09 \pm 3,73$	-	$181,19 \pm 5,77$
Furchen _{ges}	$99,52 \pm 3,10$	$68,92 \pm 1,74$	$102,09 \pm 3,61$

Tabelle 8.3: Residenzzeiten der Erdalkalisysteme mit den zugehörigen Fehlern der Anpassung

Hohe Residenzzeiten werden besonders für die Bereiche am 3'- und 5'-Ende beobachtet. Ebenso sind die Verweildauern der Solvensmoleküle im Bereich der Furchen sehr ausgedehnt, wobei sich im Gegensatz zu allen anderen Systemen in

¹⁶Aufgrund der langen Verweildauer reicht die Simulationszeit t_{Sim} nicht aus, um eine verlässliche Anpassung vornehmen zu können.

Anwesenheit von interkalierten Magnesium- bzw. Strontiumionen zwei „Sorten von Wassermolekülen“ im Bereich der Furchen beobachten lassen, wie bereits im Vorfeld diskutiert wurde. Die innere der beiden Solvatsphären bindet dabei offensichtlich angelagerte Wassermoleküle besonders effizient.

Detailuntersuchungen spezieller Bereiche der Furchen zeigen an, dass die Art der eingelagerten Ionen Auswirkungen auf die in den Furchen eingelagerten H_2O -Moleküle besitzt.¹⁷

Betrachtet man die $\text{d}[\text{GGGG}]_4$ -Systeme mit gemischten Ionentypen (siehe Tab. 8.4), so weisen besonders die Bereiche der Strangenden ein uneinheitliches Verhalten auf. Die Verweilzeiten sind deutlich reduziert im Vergleich zu den entsprechenden reinen Quadruplexassoziaten mit zweiwertigen Ionen.

Hinsichtlich der Aufenthaltszeiten der Solvensmoleküle im Bereich der Furchen lässt sich feststellen, dass diese maßgeblich durch die Sorte der eingelagerten Ionen bestimmt werden, die ihrerseits die Ausbildung bestimmter Wasserstoffbrückenmuster innerhalb der Quadruplexebenen favorisieren. Die Ionen im „bulk“ beeinflussen dabei die Residenzzeitverhalten lediglich in untergeordneter Art und Weise.

$\text{d}[\text{GGGG}]_4$	K-Mg	K-Ca	K-Sr
Bereich	τ_r [ps]	τ_r [ps]	τ_r [ps]
Ion 3'-Ende	$84,16 \pm 1,00$	$5,58 \pm 0,11$	$2,64 \pm 0,09$
Ion 5'-Ende	$5,25 \pm 0,10$	$21,7 \pm 0,47$	$55,25 \pm 1,94$
Ionen im „bulk“	$174,33 \pm 2,44$	$18,74 \pm 0,61$	$\approx t_{Sim}$
N2	$98,28 \pm 4,23$	$96,12 \pm 4,89$	$98,31 \pm 4,63$
O4*	$39,44 \pm 1,80$	$40,05 \pm 2,66$	$41,96 \pm 2,86$
P	$56,94 \pm 4,64$	$61,86 \pm 4,74$	$80,48 \pm 6,69$
Furchen _{ges}	$81,93 \pm 2,12$	$95,40 \pm 3,76$	$98,51 \pm 3,53$

Tabelle 8.4: Residenzzeiten der $\text{d}[\text{GGGG}]_4$ -Systeme mit gemischten Ionentypen inkl. der zugehörigen Fehler der Anpassung

¹⁷Die Residenzzeit der Solvensteilchen um ein Wassermolekül herum liegt in der Größenordnung von 7,8 ps [113].

Die Untersuchung der Natriumsysteme zeigt das erwartete Verhalten hinsichtlich Temperaturerhöhungen (siehe Tab. 8.5).

Die gesteigerte kinetische Energie führt dabei zu deutlich reduzierten Verweilzeiten der Wassermoleküle an den betrachteten Systempositionen, was den „Schmelzvorgang“ der Quadruplexstruktur unterstützt. Lediglich die Bereiche der Quadruplexenden weisen keine nennenswerten Unterschiede auf. Auch sie sind im Vergleich zu den Erdalkalisystemen durch reduzierte Verweilzeiten der Solvensmoleküle gekennzeichnet.

d[GGGG] ₄	Na(300)	Na(360)
Bereich	τ_r [ps]	τ_r [ps]
Ion 3'-Ende	16,33 $\pm$ 0,71	11,62 $\pm$ 0,52
Ion 5'-Ende	11,24 $\pm$ 0,33	11,16 $\pm$ 0,45
Ionen im „bulk“	25,48 $\pm$ 1,13	9,79 $\pm$ 0,64
N2	106,97 $\pm$ 3,74	34,19 $\pm$ 2,44
O4*	183,45 $\pm$ 7,64	110,14 $\pm$ 8,70
P	62,42 $\pm$ 4,83	20,24 $\pm$ 2,68
Furchen _{ges}	100,00 $\pm$ 2,55	27,28 $\pm$ 1,22

Tabelle 8.5: Residenzzeiten der Systeme d[GGGG]₄/Na(300) und Na(360) inkl. der zugehörigen Fehler der Anpassung

Wie in diesem Kapitel gezeigt werden konnte, leisten Wassermoleküle einen wichtigen Beitrag zur Stabilisierung von Quadruplexstrukturen. Die Ausbildung komplexer, verbrückender Wassernetzwerke bildet dafür die Grundlage.

So konnten in allen untersuchten d[GGGG]₄-Systemen H₂O-Moleküle beobachtet werden, die an den Enden des Quadruplexkanals die interkalierten terminalen Ionen zusätzlich koordinieren. In Abhängigkeit vom jeweiligen Ionentyp ergaben sich jedoch deutliche Unterschiede sowohl hinsichtlich der räumlichen Ausdehnung des bevorzugten Aufenthaltsbereiches als auch bzgl. der Verweildauer an diesen exponierten Positionen.

An den Kanalenden können die Erdalkali- im Vergleich zu den Alkaliionen Solvensmoleküle besonders effektiv anlagern. Die erhöhte Ladung der zweiwertigen

gegenüber den einwertigen Ionen führte dabei zu einer deutlichen Reduzierung der Ortsfluktuationen der Wassermoleküle an den 3'- und 5'-Enden. Gleichzeitig erhöhte sich die Residenzzeit dieser Solvensmoleküle erheblich.

Innerhalb der jeweiligen Systemreihe konnten ebenfalls individuelle Unterschiede beobachtet werden, die jedoch weniger stark ausgeprägt waren. Beispielsweise resultierten durch Magnesium- und Strontiumionen innerhalb der Erdalkalireihe höhere Verweildauern der H_2O -Moleküle an den Quadruplexenden als durch die entsprechenden Calciumionen.¹⁸

Aus den einzelnen Simulationen geht hervor, dass in Abhängigkeit vom jeweiligen Wasserstoffbrückenmuster innerhalb der Ebenen die horizontale Stabilisierung der Tetramereinheit durch Solvensmoleküle in unterschiedlicher Weise erfolgt.

So konnten allgemein im Fall eines N7-H1-Musters (Erdalkalisysteme) vier H_2O -Moleküle beobachtet werden, die zumeist eine Verbrückung zwischen den NH_2 -Gruppen der Guaninbasen und dem „backbone“-Bereich eines benachbarten DNA-Stranges herstellten und somit maßgeblich zur Ausbildung einer planaren (stabilen) Anordnung der Purinbasen innerhalb einer Quadruplexebene beitrugen. Die beobachtete lange Verweildauer dieser Solvensmoleküle in räumlich eng begrenzten Bereichen macht sie sowohl zu Anknüpfungspunkten für längere Wasserketten, die die Guaninebenen horizontal umspannen, als auch für Solvensketten in helikaler Richtung entlang der Furchen.

Im Falle eines H-Brückenmusters vom Hoogsteen-Typ (bevorzugt bei Alkalisystemen zu finden) konnten keine direkt verbrückenden Wassermoleküle angetroffen werden. Vielmehr beobachtete man verstärkt ausgedehnte Ketten von Solvensmolekülen, die unspezifisch an unterschiedliche Bereiche der Basen „andockten“.

Innerhalb der Furchen aller untersuchten Quadruplexe konnte eine ausgeprägte Hydratisierung beobachtet werden. Diese als „spine of hydration“ bezeichnete Anordnung von Solvensmolekülen trägt maßgeblich zur vertikalen Stabilisierung der helikalen Struktur von Quadruplexen bei, indem sie die einzelnen DNA-Stränge miteinander verbrückt. Sie ist gekennzeichnet durch eine erhöhte Verweildauer der sie ausbildenden Wassermoleküle in den Furchenbereichen. Ihre Form passt sich dabei dynamisch den veränderlichen lokalen Strukturen der DNA an.

¹⁸Die absoluten Werte der Hydrationsradien, der Besetzungszahlen in bestimmten Hydratsphären sowie der zugehörigen Residenzzeiten sollten jedoch kritisch interpretiert werden, da sie in entscheidendem Maße von den zugrunde liegenden Kraftfeldparametern der Atomgruppen bzw. Ionen bestimmt werden.

Molekülbereiche der DNA, die zur Ausbildung von H-Brücken befähigt sind, stellten exponierte Positionen dar, an denen Wassermoleküle in deutlich verstärktem Umfang anzutreffen waren. Insbesondere die Bereiche um die N2-, O4*- sowie P-Atome wurden detailliert untersucht.

Dabei zeigten sich ausgeprägte Unterschiede hinsichtlich der Residenzzeiten von Solvensmolekülen in der jeweiligen Hydrathülle:

$$\text{N2} > \text{P} > \text{O4}^*$$

Die Abhängigkeit der Verweildauer in diesen Bereichen von der Art der interkalierten Kationen ist wesentlich schwächer ausgeprägt als bei den an den Quadruplexenden assoziierten H₂O-Molekülen. So ergaben sich zwar erhöhte Werte für τ_r im Falle der d[GGGG]₄-Systeme mit Magnesium- bzw. Strontiumionen. Eine Verallgemeinerung hinsichtlich längerer Residenzzeiten (in den Furchen) der Erdalkali- gegenüber den Alkalisystemen lässt sich dadurch jedoch nicht treffen.

Eine signifikante Beeinflussung der Hydratisierung der DNA durch „bulk“-Ionen konnte für Systeme mit einheitlicher Ionensorte innerhalb der Simulationsbox nicht beobachtet werden. Bei den Quadruplexsystemen mit gemischten Ionentypen traten jedoch bei einer Annäherung der zweiwertigen Kationen insbesondere Wechselwirkungen mit den Phosphatgruppen auf, die die lokale Struktur des „backbones“ veränderten und so die Hydratisierung durch eine modifizierte Furchengeometrie beeinflussten. Dies konnte an Filmsequenzen studiert werden, die speziell den Bereich der DNA hervorhoben, dem sich Ionen annäherten.

Kapitel 9

Erweiterte Basensequenzen - die Systeme $d[\text{TGGGGT}]_4/\text{K}$ und $d[\text{TTGGGGTT}]_4/\text{K}$ -

Durch die Verlängerung der DNA-Sequenzen der $d[\text{GGGG}]_4$ -Modellquadruplexe um zusätzliche endständige Thyminbasen wird gezielt der Übergang hin zu Systemen mit biologischer Relevanz vollzogen.

Man gelangt so zu Tetraplexen des Typs $d[\text{TGGGGT}]_4$, die als Wiederholungseinheit telomerer DNA der Einzellerart *Tetrahymena* in der Natur vorkommen bzw. zu $d[\text{TTGGGGTT}]_4$, die Bestandteile der Einzeller *Oxytricha* und *Stylonychia* darstellen. Erste Einblicke in das Verhalten dieser speziellen DNA-Fragmente konnten dabei durch experimentelle Untersuchungen mit Hilfe der Photonen Korrelationsspektroskopie [128], der CD- und UV-Spektroskopie [103] sowie der Streulichtspektroskopie [15] gewonnen werden.

Das Ziel der vorliegenden Studie ist es, das beobachtete Verhalten der $d[\text{GGGG}]_4$ -Modellquadruplexe hinsichtlich seiner Übertragbarkeit auf „reale“ Systeme zu untersuchen. Dabei besteht insbesondere die Möglichkeit, durch eine MD-Simulation die Dynamik und Struktur dieser biofunktionalen Sequenzen in ihrer physiologischen Umgebung zu studieren und mit den o.g. experimentellen Ergebnissen zu vergleichen. Durch die sukzessive Verlängerung der Strangsequenzen durch Thyminbasen lassen sich die Auswirkungen der ausgedehnten Endstrukturen auf die Stabilität sowie die Ionenwanderung entlang der helikalen Achse des zentralen Guanin-Quadruplexes untersuchen.

Gleichzeitig wird jeweils ein Vergleichssystem unter Verwendung eines harmonischen Potenzials simuliert, das die Ausbildung eines bestimmten Wasserstoffbrückenmusters (Hoogsteen-Typ) forciert, um mögliche Korrelationen zwischen den Bewegungen

der interkalierten Ionen und der Anordnung der Basen in der Tetramerebene aufzuzeigen. Dazu werden die Abstände zwischen den Atomen O6-H1 sowie N7-H2 durch die Addition eines harmonischen Terms im Kraftfeld verstärkt (siehe S. 51), um das o.g. H-Brückenmuster während der Simulationsphase aufrecht zu erhalten. Dieser als „restraining“ bezeichnete Vorgang stellt ein in der Literatur [72] anerkanntes Verfahren dar, das dazu dient, systematisch Abhängigkeiten besonders in komplexen „Vielteilchensystemen“ zu erkennen (vergleiche dazu Gl. 3.32).

Die Systeme d[TTGGGGTT]₄/K (mit und ohne „restraints“) werden zudem über 2240 ps bzw. 3260 ps simuliert, um das „Langzeitverhalten“ dieser Spezies zu studieren (vergleiche dazu Tab. 4.6 und 4.7 auf S. 51).

9.1 Stabilitäten, Ionenfluktuationen und Strukturen

Auch Thyminbasen können tetramere Anordnungen einnehmen. Im Gegensatz zu den entsprechenden Guanineinheiten mit acht möglichen Wasserstoffbrücken (vergleiche dazu das Hoogsteen-Muster auf S. 79), sind Thymin-Quartetts jedoch lediglich zur Ausbildung von maximal vier H-Brücken befähigt (siehe Abb. 9.1).

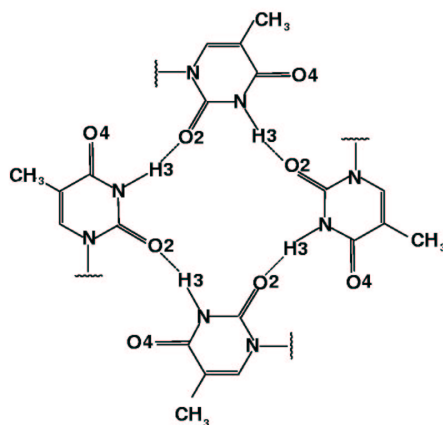


Abb. 9.1: Wasserstoffbrücken im Thymin-Quartett

Dementsprechend lässt sich ein zu den bisher untersuchten d[GGGG]₄-Systemen verändertes Verhalten der Tetraplexe erwarten, die durch Thyminbasen an den Strangenden verlängert wurden. Inwieweit sich dies auf die Gesamtstabilität des Quadruplexes, seine Struktur sowie die Bewegungen der interkalierten Kationen auswirkt, wird im Folgenden eingehend untersucht.

9.1.1 rms-Werte

Eine detaillierte Betrachtung der Stabilitäten der Systeme $d[\text{TGGGGT}]_4/\text{K}$ und $d[\text{TTGGGGTT}]_4/\text{K}$ ohne „restraints“ erfolgt anhand der rms-Werte im Verlauf der Simulationen (siehe Abb. 9.2 und 9.3). Dabei bietet sich aufgrund der unterschiedlichen Basensorten innerhalb der Stränge eine differenzierte Untersuchung der einzelnen Tetraplexkomponenten an. Es werden sowohl die zwei zentralen Guanin-Tetramereinheiten, der gesamte Guanin-Quadruplex, als auch die endständigen Thyminreste unabhängig voneinander betrachtet und mit dem Fluktuationsverhalten der gesamten DNA-Struktur in Beziehung gesetzt.

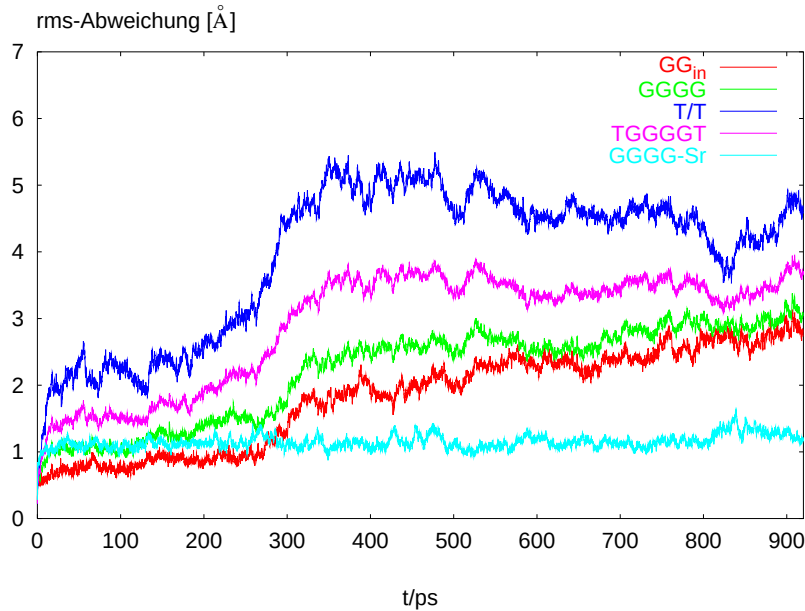


Abb. 9.2: rms-Abweichungen für das System $d[\text{TGGGGT}]_4/\text{K}$ (inkl. $d[\text{GGGG}]_4/\text{Sr}$ zum Vergleich)

Beide Systeme weisen im Hinblick auf die gesamte DNA-Struktur eine Erhöhung der rms-Abweichungen gegenüber den Modellsystemen auf (vergleiche dazu Abb. 5.2). Zieht man jedoch die rms-Werte der T- und G-Untereinheiten in Betracht, so zeigt sich, dass hauptsächlich die starken Ortsfluktuationen der Thyminbasen dafür verantwortlich sind, die gegenüber den entsprechenden Guaninbasen eine wesentlich stärkere Ausprägung finden.

Während das kürzere der beiden Systeme (Abb. 9.2) auch im Bereich der Guaninbasen rms-Werte aufweist, die gegenüber den Modellquadruplexen deutlich erhöht sind, fluktuieren die Guanineinheiten des $d[\text{TTGGGGTT}]_4/\text{K}$ -Tetraplexes (Abb.

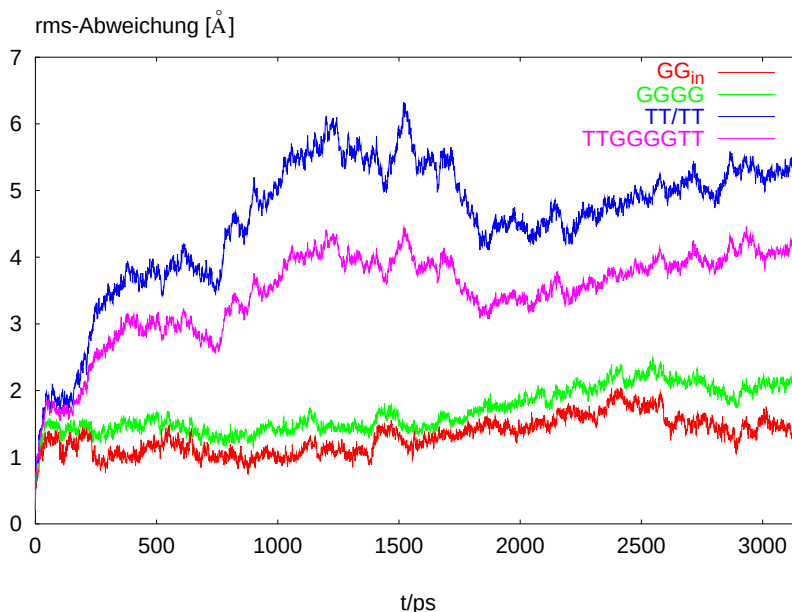


Abb. 9.3: rms-Abweichungen für das System d[TTGGGGTT]₄/K

9.3) in wesentlich geringerem Umfang. Sie liegen in der Größenordnung bereits in der Literatur beschriebener MD-Simulationen an G-Quadruplexen [108] sowie den in dieser Arbeit untersuchten d[GGGG]₄-Modellsystemen, die sich zwischen 1-2 Å hinsichtlich der rms-Abweichungen bewegten.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die reduzierte Fähigkeit der Thyminbasen, planare Ebenen durch die Etablierung entsprechender Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden [118], starke Fluktuationen der endständigen Einheiten bedingt, die jedoch die hohe Gesamtstabilität des Quadruplexes nicht entscheidend schwächen.¹

Tab. 9.1 gibt eine Übersicht der gemittelten rms-Werte. Dabei weisen die Systeme mit „restraints“ erwartungsgemäß geringere Fluktuationen im Guaninbereich auf, als die analogen Quadruplexe ohne verstärkte Wasserstoffbrücken. Dies überträgt sich auf die endständigen T-Basen, die ebenfalls deutlich reduzierte rms-Werte besitzen.

Besonders auffällig sind die deutlich erhöhten Werte des d[TGGGGT]₄/K-Systems ohne H-Brücken-Verstärkung, die auf eine labile Struktur hindeuten. Demgegenüber

¹Das d[TTGGGGTT]₄/K-System erreicht über den Simulationszeitraum einen stabilen Zustand, im Gegensatz zu d[TGGGGT]₄/K. Ob dies durch die Anwesenheit der zusätzlichen Thyminbasen oder durch äußere Simulationsbedingungen hervorgerufen wird, lässt sich an dieser Stelle nicht abschließend beurteilen.

stellt man bei den d[TTGGGGTT]₄/K-Quadruplexen lediglich geringfügige Unterschiede fest, die insgesamt auf eine stabile Anordnung der Systemkomponenten schließen lassen.

$\langle rms \rangle_t$ [Å]	Guanin _{in}	Guanin	Thymin	alle Atome
d[TGGGGT] ₄ /K (o.r.)	1,82±0,73	2,21±0,71	3,96±1,11	2,92± 0,85
d[TGGGGT] ₄ /K (m.r.)	0,91±0,16	1,11±0,25	1,72±0,32	1,36± 0,26
d[TTGGGGTT] ₄ /K (o.r.)	1,31±0,26	1,67±0,32	4,55±1,02	3,44± 0,67
d[TTGGGGTT] ₄ /K (m.r.)	1,24±0,31	1,58±0,48	3,79±0,86	3,12± 0,67

Tabelle 9.1: Mittlere rms-Werte mit Standardabweichungen für die Systeme d[TGGGGT]₄/K und d[TTGGGGTT]₄/K jeweils mit und ohne „restraints“

Die Ursachen für die unterschiedlichen Verläufe der rms-Werte lassen sich dabei nicht nur auf die Länge der Basensequenzen zurückführen. Vielmehr spielen die Bewegungen der interkalierten Kationen und die daraus resultierenden Besetzungsmuster eine maßgebliche Rolle. Dieses wird im Folgenden anhand der Ionenfluktuationen entlang der helikalen Achse untersucht, die signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Tetraplexen erkennen lassen.

9.1.2 Ionenfluktuation entlang des Quadruplexkanals

Abb. 9.4 verdeutlicht die Kationenbewegungen im System d[TTGGGGTT]₄/K (m.r.). Bereits während der Equilibrierungsphase verlassen die zunächst in den äußeren Thyminkäfigen eingelagerten Kaliumionen den Nahbereich des Quadruplexes (vergleiche dazu Tab. 4.7 auf S. 51). Zwei weitere Kationen, die zunächst im Übergangsbereich zwischen Guanin- und Thymineinheiten angesiedelt sind, entfernen sich ebenfalls während der ersten 100 ps der Simulationsphase vom Tetraplex, in Analogie zu den Beobachtungen an den d[GGGG]₄-Systemen. Zusätzliche Ionenbewegungen in Richtung des 3'-Endes schließen sich an. Dabei okkupieren jeweils die weiter innen gelegenen Kaliumionen die freigewordenen Käfige der Kationen, die diese zuvor geräumt haben.

Die daraus resultierende Besetzung der beiden äußeren Hohlräume zwischen den Guaninebenen entspricht dem Muster, das bereits bei den Modellsystemen zu beobachten war (vergleiche dazu Abb. 5.6 auf S. 62). Zusätzlich verbleibt ein Kaliumion über ca. 1000 ps im Kanalbereich der T-Basen. Die verstärkten Wasserstoff-

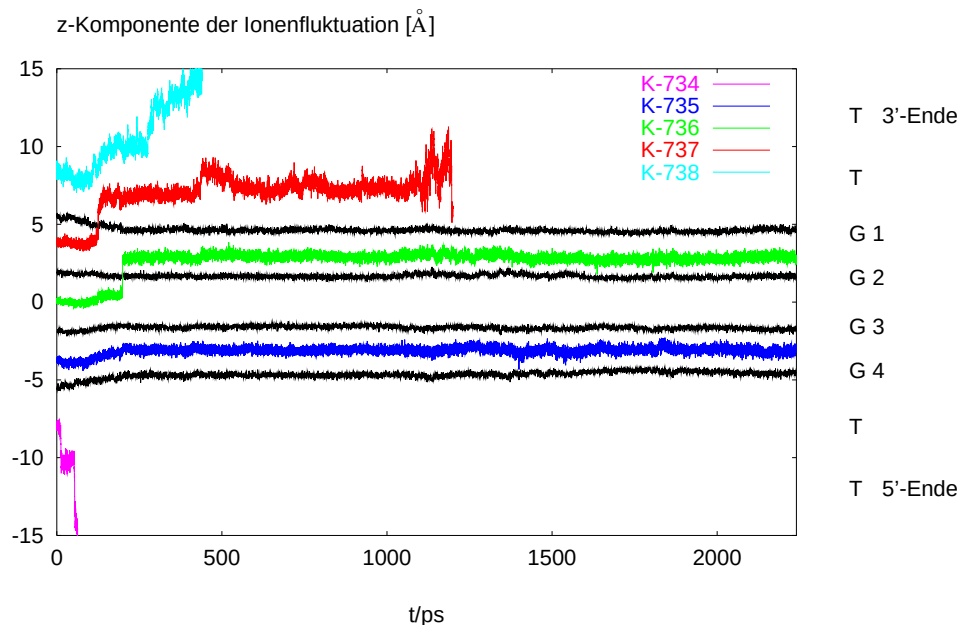


Abb. 9.4: Kationenbewegung entlang der helikalen Achse für das System $d[\text{TTGGGGTT}]_4/\text{K}$ (m.r.)

brückenbindungen zwischen den Guanineinheiten unterstützen dabei die Ausbildung „geordneter“ Thyminstrukturen, die die Komplexierung dieses Kations erlauben.

Betrachtet man demgegenüber das System $d[\text{TGGGGT}]_4/\text{K}$ (m.r.) (Abb. 9.5), so zeigen sich deutliche Unterschiede im Vergleich zu dem längeren Analogen hinsichtlich des Ionenwanderungsverhaltens sowie des sich ausbildenden Besetzungsmusters.

Bereits nach wenigen Picosekunden verlässt das Kation den Guaninkäfig am 3'-Ende des Quadruplexes, verbleibt dann jedoch die restliche Zeit im Zwischenraum, der durch Thymिन- und Guaninquartetts gebildet wird. Am 5'-Ende kommt es nach ca. 580 ps zum Übertritt eines Kaliumions in den „gemischten“ Käfig, welches dann weitere 200 ps später den Nahbereich des Quadruplexes verlässt.

Die Positionierung eines Kaliumions im Bereich des mittleren Guaninhohlraums sowie eines zusätzlich assoziierten Kations im „gemischten“ Käfig am 3'-Ende stellt ein für Guanintetraplexe ungewöhnliches Besetzungsmuster dar.

Inwiefern sich die bei den Systemen ohne „restraints“ erhöhte Flexibilität hinsichtlich der Anordnung der Guaninbasen auf die Bewegung der Kationen entlang der helikalen Achse des Quadruplexes auswirkt, wird im Folgenden näher untersucht.

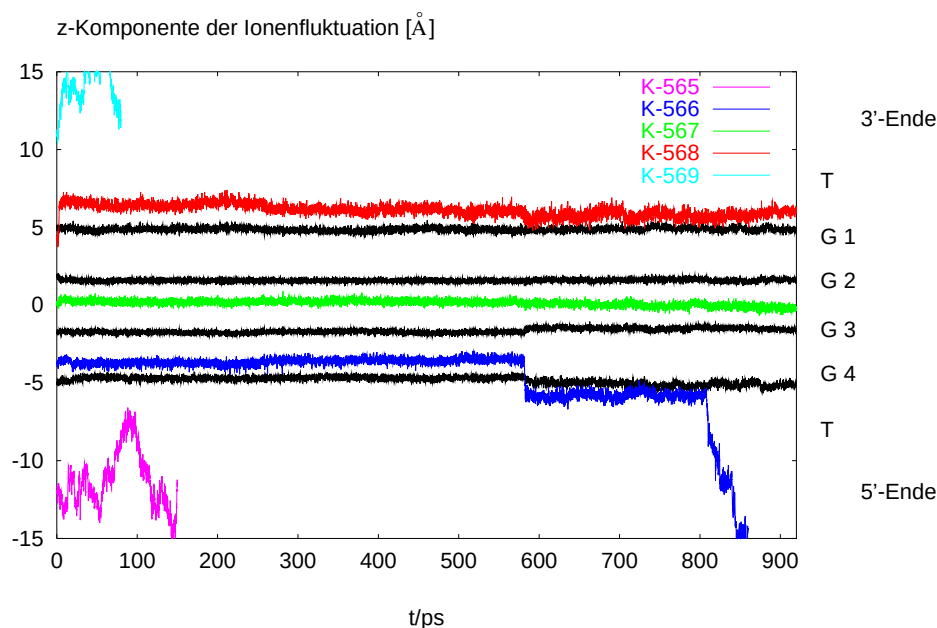


Abb. 9.5: Kationenbewegung entlang der helikalen Achse für das System $d[\text{TTGGGGTT}]_4/\text{K}$ (m.r.)

Abb. 9.6 zeigt die Positionen der interkalierten Kationen, die während der Simulation des Systems $d[\text{TTGGGGTT}]_4/\text{K}$ auftreten. Dabei ergibt sich über den gesamten Zeitraum hinweg ein ausgeprägtes Ionenwanderungsverhalten.

Ebenendurchtritte (Ebene vier zwischen 600 und 700 ps), Positionswechsel zweier Kationen (Ebene eins nach ca. 950 ps und Ebene zwei nach ca. 1750 ps) sowie verstärkte Fluktuationen der Kaliumionen in den Hohlräumen kennzeichnen das Systemverhalten, das im deutlichen Gegensatz zu den Beobachtungen an den Modellquadruplexen steht.

Anders als bei den Systemen mit „restraints“ tritt an dieser Stelle die Besetzung aller Guaninkäfige mit Kaliumionen besonders hervor. Zusätzlich hält sich größtenteils ein weiteres Kation im Bereich der inneren Thyminbasen am 3'-Ende auf. Diese extrem hohe Ladungsdichte entlang des Quadruplexkanals führt jedoch nicht zu einer entscheidenden Destabilisierung des Gesamtsystems (vergleiche dazu Tab. 9.1). Vielmehr versuchen die Kationen durch Ausweichbewegungen senkrecht zur helikalen Achse des Tetraplexes, die Abstände untereinander zu erhöhen und damit die abstoßenden Coulomb-Kräfte zu reduzieren (vergleiche dazu Abb. 9.7 auf S. 182).

Dabei spielen Wassermoleküle, die sich zusätzlich in den Quadruplex einlagern und die Ionen abschirmen, eine wichtige Rolle, die an späterer Stelle noch eingehend

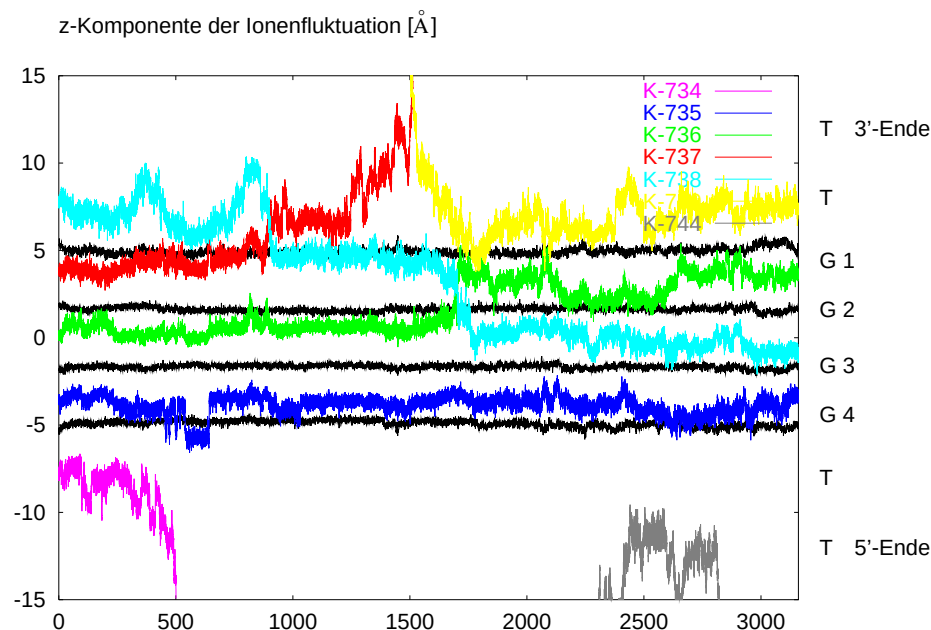


Abb. 9.6: Kationenbewegung entlang der helikalen Achse für das System $d[TTGGGGTT]_4/K$ (o.r.)

diskutiert wird (siehe dazu Abb. 9.17). Diese Solvensmoleküle ermöglichen gleichzeitig den o.g. Positionswechsel zweier Kationen (vergleiche dazu Abb. 9.16). Ein interessantes Detail stellt die Beobachtung des Eintritts eines Ions in den Kanalbereich der DNA-Stränge dar, der erstmalig an dieser Stelle beobachtet werden konnte. Die Möglichkeit zum Austausch von Kationen zwischen dem „bulk-“ und dem Tetraplexbereich unterstreicht dabei die hohe Affinität dieser positiv geladenen Teilchen zu den sie komplexierenden Carbonylsauerstoffatomen der beteiligten Basen. Gleichzeitig kann dieser Vorgang als ein Indiz für die stark ausgeprägte Tendenz zur „Selbststabilisierung“ von Quadruplexstrukturen angesehen werden.

Das System $d[TGGGGT]_4/K$ (o.r.) (Abb. A.32 in Anhang A.7.1 auf S. 263) weist, ebenso wie das längere Analoge, starke Fluktuationen der Ionen in den Guaninhohlräumen auf. Bereits nach wenigen Picosekunden verlassen zwei der ursprünglich in der Startstruktur interkalierten Ionen den Quadruplexverband. Die verbleibenden drei Kationen halten sich nachfolgend in unmittelbarer Nähe der Guaninbasen auf.

Anders als bei den $d[GGGG]_4$ -Modellsystemen, kommt es nicht zu einer weitreichenden Reduzierung der abstoßenden Coulomb-Kräfte durch das Hinauswandern weiterer Kationen. Vielmehr versucht das mittlere Ion (K-567) durch eine

Ausweichbewegung senkrecht zur Kanalachse eine energetisch günstigere Position einzunehmen. Dabei spielen, wie schon im Fall des d[TTGGGGTT]₄/K-Systems, Wassermoleküle eine wichtige Rolle, die seitlich in den „geöffneten“ Quadruplex eindringen. Dieser Vorgang, zusammen mit den drastischen Strukturveränderungen, wird an späterer Stelle noch eingehender diskutiert (vergleiche dazu Abb. 9.14).

9.1.3 Strukturbetrachtungen zu Beginn und Ende der Simulation

Die zu Beginn dieses Abschnitts dargestellten Unterschiede in den rms-Abweichungen lassen sich gut anhand eines Vergleichs der Anfangs- und Endstrukturen verdeutlichen.

Abb. 9.7 zeigt diese Konformationen für das System d[TTGGGGTT]₄/K (o.r.).² Wie man erkennen kann, sind bereits nach Abschluss der Equilibrierungsphase (Start der Aufzeichnungsphase) die Thyminbasen am 3'-Ende aus der planaren Anordnung herausgedreht (im Gegensatz zu den analogen Basen am 5'-Ende). Dabei weisen ihre Carbonylsauerstoffe in Richtung des am 3'-Ende positionierten Kations. Die interkalierten Ionen sind entlang der helikalen Achse mit geringem Versatz angeordnet.

Betrachtet man die entsprechende Struktur nach 3160 ps, so entdeckt man ausgeprägte Veränderungen im Bereich des „backbones“. Die helikale Verdrillung der Basenstränge zeigt eine wesentlich geringere Symmetrie als zu Beginn der Simulation. Die Thymineinheiten am 3-Ende sind weit nach außen herausgedreht. Im Gegensatz dazu weisen die Basen am 5'-Ende nach innen, in Richtung eines Kaliumions, das in den Kanal hineingewandert ist.

Durch die Untersuchung der Strukturveränderungen mit Hilfe von Filmsequenzen wird deutlich, dass besonders im Bereich der Thyminbasen die Nähe von Kationen einen erheblichen Einfluss auf die Basenanordnung ausübt. Ähnlich wie eine Tentakel „fischen“ die Stränge Ionen aus dem Nahbereich der DNA und führen sie so in den Kanalbereich des Quadruplexes.³ Die Guaninbasen bilden dagegen bis zum Ende der Simulation eine weitestgehend planare Anordnung aus, was bereits bei entsprechenden d[GGGG]₄-Modellsystemen beobachtet werden konnte.

²Zur besseren Unterscheidung der einzelnen Kaliumionen sind diese farblich individuell dargestellt. Es sind lediglich die Kationen visualisiert, die während der Simulation in dem Bereich des Quadruplexkanals auftreten.

³Wie bereits im letzten Abschnitt angemerkt wurde, nehmen die Kationen im Quadruplexkanal eine versetzte Anordnung ein, um die abstoßenden Coulomb-Wechselwirkungen zu reduzieren.

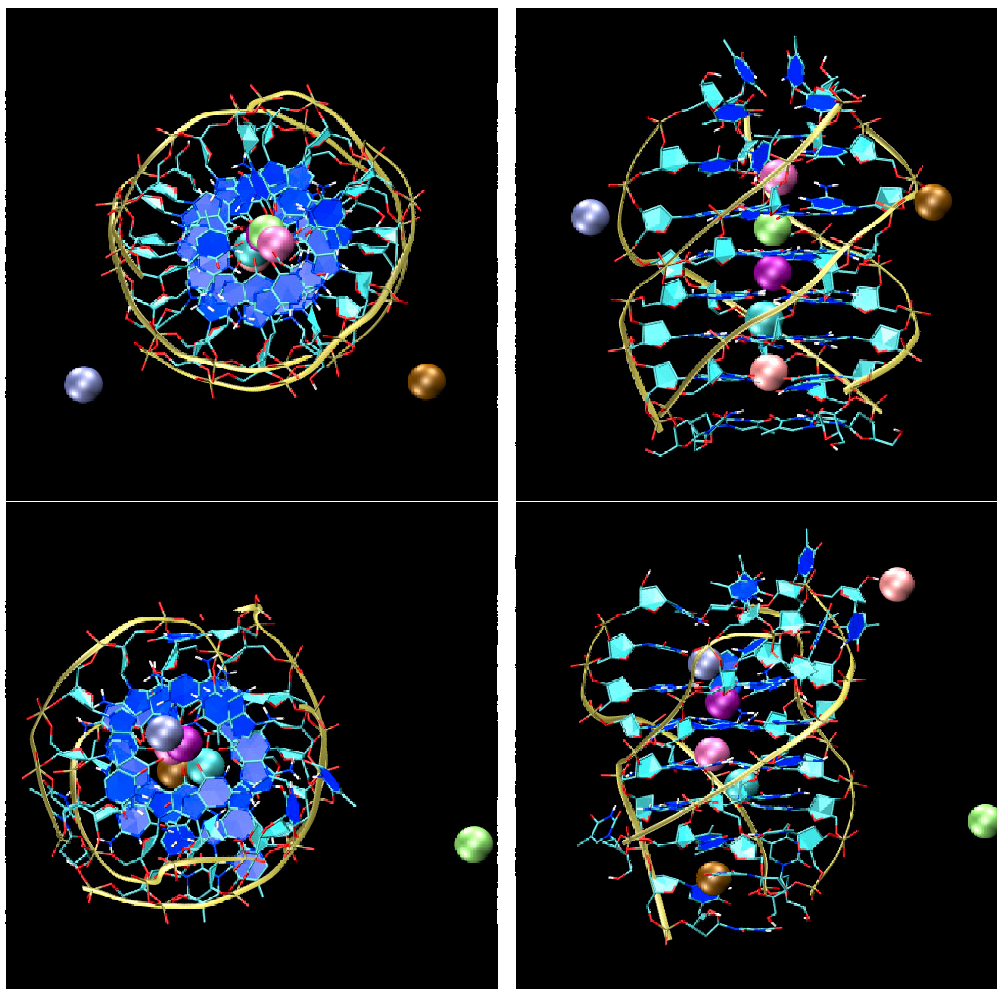


Abb. 9.7: Startstruktur (oben) und Folgestruktur (unten) nach 3160 ps für das System $d[\text{TTGGGGTT}]_4/\text{K}$ (o.r.) (Aufsicht und Seitenansicht, 5'-Ende: unten)

Die entsprechenden Endstrukturen für die Simulation mit verstärkten Wasserstoffbrücken können der Abb. A.33 in Anhang A.7.1 auf S. 264 entnommen werden.

Hierbei zeigt sich neben den Unterschieden im Besetzungsmuster, dass die „Abstandsfixierung“ erwartungsgemäß zu geringen Veränderungen im „backbone“ führt. Dies bewirkt eine gleichmäßige Ausdehnung der Quadruplexstruktur senkrecht zur helikalen Achse. An dieser Stelle sollte jedoch beachtet werden, dass sich die Thyminbasen trotz Potenzialverstärkung im Guaninbereich aus der ebenen Anordnung herausdrehen. Dies unterstreicht die hohe Tendenz dieser Basensorte, nicht planare intermolekulare Konformationen einzunehmen.

In der Abb. A.33 sind zusätzlich die Endstrukturen der d[TGGGGT]₄/K-Quadruplexe aufgeführt. Dabei zeigt sich für die Simulation mit „restraints“ eine insgesamt hohe Stabilität der Gesamtstruktur, die Basenebenen bleiben erhalten. Auch das Rückgrat der Stränge weist lediglich eine geringe Deformation im Vergleich zur Startstruktur auf.

Anders stellt sich das Aussehen der Endstrukturen für das analoge System ohne Potenzialverstärkung dar. Über den Simulationsverlauf kommt es zu starken Konformationsänderungen auch im Bereich der Guaninbasen. Diese drehen sich aus ihrer ursprünglichen Anordnung heraus, um den veränderten Komplexierungsbedingungen der Kationen im Quadruplexkanal zu entsprechen.

Eine eingehende Studie mit Hilfe von Filmsequenzen zeigt die durch die Ionenbewegung verursachte Deformation der inneren Käfigstrukturen. Daraus resultiert insbesondere eine Verringerung des helikalen Winkels, den die einzelnen Stränge einnehmen, was zu einer strukturellen Öffnung im Seitenbereich des Quadruplexes führt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass, trotz starker Fluktuationen im Bereich der endständigen Basen durch die zusätzlichen Thymineinheiten, die innere Guaninstruktur nicht entscheidend geschwächt wird.⁴ Die Systeme mit „restraints“ zeichnen sich dabei erwartungsgemäß durch ein hohes Maß an Stabilität aus. Gleichzeitig beobachtet man für den d[TTGGGGTT]₄/K-Quadruplex ohne „restraints“ nahezu identische rms-Werte im Vergleich zum analogen System (m.r.), was erneut den starken Zusammenhalt von Tetraplexstrukturen in Gegenwart von Kaliumionen aufzeigt sowie eine hohe Güte der Simulation andeutet.

Die Betrachtung der Folgestrukturen der simulierten Spezies veranschaulicht die anhand der rms-Werte beschriebenen Stabilitätsunterschiede zwischen Guanin- und Thyminbereichen innerhalb eines Systems sowie die der Systeme untereinander. Besonders bei den Quadruplexen ohne „restraints“ führt die hohe positive Ladungsdichte entlang des Tetraplexkanals zu einer versetzten Anordnung der interkalierten Kationen. Daraus resultieren Veränderungen in der äußeren Gestalt des Tetraplexes, was sich am Windungsverhalten des Rückgrats der DNA-Stränge ablesen lässt.

Im Gegensatz zu den d[GGGG]₄-Modellsystemen kommt es bei den Simulationen der Tetraplexe mit erweiterten Basensequenzen ohne zusätzlich verstärkte Wasserstoffbrückenbindungen zu einer Besetzung aller Guaninkäfige. Dabei konnte anhand des Systems d[TTGGGGTT]₄/K (o.r.) erstmalig im Verlauf der Simulationen unter-

⁴Das System d[TGGGGT]₄/K (o.r.) bildet diesbezüglich eine Ausnahme, wobei die Gründe sicherlich in der sich ausbildenden ungewöhnlichen Anordnung der interkalierten Kaliumionen zu suchen sind.

schiedlichster Quadruplexstrukturen das Hineinwandern eines Ions aus dem „bulk“ in den Kanalbereich beobachtet werden. Die elektrostatisch anspruchsvolle Anordnung der interkalierten Kationen wird zum einen ermöglicht durch die erhöhte Flexibilität, die die Guaninbasen hinsichtlich der Ausbildung geeigneter Konformationen (Wasserstoffbrückenmuster) im Gegensatz zu den Systemen mit „restraints“ besitzen. Zum anderen erschweren die zusätzlichen Thyminbasen die Ionenbewegung heraus aus dem Tetraplexkanal, da sie selbst keine planare Konformation einnehmen. Ihre Carbonylsauerstoffatome weisen „ungeordnet“ in Richtung der eingelagerten Kationen, was eine „Blockierung“ der Enden des Guanin-Quadruplexes zur Folge hat.

Für die Systeme mit „restraints“ beobachtet man demgegenüber eine reduzierte Ionendichte im Tetraplexkanal. Dies legt die Vermutung nahe, dass vorhandene, teilweise geordnete Strukturen der Thyminbasen an den Quadruplexenden die Ionenwanderung entlang der Kanalachse unterstützen. Die unterschiedliche Anzahl der terminalen T-Einheiten führt dabei jedoch zu uneinheitlichen Besetzungsmustern der untersuchten Tetraplexe. Neben der Belegung der äußeren Guaninkäfige durch zwei Kationen ($d[TTGGGGTT]_4/K$ (m.r.)) in Analogie zu vorausgehenden Modellstudien reiner Guanin-Quadruplexe [113], beobachtet man im Fall des $d[TGGGGT]_4/K$ -Systems (m.r.) lediglich die Positionierung eines Ions im Bereich des mittleren Guaninhohlraums mit einem zusätzlich assoziierten Kaliumion im „gemischten“ Käfig am 3'-Ende. Offensichtlich spielen dabei unterschiedlich stark ausgeprägte Endeffekte der Thyminbasen eine entscheidende Rolle, die zu differentem Ionenwanderungsverhalten der interkalierten Kationen in Abhängigkeit von der Stranglänge führen.

9.2 Die Geometrie der erweiterten Systeme

In Anlehnung an die Untersuchungen an $d[GGGG]_4$ -Modellsystemen, die Korrelationen zwischen der Veränderung geometrischer Größen und der Sorte der interkalierten Ionen aufzeigen, sollen an dieser Stelle insbesondere die Auswirkungen durch zusätzliche Thyminbasen studiert werden. Die durch die Strangverlängerung unter Berücksichtigung des Besetzungsmusters hervorgerufenen Veränderungen geometrischer Größen werden daher im Folgenden eingehend untersucht.

Der beobachtete zeitliche Verlauf der Abstände der durch die Guaninbasen aufgespannten Ebenen entspricht den Beobachtungen, die bereits bei den Modellquadruplexen gemacht wurden. Dabei führt die Besetzung eines Käfigs zu einer Kontraktion, wohingegen unbesetzte Hohlräume durch vergrößerte Abstände gekennzeichnet sind.

Tab. 9.2 beinhaltet die entsprechenden Mittelwerte mit den zugehörigen Standardabweichungen. Dabei ergeben sich Unterschiede gegenüber den vergleichbaren Modellsystemen in der Größenordnung von ca. 7 - 21 % (siehe dazu Tab. 7.1 sowie Tab. A.8).⁵

$\langle \text{Ebenenabstand} \rangle_t$ [Å]	1 - 2	2 - 3	3 - 4
d[TGGGGT] ₄ /K (m.r.)	○ 3,32 ± 0,18	● 3,20 ± 0,20	○ 3,25 ± 0,44
d[TGGGGT] ₄ /K (o.r.)	● 3,04 ± 0,25	● 3,23 ± 0,29	● 3,24 ± 0,20
d[TTGGGGTT] ₄ /K (m.r.)	● 3,02 ± 0,19	○ 3,31 ± 0,23	● 3,05 ± 0,22
d[TTGGGGTT] ₄ /K (o.r.)	● 3,43 ± 0,30	● 3,23 ± 0,22	● 3,37 ± 0,26

Tabelle 9.2: Mittlere Ebenenabstände mit Standardabweichungen innerhalb der erweiterten DNA-Systeme (● ≡ besetzt, ○ ≡ unbesetzt)

Die Simulationsreihe der durch jeweils eine Thyminbase an den Enden verlängerten Stränge unterscheidet sich lediglich in den Abständen zwischen den Ebenen eins und zwei, bedingt durch ein differentes Besetzungsmuster.

Demgegenüber weisen die beiden d[TTGGGGTT]₄/K-Systeme ein deutlich unterschiedliches Abstandsverhalten auf. Trotz der Besetzung aller Guaninkäfige durch Ionen im Fall der Simulation ohne „restraints“ kommt es zu gesteigerten Ebenenabständen (1 - 2 sowie 3 - 4). Insgesamt ist die Summe der Abstände ebenfalls erhöht. Dies Verhalten wird an späterer Stelle bei der Untersuchung der Wechselwirkungen mit der Solvenshülle noch genauer diskutiert.

Betrachtet man die Ausdehnungen des Quadruplexkanals senkrecht zur helikalen Achse anhand der Abstände benachbarter Carbonylsauerstoffatome, so lassen sich für die Simulationsreihen ohne H-Brückenverstärkung starke Aufweitungerscheinungen registrieren.

Abb. 9.8 verdeutlicht dies exemplarisch anhand der Aufweitung innerhalb der Guaninebene zwei des Systems d[TTGGGGTT]₄/K (o.r.). Deutlich erkennbar sind Erhöhungen der Werte infolge von Ionenannäherungen (vergleiche dazu Abb. 9.6). Diese fallen jedoch im Vergleich zu den Modellsystemen wesentlich stärker aus.

⁵Besetzte Käfige sind verkleinert, unbesetzte Hohlräume im Vergleich zu den Modellsystemen vergrößert. Dabei fallen die Unterschiede bei den Systemen ohne „restraints“ am deutlichsten aus.

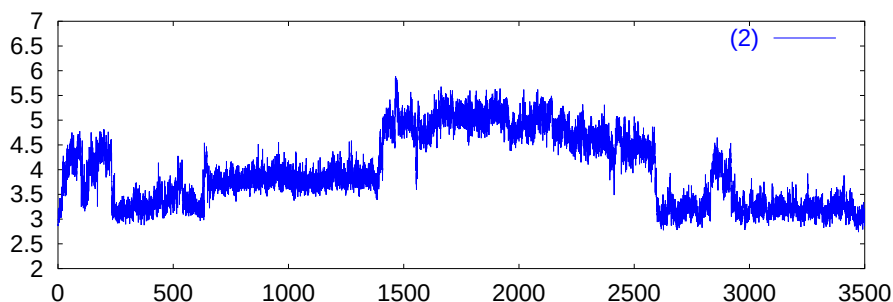


Abb. 9.8: Mittlere O6-O6-Abstände innerhalb der Ebene 2 des Systems $d[TTGGGGTT]_4/K$ (o.r.)

Tab. 9.3 beinhaltet eine Übersicht der gemittelten O6-O6-Abstände. Wie durch die Verstärkung der Wasserstoffbrückenbindungen zu erwarten war, verhalten sich die Systeme mit „restraints“ sehr ähnlich. Es treten lediglich Fluktuationen der Werte im Rahmen der vergleichbaren $d[GGGG]_4$ -Quadruplexe auf.

$\langle O6 - O6 \rangle_{t,n}$ [Å]	1	2	3	4
$d[TTGGGGTT]_4/K$ (m.r.)	$3,20 \pm 0,11$	$3,27 \pm 0,11$	$3,03 \pm 0,18$	$3,43 \pm 0,22$
$d[TTGGGGTT]_4/K$ (o.r.)	$3,76 \pm 0,50$	$3,91 \pm 0,64$	$3,72 \pm 0,77$	$4,58 \pm 0,62$
$d[TTGGGGTT]_4/K$ (m.r.)	$3,52 \pm 0,15$	$3,30 \pm 0,15$	$3,17 \pm 0,15$	$3,31 \pm 0,21$
$d[TTGGGGTT]_4/K$ (o.r.)	$5,00 \pm 0,56$	$4,07 \pm 0,70$	$3,47 \pm 0,66$	$4,20 \pm 0,82$

Tabelle 9.3: Mittlere O6-O6-Abstände mit Standardabweichungen innerhalb der Guaninebenen der erweiterten DNA-Systeme

Eine signifikante Vergrößerung der Mittelwerte ist hingegen bei den Simulationen ohne „restraints“ zu beobachten, die sich schon bei der Betrachtung der auftretenden Folgestrukturen andeutete. Besonders das System $d[TTGGGGTT]_4/K$ (o.r.) zeichnet sich durch einen teilweise bis ca. 40 % vergrößerten Abstand gegenüber dem analogen Tetraplex mit „restraints“ aus.

Die Geometrie der durch die O6-Sauerstoffatome gebildeten Quadruplexkäfige schwankt ebenfalls für die Fälle unverstärkter H-Brücken über den Simulationszeitraum hinweg stark. Die Diederwinkel weisen zeitweise im Vergleich zu den entsprechenden Modellsystemen deutlich erhöhte Werte auf. Die zugehörigen Mittel-

werte und Standardabweichungen deuten auch an dieser Stelle auf eine sterisch hohe konformative Flexibilität der Stränge und interkalierten Ionen hin.

Wie bereits bei den Modellsystemen gezeigt wurde, lassen sich durch die Untersuchungen der Abstände der Phosphoratome einer Ebene Aussagen hinsichtlich der äußeren Quadruplexausdehnung senkrecht zur helikalen Achse treffen.

Für die $d[\text{TGGGGT}]_4/\text{K}$ -Systeme listet Tab. 9.4 diese Werte auf. Dabei stellt man fest, dass, entgegen der oben beschriebenen Vergrößerung der inneren O6-O6-Abstände der Guaninkäfige, nach außen hin eine Kontraktion zu beobachten ist.

$\langle d_{(P-P)} \rangle_{t,n} [\text{\AA}]$	$d[\text{TGGGGT}]_4/\text{K}$ (m.r.)	$d[\text{TGGGGT}]_4/\text{K}$ (o.r.)
Ebene 1 (3') (T)	15,12 $\pm$ 0,22	15,19 $\pm$ 0,61
Ebene 2 (G)	16,95 $\pm$ 0,22	16,10 $\pm$ 0,40
Ebene 3 (G)	16,37 $\pm$ 0,41	16,33 $\pm$ 0,43
Ebene 4 (G)	16,54 $\pm$ 0,28	16,51 $\pm$ 0,35
Ebene 5 (5') (T)	15,67 $\pm$ 0,31	14,93 $\pm$ 0,98

Tabelle 9.4: Mittlere Phosphorabstände mit Standardabweichungen innerhalb der Ebenen der $d[\text{TGGGGT}]_4/\text{K}$ -Systeme

Noch stärker tritt dieser Effekt bei einem Vergleich der $d[\text{TTGGGGTT}]_4/\text{K}$ -Tetraplexe in Erscheinung (siehe Tab. 9.5). Beachtet werden sollte an dieser Stelle, dass im Bereich der endständigen Phosphorebenen starke Schwankungen auftreten, die bei den „reinen“ Guanin-Quadruplexen nicht zu beobachten waren.

Die Abstände der Phosphoratome innerhalb der einzelnen Stränge weisen für die jeweiligen Systeme ohne „restraints“ lediglich geringe Unterschiede auf (siehe Tab. 9.6). Dies lässt sich auf die ähnlichen Besetzungsmuster der beiden Tetraplexe zurückführen (Belegung aller Guaninkäfige mit Kaliumionen; vergleiche dazu die Abb. 9.6 und A.32).

Demgegenüber beobachtet man bei den Simulationen mit „restraints“ wesentlich stärkere Unterschiede innerhalb der jeweiligen Strangreihe. Es liegen verkürzte P-P-Abstände bei dem Größeren der beiden Quadruplexe vor, die auf die erhöhte Ladungsdichte im Guaninkanal für den Fall des $d[\text{TTGGGGTT}]_4/\text{K}$ -Systems zurückzuführen sind (zwei interkalierte Kaliumionen in den endständigen Guaninkäfigen,

$\langle d_{(P-P)} \rangle_{t,n} [\text{\AA}]$	d[TTGGGGTT] ₄ /K (m.r.)	d[TTGGGGTT] ₄ /K (o.r.)
Ebene 1 (3') (T)	13,05 ± 0,82	14,83 ± 0,81
Ebene 2 (T)	15,31 ± 0,62	15,79 ± 0,47
Ebene 3 (G)	16,74 ± 0,35	15,61 ± 0,41
Ebene 4 (G)	16,69 ± 0,41	15,79 ± 0,30
Ebene 5 (G)	16,50 ± 0,34	15,67 ± 0,35
Ebene 6 (T)	15,30 ± 0,33	15,37 ± 0,81
Ebene 7 (5') (T)	15,21 ± 0,40	15,63 ± 1,16

Tabelle 9.5: Mittlere Phosphorabstände mit Standardabweichungen innerhalb der Ebenen der d[TTGGGGTT]₄/K-Systeme

im Vergleich zu einem Kation im mittleren Käfig für das System d[TGGGGT]₄/K (m.r.); siehe dazu die Abb. 9.4 und 9.5). Dabei lässt sich das individuelle Verhalten der beiden Quadruplexe mit verstärkten Wasserstoffbrückenbindungen hinsichtlich der Ebenenabstände zwischen den Guaninbasen (siehe Tab. 9.2) in den Bereich des „backbones“ übertragen. Unterschiedliche Besetzungsmuster bedingen differente Ausdehnungen der Guaninhohlräume entlang der helikalen Achse, die ihrerseits zu veränderten P-P-Abständen entlang der Stränge des Rückgrats führen (Reduzierung des Abstands der Guaninebenen ⇒ Verringerung der Distanz zwischen den Phosphoratomen innerhalb eines Stranges).

	(m.r.) d[TGGGGT] ₄ /K (o.r.)		(m.r.) d[TTGGGGTT] ₄ /K (o.r.)	
Strang	$\langle d_{(P-P)} \rangle_{t,n} [\text{\AA}]$	$\langle d_{(P-P)} \rangle_{t,n} [\text{\AA}]$	$\langle d_{(P-P)} \rangle_{t,n} [\text{\AA}]$	$\langle d_{(P-P)} \rangle_{t,n} [\text{\AA}]$
1	6,98 ± 0,13	6,84 ± 0,16	6,57 ± 0,17	6,84 ± 0,14
2	6,93 ± 0,14	6,51 ± 0,30	6,67 ± 0,13	6,62 ± 0,14
3	6,90 ± 0,14	6,71 ± 0,14	6,76 ± 0,14	6,72 ± 0,20
4	6,93 ± 0,13	6,90 ± 0,21	6,59 ± 0,17	6,62 ± 0,18

Tabelle 9.6: Mittlere P-P-Abstände mit Standardabweichung innerhalb eines Stranges für die DNA-Systeme mit erweiterten Basensequenzen

Aussagen zur „Kompaktheit“ der untersuchten Quadruplexstrukturen mit erweiterten Basensequenzen lassen sich durch die Untersuchung der Trägheitsradien treffen. Abb. 9.9 zeigt das Verhalten für die Systeme mit jeweils zwei endständigen Thyminbasen.

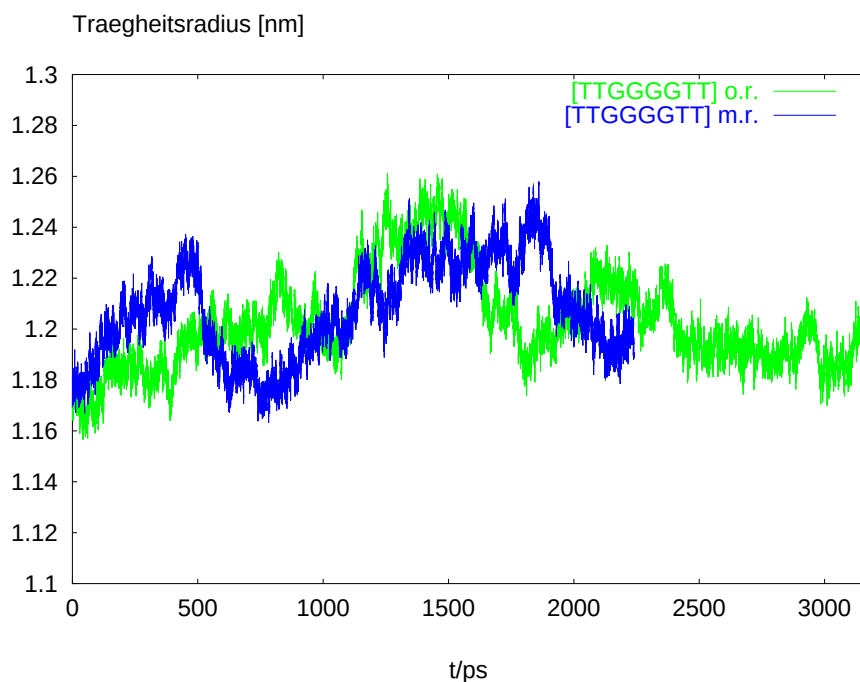


Abb. 9.9: Trägheitsradien der $d[TTGGGGTT]_4/K$ -Systeme

Dabei fällt auf, dass der $d[TTGGGGTT]_4/K$ -Tetraplex (o.r.) trotz fehlender Wasserstoffbrückenverstärkung im Bereich der Guaninbasen Werte aufweist, die in der Größenordnung des analogen Systems mit „restraints“ liegen. Dies deutet, ähnlich wie die rms-Werte, auf eine stabile Struktur des Quadruplexes sowie die hohe Güte der Simulation hin. Unterschiede beobachtet man lediglich hinsichtlich der individuellen Verläufe (Anordnung der Maxima und Minima), die eng mit den Bewegungen der interkalierten Ionen verknüpft sind.

Beispielsweise erhöht sich der Trägheitsradius, sobald sich ein Kation aus dem Nahbereich des Quadruplexes entfernt und steigt umgekehrt, sobald sich erneut ein Kaliumion in den Ionenkanal hinein bewegt (siehe dazu Abb. 9.6; System ohne „restraints“; Ionenbewegungen im Bereich der Ebenen eins zwischen ca. 1250 ps und 1750 ps).

Demgegenüber sind für die entsprechenden $d[TGGGGT]_4/K$ -Quadruplexe deutliche Unterschiede zu erkennen, wie Abb. A.34 in Anhang A.7.2 auf S. 265

zu entnehmen ist. Während der Quadruplex mit zusätzlicher Verstärkung der Wasserstoffbrücken ein sehr gleichmäßiges Verhalten zeigt, weist das System ohne „restraints“ erhöhte Trägheitsradien auf. Stark ansteigende Werte deuten hier auf eine nach außen gerichtete Bewegung aller DNA-Atome hin, die zu einer Auflösung der geordneten Quadruplexstruktur führen.

Dies bestätigt die visuellen Eindrücke, die man bereits bei der Betrachtung der Endstrukturen (vergleiche dazu Abb. A.33) machen konnte. Im Gegensatz zum entsprechenden d[TTGGGGTT]₄/K-System (o.r.), das ein zusätzliches Kation im Bereich der Thyminbasen am 3'-Ende aufweist, fehlt dieses im analogen Tetraplex mit verkürzter Stranglänge. Zusätzlich treten heftige Ionenfluktuationen innerhalb des Kanalbereichs auf (siehe Abb. A.32). Beide Aspekte reduzieren die Stabilität des Quadruplexes und führen zu Konformationen, die stärker nach außen gerichtet sind.

Wie in diesem Kapitel gezeigt werden konnte, wirkt sich die Verlängerung der Stränge durch zusätzliche Thyminbasen auf die Geometrie der Anordnung im Bereich der Guanineinheiten aus. Insbesondere die Systeme ohne „restraints“ zeichnen sich im Vergleich zu den Modellquadruplexen sowohl durch vergrößerte Abstände der durch die Carbonylsauerstoffatome aufgespannten Ebenen aus, als auch durch erhöhte Distanzen zwischen den O6-Atomen innerhalb dieser Tetramereinheiten. Entgegen der beobachteten Aufweitung im inneren Bereich des Quadruplexes, kommt es nach außen hin zu einer Kontraktion der Phosphoratome des „backbones“.

Bedingt durch die zusätzliche Verstärkung von Wasserstoffbrückenbindungen und den damit verbundenen auftretenden Besetzungsmustern, verhalten sich die Systeme mit „restraints“ analog zu den d[GGGG]₄-Quadruplexen. Ohne diese Verstärkung kommt es demgegenüber zu einer Ausbildung geräumigerer innerer Strukturen, die der erhöhten Ionendichte im Kanal Rechnung tragen. Dies deutet auf ein hohes Maß an Flexibilität hin, das besonders die d[TTGGGGTT]₄-Strukturen (o.r.) hinsichtlich der Anordnung der Guaninbasen besitzen, ohne dass es zu signifikanten Stabilitätsverlusten kommt. Kationen, die sich im Bereich der Thyminbasen einlagern, verleihen dabei dem Tetraplex zusätzliche Kompaktheit und sichern seinen Bestand.

9.3 Wasserstoffbrückenbindungen - die Ausrichtung der Guaninbasen

Durch eine Potenzialverstärkung zwischen den Basenatomen benachbarter Guanineinheiten wird „künstlich“ bei den Systemen mit „restraints“ das Hoogsteen-Brückenmuster favorisiert. Trotz dieser Verstärkung besitzt das System noch die Möglichkeit, auf entsprechende Ionenbewegungen mit Veränderungen der Basenanordnung zu reagieren. Die „restraints“ sind dazu notwendig, den Mechanismus der Ionenwanderung zu untersuchen und zu verstehen.

Abb. 9.10 zeigt dies am Beispiel der zeitlichen Entwicklung der H-Brücken in der Ebene 3 des Systems d[TGGGT]₄/K (m.r.). Man erkennt deutlich die präferierte Form des Hoogsteen-Typs über weite Simulationsbereiche. Verbunden mit der Ionenwanderung eines Kaliumions nach ca. 580 ps durch diese Ebene in Richtung des 5'-Endes, kommt es zu einer Reduzierung dieses H-Brückenanteils. Gleichzeitig erfolgt die Zunahme des alternativen N7-H1-Typs (vergleiche dazu Abb. 9.5), in Analogie zu den Beobachtungen bei den Modellsystemen. Erst das komplette Verlassen des Quadruplexverbandes durch das Kation bildet das ursprüngliche, engere H-Brückenmuster zurück (nach ca. 800 ps).

Demgegenüber ist die Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb der Guaninebenen in den Systemen ohne „restraints“ reduziert (siehe Abb. 9.11). Für die Ebene eins des DNA-Tetraplexes d[TTGGGGTT]₄/K zeigt sich ein gemischtes H-Brückenmuster, das jedoch durch den N7-H1-Typ dominiert wird.

Dies entspricht den Beobachtungen der geometrischen Veränderungen im letzten Abschnitt.

Noch drastischer fällt die Reduktion im Bereich der inneren Basenpaare aus. Abb. A.35 in Anhang A.7.3 auf S. 266 zeigt dies exemplarisch für die Ebene zwei dieses Systems. Der erhöhte Platzbedarf der interkalierten Kationen äußert sich in einer fast vollständigen Zurückdrängung des Hoogsteen-Musters. Lediglich die N7-H1-Brücken können sich zum Teil ausbilden. Über die letzten 1000 ps der Simulation sind dann fast keine Wechselwirkungen dieser Art mehr zu beobachten. Dies bedeutet jedoch nicht, dass sich die Quadruplexstruktur aufgelöst hat. Vielmehr bewirken eingelagerte Wassermoleküle eine Aufweitung der „inneren Struktur“, die zum Verschwinden dieser speziellen Wasserstoffbrückenmuster und der Ausbildung alternativer Konformationen führen, was im folgenden Kapitel eingehend untersucht wird.

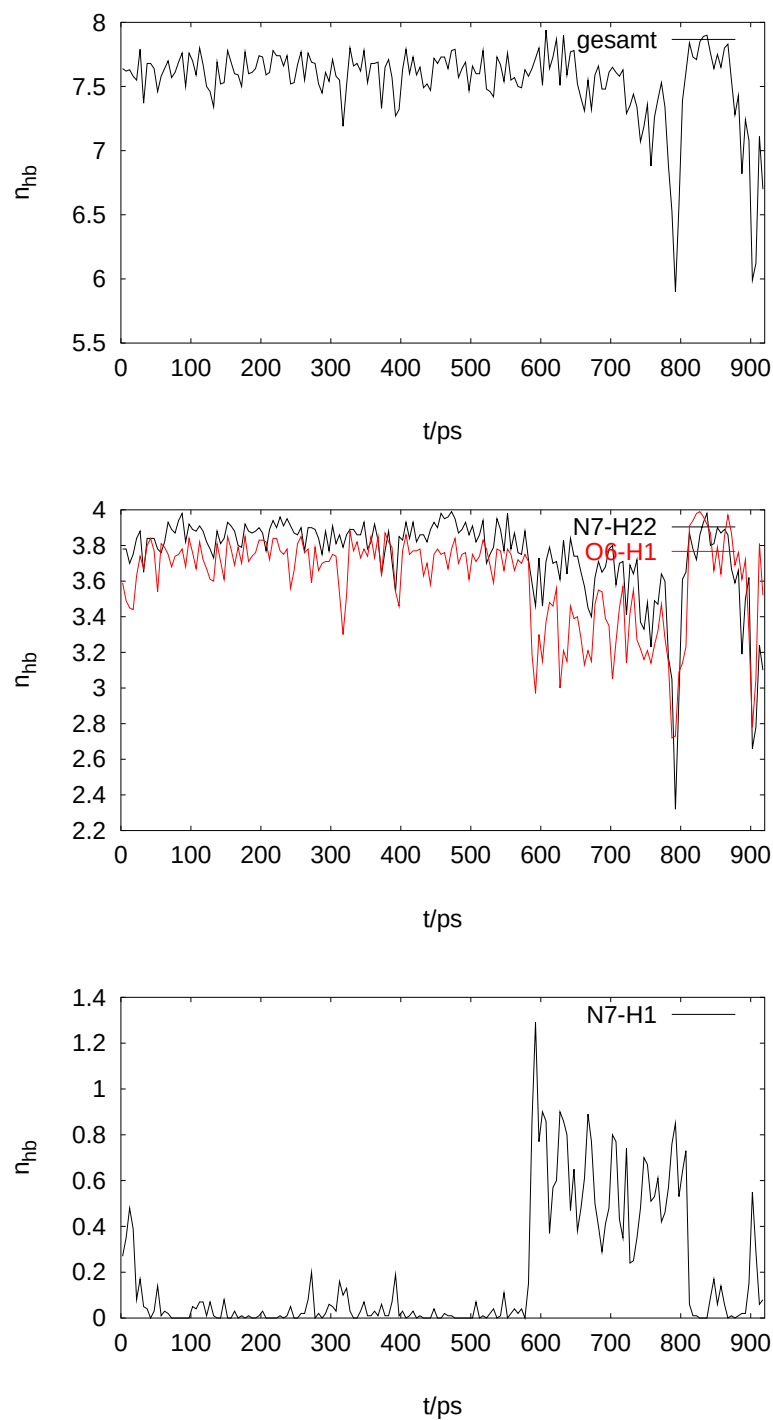


Abb. 9.10: Gesamtanzahl: Wasserstoffbrücken, Hoogsteen-Anteil, N7-H1-Anteil in Ebene 3 des Systems d[TGGGGT]₄/K (m.r.), gemittelt wurde jeweils über einen Zeitbereich von 5 ps

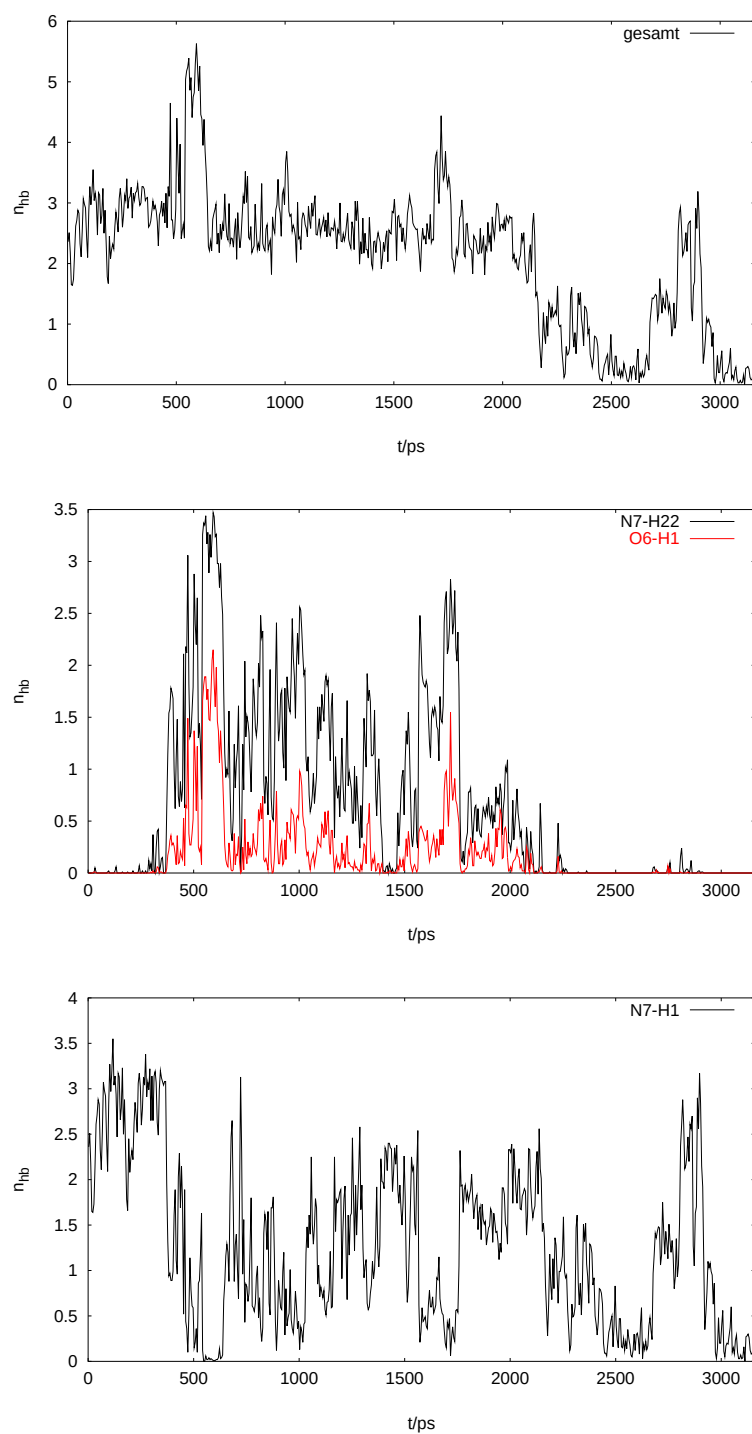


Abb. 9.11: Gesamtanzahl: Wasserstoffbrücken, Hoogsteen-Anteil, N7-H1-Anteil in Ebene 1 des Systems d[TTGGGGTT]₄/K (o.r.), gemittelt wurde jeweils über einen Zeitbereich von 5 ps

9.4 Die Hydratisierung der Tetraplexe

Wie die letzten Abschnitte gezeigt haben, bedingt der Übergang zu realen, langsträngigen Sequenzen Veränderungen innerhalb der Geometrie der Tetraplexe im Vergleich zu den d[GGGG]₄-Modellsystemen. Inwiefern dabei Wassermoleküle eine Rolle spielen, soll im Folgenden untersucht werden. Insbesondere werden Unterschiede innerhalb der Systemreihen mit und ohne „restraints“ diskutiert sowie Vergleiche zu den reinen Guanin-Quadruplexen angestellt.

9.4.1 Die strukturelle Klassifizierung der Wassermoleküle

Abb. 9.12 zeigt einen „scatterplot“ für die Ebene zwei des Systems d[TGGGGT]₄/K (m.r.) zu verschiedenen Zeiten. Hierbei ist anzumerken, dass sich im Intervall von 200 - 220 ps (oben) neben dem Hoogsteen-Muster auch große Anteile des alternativen N7-H1-Musters trotz „restraints“ ausbilden, wohingegen der Zeitbereich von 800 - 820 ps (unten) fast vollständig durch das erstgenannte Muster bestimmt wird.⁶

In Analogie zu den Modellsystemen treten in Zeitbereichen mit signifikanten N7-H1-Anteilen einzelne verbrückende Wassermoleküle auf. Diese finden sich vorzugsweise im Bereich der NH₂-Gruppe und bilden Brücken zu O5*-Atomen benachbarter Stränge. Betrachtet man den unteren Teil der Abb. 9.12, so erkennt man eine größere Anzahl Wassermoleküle im Nahbereich der Quadruplexebene.

Auch dies Verhalten entspricht dem der d[GGGG]₄-Tetraplexe mit einem dominanten Hoogsteen-Muster. Die Wassermoleküle nehmen dabei jedoch keine eindeutigen, exponierten Positionen ein, im Gegensatz zu den vier verbrückenden H₂O-Molekülen, die im Fall des H7-H1-Musters beobachtet werden.

Betrachtet man demgegenüber das analoge System ohne verstärkte Wasserstoffbrückenbindungen (siehe Abb. 9.13), so erkennt man eine deutliche Unschärfe der DNA-Atompositionen besonders im Bereich der äußeren Guaninebenen.

Über den Zeitraum des im oberen Bereich dargestellten „scatterplots“ (200 - 220 ps) für die Ebene vier herrscht das N7-H1-Muster vor. An dieser Stelle lassen sich die o.g. vier verbrückenden Wassermoleküle ausmachen. Zusätzlich erkennt man im Bereich des interkalierten Kaliumions ein seitlich versetzt angeordnetes H₂O-Molekül, das bereits durch die „aufgelöste“ Ebene der endständigen Thyminbasen hindurchgewandert ist und das Kation zusätzlich koordiniert. Dieser Effekt wurde bereits bei den Modellsystemen diskutiert (vergleiche dazu Abb. 8.1).

⁶Aussagen hinsichtlich der Wasserstoffbrückenmuster wurden durch Auftragungen in Analogie zu Abb. 9.10 gemacht. Diese sind lediglich teilweise explizit in dieser Arbeit aufgeführt.

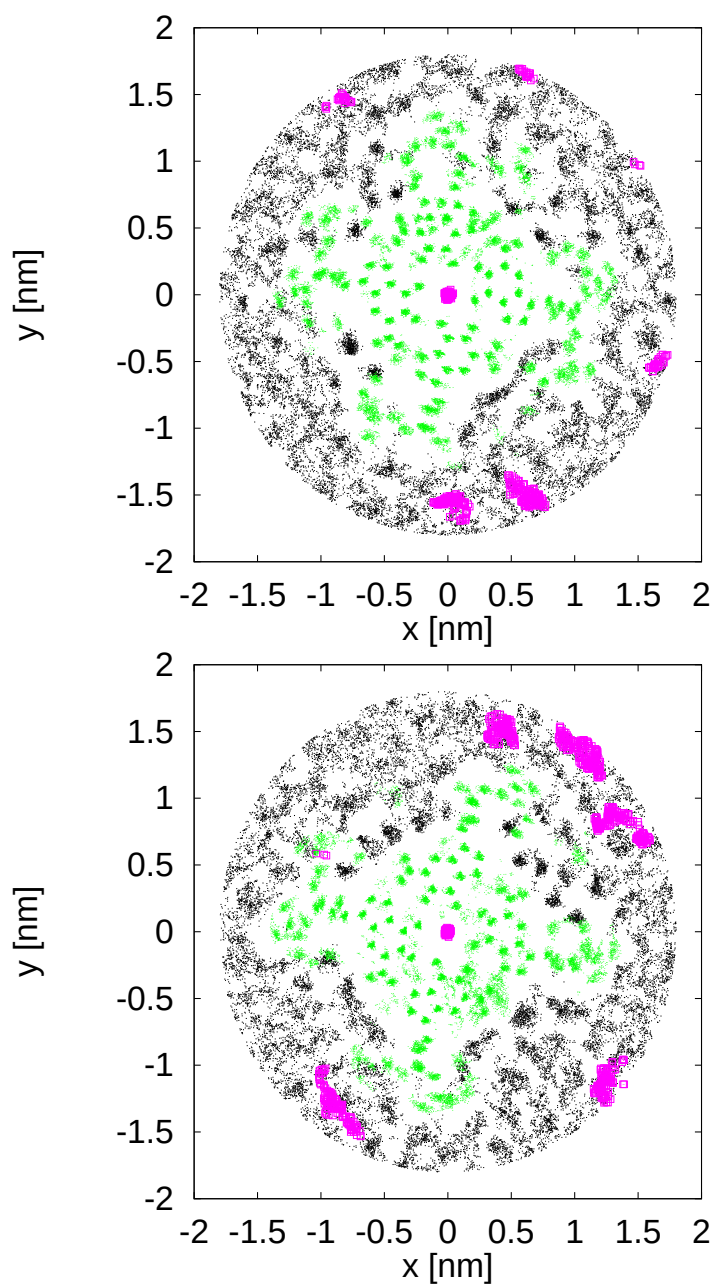


Abb. 9.12: „scatterplots“ für die Ebene zwei des Systems $d[TGGGGT]_4/K$ (m.r.) (oben: 200-220 ps, unten: 800-820 ps, 200 Konfigurationen, Schichtdicke 2,5 Å, DNA: grün, H₂O: schwarz, Ionen: pink)

Im unteren Teil der Abb. 9.13 ist die entsprechende Auftragung für die Ebene zwei dargestellt. Die Fluktuationen der inneren Guaninbasen sind hier wesentlich schwächer ausgeprägt, ein Verhalten, das dem der reinen Guaninsysteme entspricht.

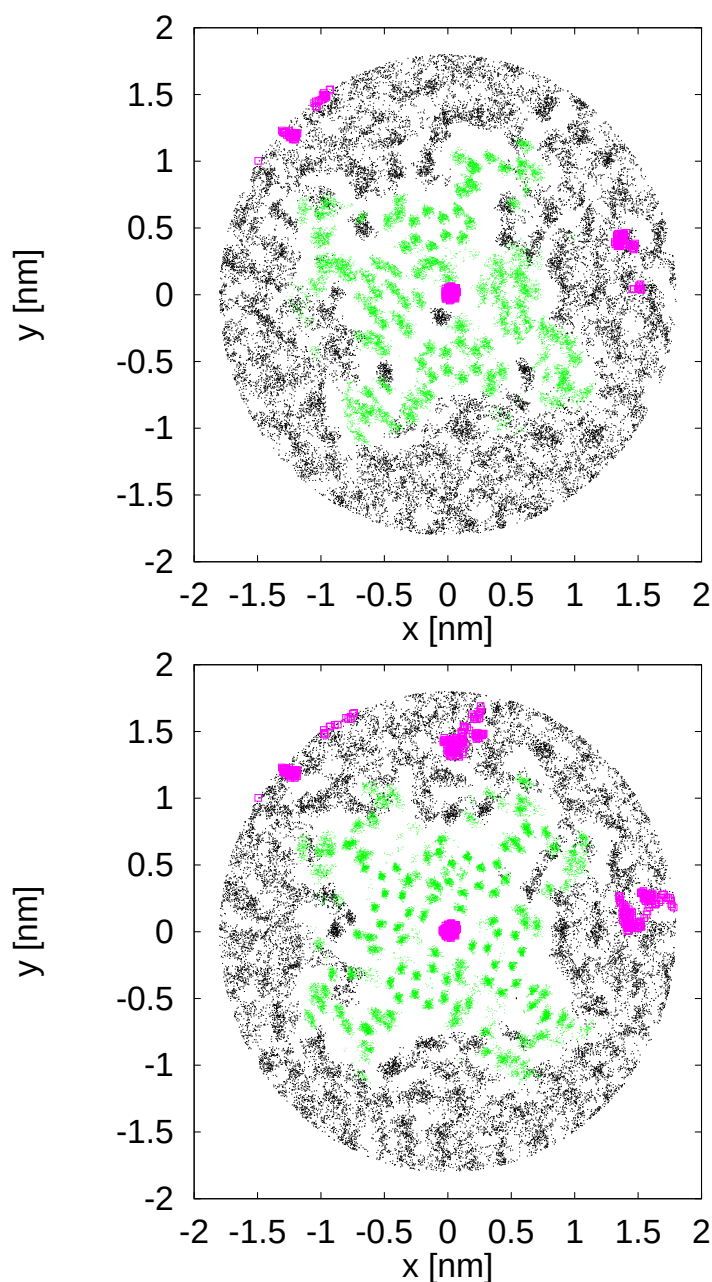


Abb. 9.13: „scatterplots“ für die Ebenen eins und zwei des Systems d[TG GGT]₄/K (o.r.) (oben: Ebene eins, unten: Ebene zwei, Zeitraum: 200-220 ps, 200 Konfigurationen, Schichtdicke 2,5 Å, DNA: grün, H₂O: schwarz, Ionen: pink)

Was sich bereits durch die Untersuchung der auf die Thyminbasen beschränkten rms-Werte abzeichnete, kann durch die Betrachtung eines „scatterplots“ des entsprechenden Volumenelementes bestätigt werden. Wie aus dem oberen Teil der Abb. 9.14 zu entnehmen ist, lassen sich bzgl. der Positionen der T-Basen keine geordneten Strukturen erkennen. Zahlreiche Wassermoleküle bevölkern die Bereiche

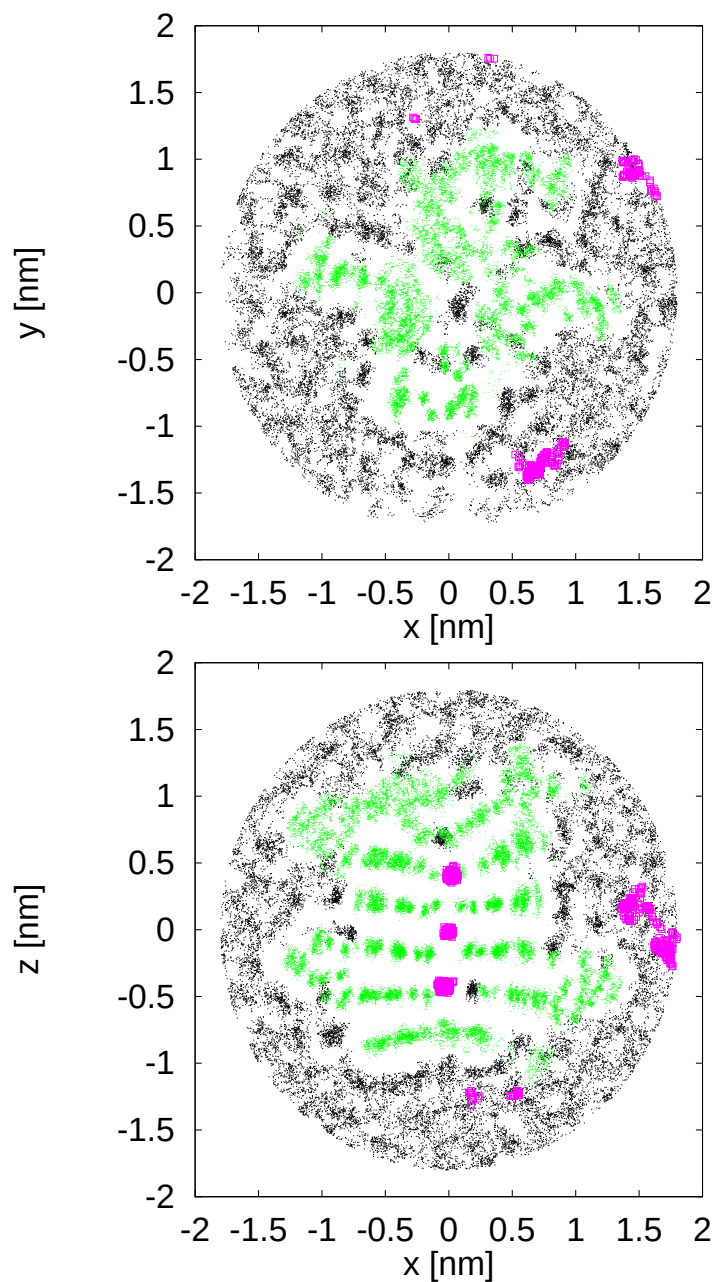


Abb. 9.14: „scatterplots“ für das 3'-Ende (xy) sowie entlang der helikalen Achse (xz) des Systems d[TGGGGT]₄/K (o.r.) (oben: 3'-Ende (xy) (840-860 ps), unten: Achsenschnitt (xz) (200-220 ps), 200 Konfigurationen, Schichtdicke 2,5 Å, DNA: grün, H₂O: schwarz, Ionen: pink)

zwischen benachbarten Basenpaaren. Zusätzlich sind Solvensteilchen zu beobachten, die sich entlang der helikalen Achse anordnen und so den Weg in den Quadru-
plexkanal finden.

Der untere Teil der Abbildung unterstützt durch eine xz-Darstellung entlang der Kanalachse die genaue Positionsbestimmung des bereits zuvor angesprochenen H₂O-Moleküls im Bereich der Ebene vier. Man erkennt, dass es neben dem Kation in die Ebene eingebettet ist. Gleichzeitig stellt dies eine Erklärung für die erhebliche Vergrößerung des O6-O6-Abstandes innerhalb dieser Tetramerebene dar (vergleiche dazu Tab. 9.3).

Wie bereits in Abschnitt 9.1.2 erwähnt wurde, weist das System d[TTGGGGTT]₄/K (o.r.) eine ausgeprägte Ionenfluktuation entlang des Quadruplexkanals auf (siehe dazu Abb. 9.6). Dabei bewegt sich ein Kation aus dem komplexierenden Guaninhohlraum hinaus und gleichzeitig wandert ein zweites in kurzer Distanz zu diesem in den freigewordenen Käfig hinein (Bereich der Ebene eins nach ca. 1000 ps). Diese elektrostatisch sehr anspruchsvolle Situation wird durch Wassermoleküle entspannt, die die abstoßenden interionischen Wechselwirkungen abschirmen, indem sie sich zwischen die geladenen Teilchen schieben.

Die Abb. 9.15 (oben) verdeutlicht dies durch die Darstellung der entsprechenden „scatterplots“. Der Nahbereich der Guaninebene eins wird durch Wassermoleküle besetzt, die sich bevorzugt an Positionen zwischen den Guaninbasen und dem „backbone“ aufhalten. Gleichzeitig erkennt man Häufungspunkte im nahen Umfeld der beiden Kationen.

Der untere Teil der Abb. 9.15 zeigt die Situation aus einer anderen Perspektive. Auch an dieser Stelle beobachtet man ein H₂O-Molekül, das sich in die Ebene eins einbettet. Am 5'-Ende koordiniert ein zusätzliches Solvensmolekül das Kaliumion im terminalen Guaninkäfig, in Analogie zu den Beobachtungen an den Modellsystemen.

Die konkrete Anordnung der Wassermoleküle um die DNA-Atome und Ionen im nahen Umfeld der Ebene eins nach 1000 ps verdeutlicht Abb. 9.16. Es lassen sich sechs Wassermoleküle lokalisieren, die um die Kationen positioniert sind und die oben beschriebene Abschirmung bewirken (Van-der-Waals-Darstellung). Zusätzlich sind die vier Solvensmoleküle eingezeichnet, die eine Verbindung zwischen den benachbarten Strängen herstellen.

Im Unterschied zu den Modellsystemen (vergleiche dazu Abb. 8.5 auf S. 152) findet an dieser Stelle für die räumlich stärker ausgedehnte Ebenenanordnung jedoch bevorzugt eine Verknüpfung ausgehend von dem H1-Atom über ein Wassermolekül hin zu den O5*- und O4*-Atomen des Rückgrats statt. Zusätzliche Festigkeit bekommt die Quadruplexanordnung durch Wasserstoffbrücken, die sich direkt zwischen der NH₂-Gruppe und den Phosphatsauerstoffatomen eines benachbarten Stranges ausbilden. Ausgedehnte Solvensnetzwerke, die hier punktiert dargestellt sind, um-

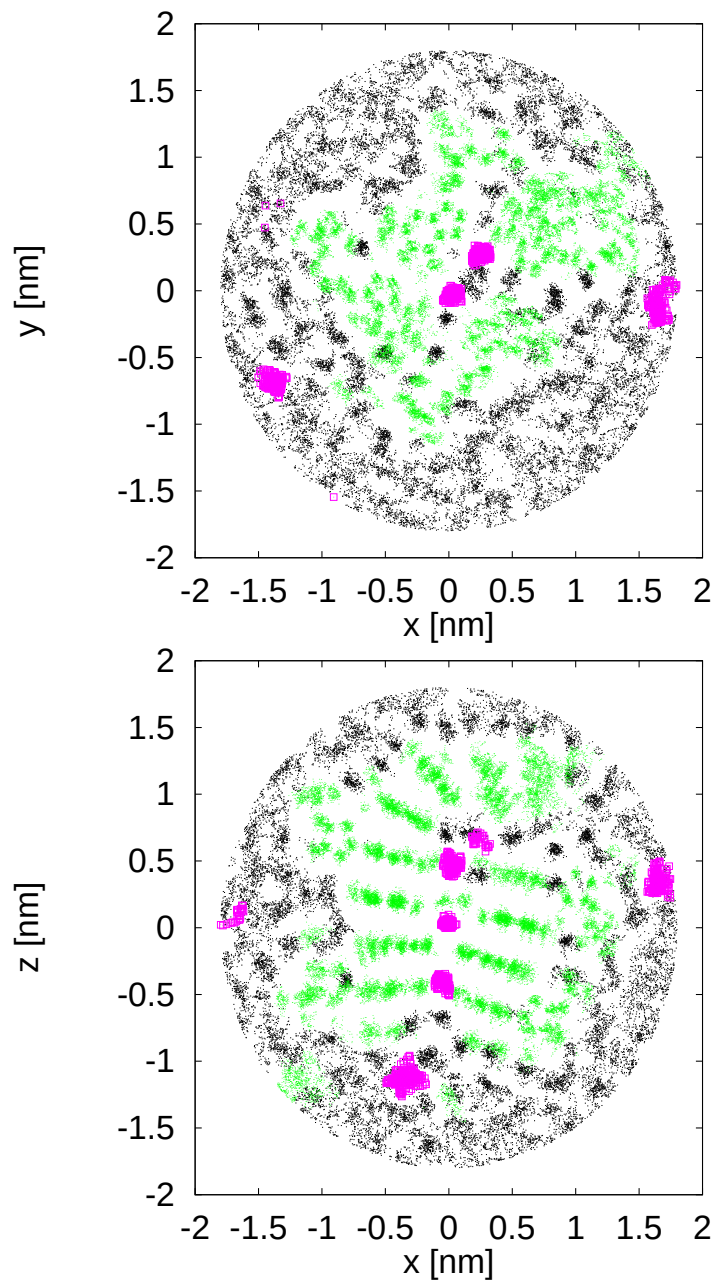


Abb. 9.15: „scatterplots“ für die Ebene eins (xy) sowie entlang der helikalen Achse (xz) des Systems d[TTGGGGTT]₄/K (o.r.) (oben: Ebene eins (xy) (1000-1040 ps), unten: Achsenschnitt (xz) (1000-1040 ps), 200 Konfigurationen, Schichtdicke 2,5 Å, DNA: grün, H₂O: schwarz, Ionen: pink)

spannen die Tetramereinheit und tragen so ebenfalls zu einer Stabilisierung der Gesamtanordnung bei.

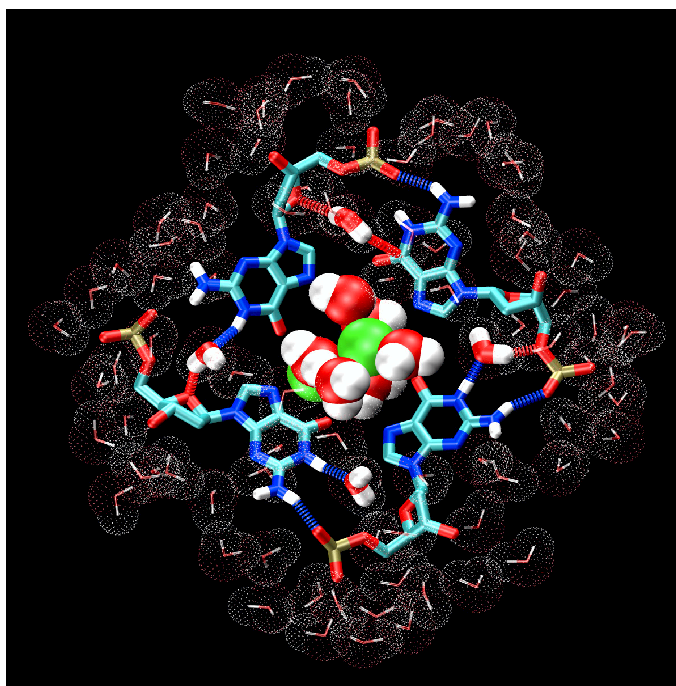


Abb. 9.16: Ebene eins des Systems $d[TTGGGGTT]_4/K$ (o.r.) nach 1000 ps

Wie bereits in Abschnitt 9.1.2 ausgeführt wurde, weisen die Tetraplexe mit erweiterten Basensequenzen, die ohne zusätzliche Potenzialverstärkungen simuliert wurden, eine hohe Dichte an Kaliumionen entlang des Quadruplexkanals auf. Dies steht im Gegensatz zu den Beobachtungen an den Modellsystemen. Ein Grund für dies Verhalten kann in einer teilweisen Blockierung des Austrittsweges an den Kanalenden durch Thyminbasen gesehen werden, die sich rasch aus der planaren Anordnung herausbewegen und in Richtung der interkalierten Ionen ausrichten. Diese Verdrillung beeinflusst offensichtlich die Ionenbewegung entlang des Quadruplexkanals in entscheidender Weise (siehe Abb. 9.17).

Wenn also die Ionen nicht so einfach den DNA-Verbund verlassen können, sollten sich spezielle Atomanordnungen im Bereich der Käfige spezifizieren lassen, die der elektrostatisch ungünstigen Nähe der interkalierten K^+ -Ionen entgegenwirken. In der Tat stellt man fest, dass sich die positiv geladenen Teilchen nicht exakt entlang der helikalen Achse anordnen, sondern versetzte Positionen einnehmen. Zusätzlich lagern sich Wassermoleküle in die Hohlräume ein, die Abschirmfunktionen erfüllen und als zusätzliche Koordinationsstellen fungieren. Die Reduzierung der abstoßenden Wechselwirkungen gleichartiger Ladungsträger erfolgt auf Kosten steigender sterischer Anforderungen, die entsprechend der oben beschriebenen Stabilisierungsmechanismen realisiert werden können.

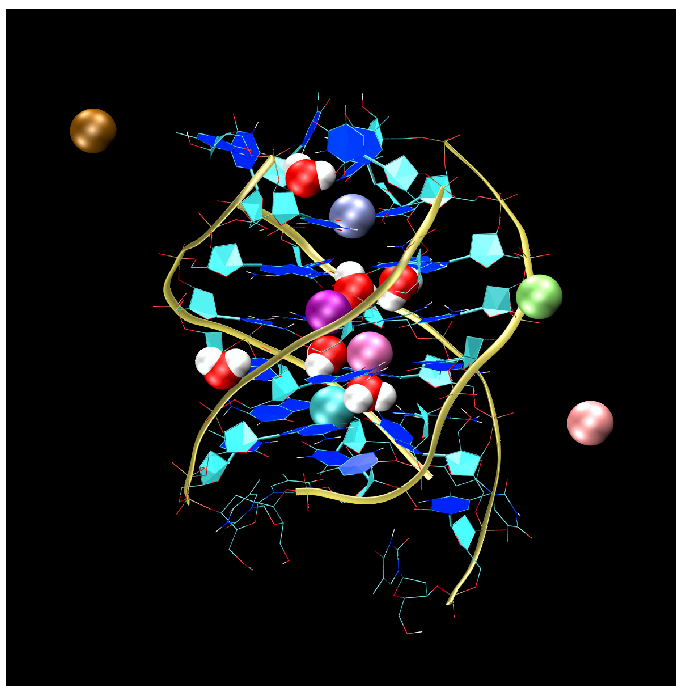


Abb. 9.17: Eingelagerte Wassermoleküle im System $d[TTGGGGTT]_4/K$ (o.r.) nach 2450 ps

Das Hineinwandern einzelner Wassermoleküle in den Quadruplexverband wird unterstützt durch die zeitweise Öffnung der Thyminenden („Tentakelmechanismus“). Abb. 9.18 (oben) zeigt die Van-der-Waals-Oberfläche des $d[TTGGGGTT]_4/K$ -Systems (o.r.) nach 1600 ps. Zu diesem Zeitpunkt nähert sich ein Kation aus dem „bulk“ dem geöffneten Kanalbereich des Tetraplexes (siehe dazu Abb. 9.6). Man erkennt an dieser Stelle sehr gut die „freiliegenden“ Ionen im Bereich der Ebene eins. Zusätzlich fungieren die Carbonylsauerstoffatome der Thymin- bzw. Guaninbasen als Anknüpfungspunkte für Solvensmoleküle. Diese können infolge der strukturellen DNA- und Ionenfluktuationen entlang der polarisierten Atompositionen in den Quadruplexkanal eindringen und sich entsprechend einlagern.

Demgegenüber verdeutlicht der untere Teil der Abb. 9.18 die Situation nach der „erfolgreichen“ Interkalation dieses Ions in den Tetraplex. Dabei lässt sich beobachten, dass die endständigen Thyminbasen den Kanalbereich verschließen und so das Eindringen weiterer Wassermoleküle bzw. Kationen verhindern, was zu einer wesentlich kompakteren Quadruplexstruktur führt.⁷

⁷Gleichzeitig veranschaulicht diese Abb. den bereits in Abschnitt 9.1.3 beschriebenen „Tentakelmechanismus“.

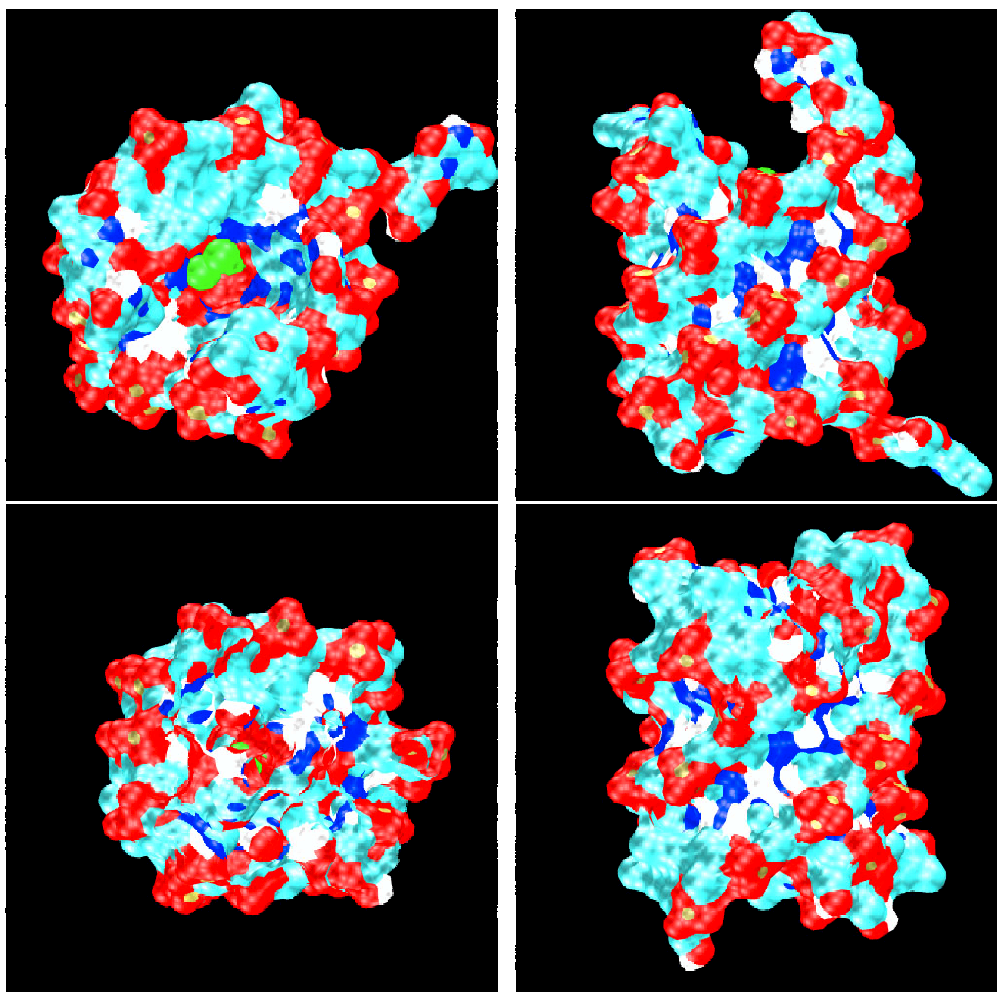


Abb. 9.18: Van-der-Waalssche Oberfläche des Systems $d[TTGGGGTT]_4/K$ (o.r.) nach 1600 ps (oben) bzw. nach 2250 ps (unten) (Kohlenstoff: mintgrün, Wasserstoff: weiß, Stickstoff: blau, Sauerstoff: rot, Phosphor: gold, Ionen: grün)

Weitere potenzielle Koordinationsstellen finden sich wie bei der Betrachtung der Modellsysteme im Bereich der Furchen. Abb. 9.19 ist zu entnehmen, dass sich gleichmäßige Furchenstrukturen vorwiegend im Bereich der Guaninebenen ausbilden. Die entsprechenden Thyminebenen fluktuieren sehr stark und winden sich zeitweilig auf. Daher sind geordnete Hydratstrukturen im Sinne einer „spine of hydration“ bevorzugt im Umfeld der G-Basen zu beobachten. Analog zu den $d[GGGG]_4$ -Systemen variiert die Gestalt dieser Hydratkette während der Simulation, was anhand der Betrachtung von Filmsequenzen festgestellt werden konnte. Die Thyminbasen werden ebenfalls hydratisiert. Es bilden sich dabei jedoch wesentlich breitere Netzwerkstrukturen zwischen benachbarten Strängen aus. Aufgrund

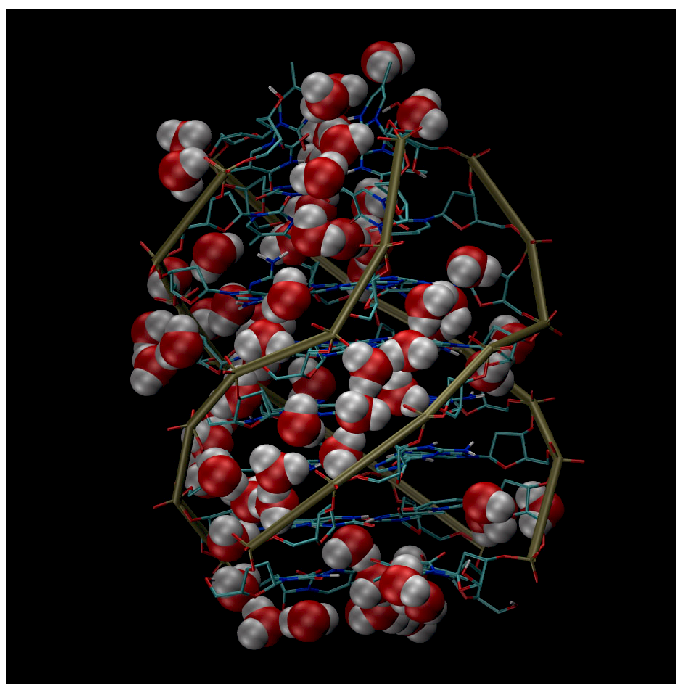


Abb. 9.19: „spine of hydration“ am Beispiel des Systems $d[TTGGGGTT]_4/K$ (o.r.), 5'-Ende unten

ihrer Ausdehnung tragen diese verbrückenden Zusammenschlüsse von Wassermolekülen nicht in dem Maße zu der Stabilisierung einer bestimmten DNA-Konformation bei, wie dies im Fall der Modellsysteme zu beobachten war.

9.4.2 Residenzzeiten von Solvensmolekülen an exponierten Systempositionen

Nach diesen eher qualitativen Untersuchungen der Hydratisierung werden im Folgenden quantitative Aspekte im Vordergrund stehen (vergleiche dazu Kapitel 8.2). Speziell die Ausdehnung der Hydrathüllen mit den zugehörigen Besetzungszahlen sowie die Verweildauern an „besonderen“ Atompositionen bilden dabei Untersuchungsschwerpunkte.

Die Projektionen der Wassermoleküle in eine Ebene senkrecht zur helikalen Achse können den Abb. A.36 und A.37 in Anhang A.7.4 auf S. 267 entnommen werden. Für die Systeme ohne „restraints“ sind ausgeprägte Häufungspunkte im Bereich der Furchen zu erkennen. Nähert man sich dem Zentrum, so reduziert sich entsprechend die Wasserdichte. Dabei sollte beachtet werden, dass für das System $d[TTGGGGTT]_4/K$ in geringem Abstand zur Kanalachse eine gegenüber dem

kürzeren Assoziat erhöhte Projektionsdichte auftritt, in Übereinstimmung mit der Beobachtung interkalierter Solvensteilchen im Kanalbereich. Die Ausdehnung der zylindrischen Hydrathülle um den Quadruplex mit zwei endständigen Thyminbasen ist dabei gegenüber dem kürzeren Analogen erhöht.

Tab. A.11 auf S. 268 zeigt die Hydratationsradien der $d[TGGGGT]_4/K$ -Systeme, die sich durch die Auswertung der radialen Verteilungsfunktionen ergeben. Auf die explizite Darstellung dieser Funktionen kann an dieser Stelle verzichtet werden, da sie sich in ihrer Form nur geringfügig von denen der Modellsysteme unterscheiden. Hinsichtlich des räumlichen Ausmaßes der Solvenshüllen um äquivalente Atompositionen herum lassen sich im Vergleich der beiden kaum Unterschiede ausmachen. Lediglich die Ausdehnungen um die Ionen am 3'-Ende sowie um die O4*-Atome der Pentose im Bereich der Guaninbasen zeigen geringfügige Differenzen. Ebenso variieren die Furchenmaße, bedingt durch die individuelle Form der Gesamtstruktur, in leichtem Umfang. Die Werte bewegen sich dabei im Bereich derer der Modellsysteme.

Zusätzlich wird an dieser Stelle eine Unterscheidung zwischen gleichartigen Atomen unterschiedlicher Basensorten vorgenommen. Hinsichtlich der Hydratationsradien lassen sich dabei keine Unterschiede feststellen. Ebenso verläuft die Besetzung dieser Solvenshüllen mit Wassermolekülen nahezu gleichwertig.⁸

Die entsprechenden Werte für die Systeme $d[TTGGGGTT]_4/K$ (Tab. A.12 auf S. 269) bewegen sich, bis auf eine ausgedehntere Solvathülle um die Phosphoratome, in der Größenordnung der zuvor beschriebenen Tetraplexe. Insbesondere sind die Besetzungszahlen der Hydrathüllen gleicher Größe nahezu identisch.

Mit Hilfe der Hydratationsradien werden die Residenzzeitverteilungen errechnet, aus denen sich durch eine Anpassung die Verweildauern in den entsprechenden Volumenelementen bestimmen lassen (siehe dazu Gl. 8.3). Tab. 9.7 beinhaltet die auf diese Weise bestimmten Residenzzeiten.

Auch an dieser Stelle können deutlich erhöhte Verweildauern der Wassermoleküle an den Enden der außen liegenden Guaninebenen festgestellt werden. Im direkten Vergleich residieren dabei die Solvensteilchen am 5'-Ende länger als am entsprechenden 3'-Ende. Eine Erklärung für dies Verhalten kann in der unterschiedlichen Anordnung der Thyminbasen an den jeweiligen Enden gefunden werden (vergleiche dazu Abb. 9.7 sowie Abb. A.33). Das 5'-Ende erscheint wesentlich kompakter und

⁸Geringe Differenzen in den Besetzungszahlen resultieren dabei hauptsächlich aus der unterschiedlich stark ausgeprägten Neigung zur Einlagerung von H_2O -Molekülen in die Tetramerhohlräume.

	d[TGGGGT] ₄ /K		d[TTGGGGTT] ₄ /K	
	(o.r.)	(m.r.)	(o.r.)	(m.r.)
Bereich	τ_r [ps]	τ_r [ps]	τ_r [ps]	τ_r [ps]
Ion 3'-Ende	143,09±1,73	290,40±12,62	238,52±5,76	35,60±0,80
Ion 5'-Ende	323,86±60,40	465,41±19,30	568,26±4,67	506,04±9,25
„bulk“-Ionen	13,88±1,11	14,10±1,13	16,49±1,20	16,27±1,21
N2	109,13±2,96	133,23±2,28	231,08±4,45	139,41±2,26
O4* _{Gua}	65,33±2,44	74,56±2,62	151,73±3,53	79,89±1,96
O4* _{Thy}	18,02±0,68	14,56±0,58	39,30±1,15	38,04±1,09
P _{Gua}	63,28±3,63	71,01±3,99	128,08±5,10	117,10±5,14
P _{Thy}	24,97±0,94	26,29±0,94	67,15±3,54	64,52±3,58
Furchen _{ges}	119,15±3,69	131,31±2,59	210,10±5,21	109,92±1,61
Furchen _{Gua}	110,47±3,33	132,10±2,36	193,10±3,91	146,65±2,85

Tabelle 9.7: Residenzzeiten der DNA-Systeme mit erweiterten Basensträngen inkl. zugehöriger Fehler in der Anpassung

„geschlossener“. Damit verbunden ist ein eingeschränktes Wanderungsverhalten der Solvensmoleküle, die das Verlassen der Solvathülle zusätzlich erschweren. Betrachtet man die Residenzzeiten um ausgewählte DNA-Atome herum, so ergeben sich deutliche Unterschiede im Vergleich der simulierten Systeme, die auf die individuelle Ausbildung der strukturellen Umgebung zurückgeführt werden können (Wasserstoffbrückenmuster, Ebenenabstände, helikale Winkel im Bereich des „backbones“). Vergleiche innerhalb eines Systems lassen zusätzlich eine Verschiedenheit im Aufenthaltsverhalten um analoge Atome innerhalb differenter Basenbereiche erkennen. Dabei sind die den Thymineinheiten zugehörigen Positionen gekennzeichnet durch eine reduzierte Verweildauer der Wassermoleküle in der entsprechenden Hydratsphäre.⁹ Die untersuchten Furchenbereiche weisen ebenfalls erhöhte Residenzzeiten auf, die gegenüber den Modelluntersuchungen zum Teil deutliche Steigerungen aufweisen.

⁹Die Zuordnung der Phosphoratome bezieht sich dabei auf ihre Position hinsichtlich der nächsten Basensorte.

Abschließende Bemerkungen zur Bedeutung der Hydratisierung von Tetraplexen

Wie in diesem Abschnitt gezeigt werden konnte, trägt die Solvenshülle der Quadruplexe mit erweiterten Basensequenzen in entscheidendem Maße zur Gesamtstabilisierung der einzelnen Systeme bei. Entsprechend der konformativen Anordnung der Guaninbasen beobachtet man Wassermoleküle, die als Brücke zwischen benachbarten Strängen fungieren. Zusätzlich bilden sich zeitlich rasch veränderliche, komplexe Wasserketten aus, die die Tetramereinheiten umspannen. Auch für den Fall verlängerter Stränge werden Solvensmoleküle beobachtet, die als zusätzliche Koordinationsstelle für die eingelagerten Kationen dienen. Sie sind in Analogie zu den Modellsystemen an den Enden des Guaninbereiches des Quadruplexes zu finden.

Elektrostatisch anspruchsvolle Zustände, bedingt durch hohe Ladungsdichten innerhalb des Quadruplexkanals, die durch die Besetzung aller Guaninkäfige mit Kaliumionen hervorgerufen werden, können durch die Einlagerung von Wassermolekülen in die Kationenzwischenräume reduziert werden. Die dadurch hervorgerufene Ausdehnung der Hohlräume führt zu bislang nicht beobachteten direkten Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den NH_2 -Gruppen und den Sauerstoffatomen der Phosphatgruppe.

Innerhalb der DNA-Furchen lässt sich in Analogie zu den Ergebnissen der Modellstudie eine „spine of hydration“ erkennen, die im Bereich der Guaninbasen eine regelmäßige Anordnung aufweist. Die Ausdehnungen der Hydratsphären um äquivalente Atompositionen innerhalb der verschiedenen Quadruplexe schwanken lediglich in geringem Maße, bedingt durch systemspezifische geometrische Unterschiede. Die Besetzungszahlen weisen dabei ein hohes Maß an Gleichförmigkeit auf. Deutliche Unterschiede lassen sich demgegenüber hinsichtlich der zugehörigen Residenzzeiten beobachten. So stellt man fest, dass die Verweilzeiten im Bereich der Thyminbasen gegenüber den analogen Guaninpositionen drastisch reduziert sind. Gleichzeitig weisen die Systeme ohne „restraints“ signifikante Differenzen auf (τ_r an äquivalenten Positionen: $d[\text{TTGGGGTT}]_4/\text{K} > d[\text{TGGGGT}]_4/\text{K}$).

9.5 Translationsdiffusion

Die Untersuchung des translatorischen Diffusionsverhaltens von Quadruplexen bietet die Möglichkeit, die Ergebnisse einer Molekulardynamischen Simulation mit experimentell zugänglichen Daten z.B. aus Streulichtuntersuchungen zu vergleichen. Bei einer solchen Analyse spielt die zugrunde liegende Statistik eine entscheidende Rolle. Da die Translationsbewegung von Makromolekülen in wässriger Lösung

gegenüber der des reinen Lösungsmittels deutlich langsamer abläuft, bedarf es einer langen Simulationsdauer, um diese Bewegungsform adäquat beschreiben zu können. Aufgrund der eingeschränkten Rechenleistung ist die Anzahl der zentralen Polymermoleküle meist auf eins beschränkt, daher entfällt an dieser Stelle die Möglichkeit, über eine große Anzahl von Teilsystemen zu mitteln.

Dies lässt sich ausgleichen durch eine ausgedehnte Simulationszeit. Dementsprechend eignen sich die in dieser Arbeit untersuchten Systeme mit erweiterten Basensträngen zur Analyse des Diffusionsverhaltens.

In der Literatur werden verschiedene Wege zur Bestimmung des Translationsdiffusionskoeffizienten beschrieben [6]. Neben der Berechnung mit Hilfe der Geschwindigkeitsautokorrelationsfunktion¹⁰, besteht die Möglichkeit, basierend auf der Einstein-Beziehung eine äquivalente Berechnung durchzuführen. Dem letztgenannten Ansatz ist dabei aufgrund der formal besseren Statistik der Vorzug zu geben. Die Grundlage bildet die Beobachtung des Quadruplexmassezentrums, dessen mittlere quadratische Verschiebung über verschiedene Zeitintervalle berechnet wird.

$$6D_T t = \lim_{t \rightarrow \infty} \langle |\mathbf{r}(t) - \mathbf{r}(0)|^2 \rangle \quad (9.1)$$

Die Auftragung von $\langle |\mathbf{r}(t) - \mathbf{r}(0)|^2 \rangle$ gegen die Zeit t liefert idealtypisch eine Gerade mit der Steigung $6D_T$. Der auf diese Weise mit Hilfe einer linearen Anpassung bestimmte Translationsdiffusionskoeffizient D_T kann unter der Annahme eines Temperaturverhaltens nach STOKES-EINSTEIN auf die dem Experiment zugrunde liegende Temperatur umgerechnet werden. Die Viskosität ϱ des Lösungsmittels wird Tabellenwerken entnommen [119].

$$D_T(T_{exp}) = D_T(T_{sim}) \cdot \frac{T_{exp}}{T_{sim}} \cdot \frac{\varrho_{H_2O}(T_{exp})}{\varrho_{H_2O}(T_{sim})} \quad (9.2)$$

Abb. 9.20 stellt die zeitliche Entwicklung der mittleren quadratischen Verschiebung für das System d[TTGGGGTT]₄ (o.r.) dar.¹¹

Gemeinsam mit den analogen Auftragungen für die verbleibenden drei Simulationssysteme ergeben sich die in Tab. 9.8 dargestellten Translationsdiffusionskoeffizienten.

¹⁰Dieser Weg setzt eine wesentlich längere Simulationzeit voraus, da die Funktion lediglich leicht abfällt und dementsprechend über einen langen Zeitraum integriert werden muss.

¹¹Um der Anpassung eine möglichst gute Statistik zugrunde zu legen, werden lediglich Zeitintervalle bis zu einer maximalen Größe des zehnten Teils der Gesamtsimulationsdauer berücksichtigt

¹²Es existieren in der Literatur leicht differierende Werte in Abhängigkeit von der DNA-Konzentration. So findet man in [15] einen Wert von $D_{T-exp}(293K) = 1,46 \cdot 10^{-6} cm^2 s^{-1}$.

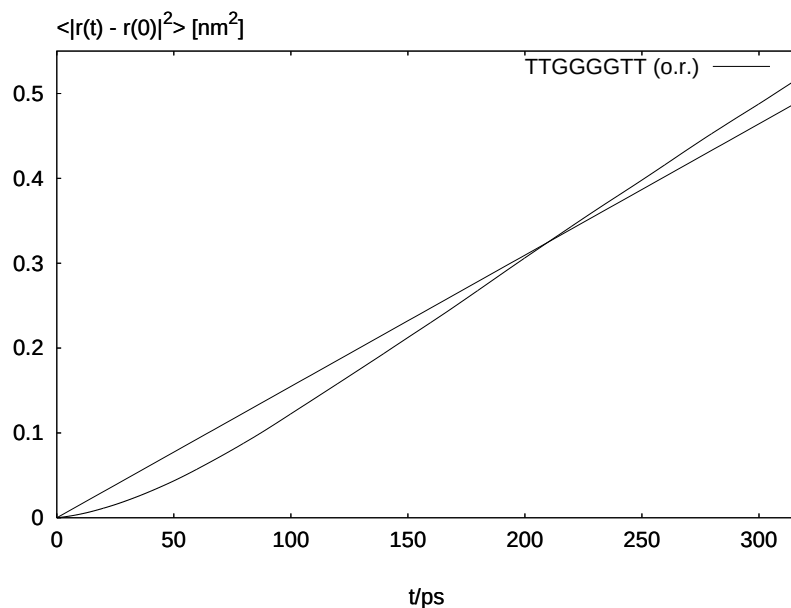


Abb. 9.20: Mittlere quadratische Verschiebung für das System d[TTGGGGTT]₄/K (o.r.)

System	$D_{T-sim}(304K)$ [$10^{-6}cm^2s^{-1}$]	$D_{T-sim}(293K)$ [$10^{-6}cm^2s^{-1}$]	$D_{T-exp}(293K)$ [$10^{-6}cm^2s^{-1}$]
d[TTGGGGTT] ₄ /K (o.r.)	2,58	1,90	1,34 ¹² [113]
d[TTGGGGTT] ₄ /K (m.r.)	2,05	1,51	1,34 [113]
d[TGGGGT] ₄ /K (o.r.)	1,73	1,28	0,80 [128]
d[TGGGGT] ₄ /K (m.r.)	1,42	1,05	0,80 [128]

Tabelle 9.8: Vergleich der durch eine MD-Simulation bestimmten Translationsdiffusionskoeffizienten mit experimentellen Daten für die Systeme mit erweiterten DNA-Sequenzen

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass tendenzielle Unterschiede zwischen den in der Größe verschiedenen Tetraplexen korrekt wiedergegeben werden und sich qualitativ eine gute Übereinstimmung mit dem Experiment zeigt.

Der direkte Vergleich zwischen simulierten und spektroskopisch bestimmten Werten ergibt, dass die Translationsbewegung der DNA innerhalb der Simulation etwas zu schnell dargestellt wird. Besonders die Systeme ohne „restraints“ weisen dies

Verhalten auf, wohingegen die entsprechenden Simulationen mit verstärkten Wasserstoffbrückenbindungen Werte ergeben, die näher im Bereich des Experimentes liegen.

Trotz der nicht unerheblichen Abweichungen, stellt die computergestützte Simulation ein geeignetes Mittel zur Untersuchung des Translationsverhaltens von Quadruplexen dar. Insbesondere die Wechselwirkungen der Solvensmoleküle untereinander, bestimmt durch das hier verwendete SPC/E-Modell, erscheinen realistisch. Das durch die Bewegung des Biopolymers hervorgerufene Aufbrechen von H-Brücken zwischen den Solvensteilchen ist dabei maßgeblich für die Geschwindigkeit der Bewegung des diffundierenden Assoziats verantwortlich.

Kapitel 10

Quadruplex RNA - das System $r[\text{UGGGGU}]_4/\text{K}$

Seit langem ist bekannt, dass Nukleinsäuren eine wichtige Rolle als Speichermedium genetischer Informationen sowie bei der Proteinsynthese spielen [110].

Die Gene eukaryotischer Organismen bestehen aus DNA, wohingegen sie in Viren auch aus RNA aufgebaut sein können. Zwischen diesen beiden Typen von Nukleinsäuren ergeben sich zwei grundlegende Unterschiede. Zum einen besteht die Zuckereinheit der RNA aus Ribose, die der DNA dagegen aus der desoxylierten Form. Diese in der RNA zusätzlich auftretende Hydroxylgruppe befindet sich an der 2'-Position der Pentose. Zum anderen treten in DNA-Strängen neben den Purinbasen Adenin und Guanin bevorzugt die Pyrimidinbasen Cytosin und Thymin auf, wohingegen in den entsprechenden RNA-Strukturen Thymin gegen Uracil ausgetauscht wird. Die beiden unterscheiden sich lediglich durch eine zusätzliche Methylgruppe im Fall der T-Base.

Wie bereits in den zurückliegenden Kapiteln gezeigt werden konnte, bilden guaninreiche DNA-Sequenzen zusammen mit Kationen stabile Quadruplexstrukturen. Diese Form der Anordnung spielt offensichtlich auch innerhalb der biologischen Funktion guaninreicher RNA-Fragmente eine wichtige Rolle, insbesondere als Substrat für Proteine [87] sowie als „target“ für spezielle Enzyme [9].

Im Folgenden wird daher exemplarisch für die Gruppe der RNA-Quadruplexe das System $r[\text{UGGGGU}]_4/\text{K}$ eingehender untersucht.¹ Insbesondere die Stabilität und Dynamik der Gesamtstruktur sowie die Wechselwirkungen mit der umgebenden Solvathülle werden hinsichtlich der gegenüber vergleichbaren DNA-Tetraplexen auftretenden Unterschiede diskutiert.

¹Die Simulation erfolgte ohne zusätzliche Verstärkungen („restraints“) der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Guaninbasen einer Tetramereinheit.

10.1 Stabilität und Ionenwanderungsverhalten

In Analogie zur Vorgehensweise bei den DNA-Systemen werden die rms-Abweichungen verschiedener Molekülkomponenten untersucht, um Aussagen hinsichtlich der Gesamtstabilität des Quadruplexes sowie individueller Tetramereinheiten treffen zu können.

Eine dezidierte Betrachtung des Gesamtmoleküls im Vergleich zu einzelnen Untereinheiten kann aus Abb. 10.1 erfolgen.

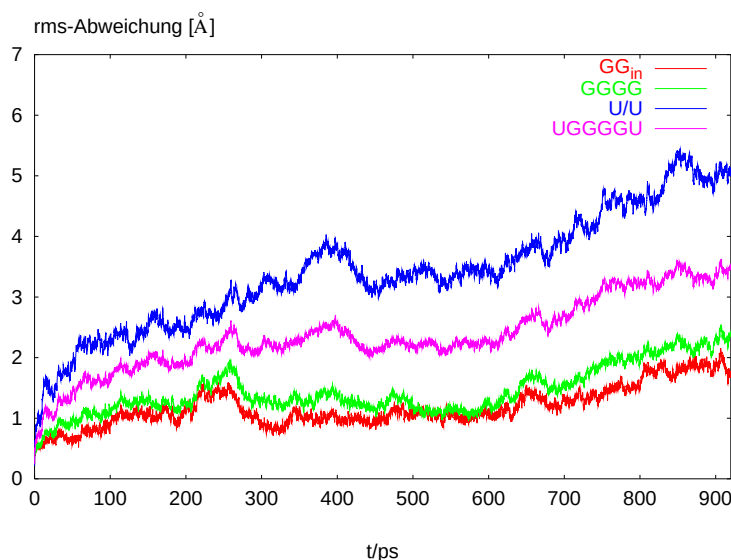


Abb. 10.1: rms-Abweichungen für das System $r[UGGGGU]_4/K$

Dabei erkennt man, dass die rms-Werte des Gesamtmoleküls bis ca. 700 ps kontinuierlich bis auf ca. 3,4 Å ansteigen. Analog zu den Beobachtungen bei den DNA-Quadruplexen sind dafür jedoch die Fluktuationen im Bereich der Pyrimidinbasen verantwortlich, während die weiter innen befindlichen Guaninbasen weitaus geringere rms-Werte aufweisen und lediglich bis auf ca. 2,4 Å anwachsen.

Der Verlauf der Guanin-Fluktuationen wird dabei geprägt durch das Besetzungsmuster, das die interkalierten Kationen ausbilden. So lässt sich z.B. die Reduzierung der rms-Werte der G-Basen (nach ca. 270 ps) auf das Hineinwandern eines Kaliumions in den Hohlraum zwischen den Tetramerebenen drei und vier zurückführen (siehe dazu Abb. 10.2), wohingegen der signifikante Anstieg, der nach ca. 650 ps beginnt, auf den Bewegungen des Kations im mittleren Guaninkäfig beruht, die zu ausgeprägten Konformationsänderungen der Tetraplexstruktur führen.

Die Mittelwerte der rms-Abweichungen können Tab. 10.1 entnommen werden. Im Vergleich zu dem entsprechenden DNA-System $d[TGGGGT]_4/K$ (o.r.) ergeben sich

deutlich reduzierte Fluktuationen sowohl im Bereich der Guanin- als auch der endständigen Basen (vergleiche dazu Tab. 9.1). Besonders die innen liegenden Purineinheiten des RNA-Tetraplexes zeichnen sich durch eine hohe Stabilität aus. Ihr Fluktuationsverhalten entspricht eher dem des analogen DNA-Quadruplexes, der durch verstärkte Wasserstoffbrückenbindungen eine bevorzugte Konformation ausbildet.

$\langle rms \rangle_t$ [Å]	Guanin _{in}	Guanin	Uracil	alle Atome
r[UGGGGU] ₄ /K (o.r.)	1,18±0,33	1,44±0,40	3,40±0,94	2,2,36± 0,59

Tabelle 10.1: Mittlere rms-Werte mit Standardabweichungen für das System r[UGGGGU]₄/K

Wie in Kapitel 9 gezeigt werden konnte, spielt das Verhalten der interkalierenden Ionen dabei eine maßgebliche Rolle.

Das System r[UGGGGU]₄/K weist ein ausgeprägtes Ionenwanderungsverhalten auf (siehe Abb. 10.2).

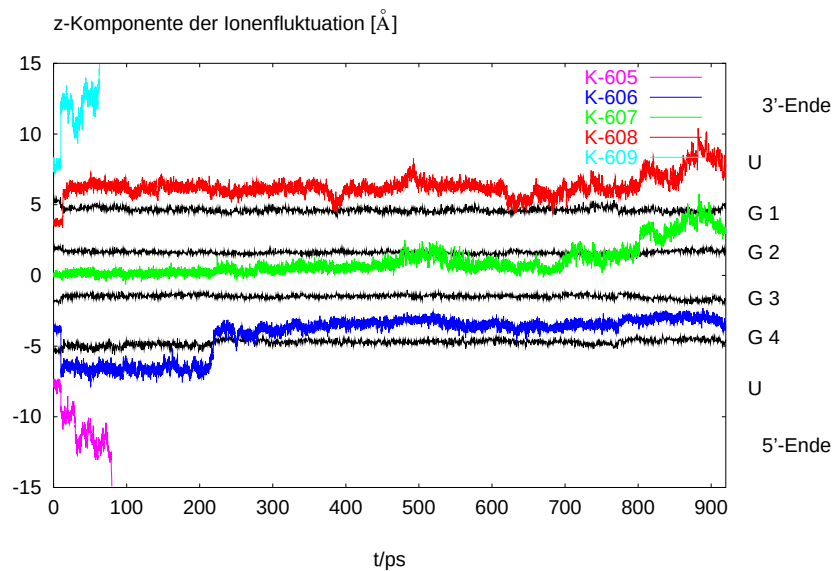


Abb. 10.2: Kationenbewegung entlang der helikalen Achse für das System r[UGGGGU]₄/K

Bereits nach wenigen Picosekunden verlassen die Kationen an den Enden des Quadruplexes den Nahbereich der Pyrimidinbasen. Die freigewordenen Hohlräume werden direkt im Anschluss an diesen Vorgang durch Kaliumionen besetzt, die die äußeren Guaninkäfige in Richtung der Enden verlassen und so die interionischen Abstoßungseffekte reduzieren. Das Kation am 3'-Ende behält diese Position während der restlichen Simulationszeit bei, wohingegen das Ion am 5'-Ende nach ca. 210 ps erneut in den durch die Purinbasen aufgespannten Hohlraum eintritt. Daraus resultiert eine sehr ungewöhnliche Anordnung der interkalierten Kationen (Besetzung des mittleren sowie des äußeren (5'-Ende) Guaninkäfigs), die offensichtlich durch die wirksame Koordination eines Kaliumions im Bereich der Uracil-Basen am 3'-Ende unterstützt wird. Erst durch eine Ausweichbewegung des Ions im mittleren Käfig (verbunden mit einer Distanzerhöhung des terminalen Kations (U-Bereich) zum Tetraplex) in Richtung des 3'-Endes kommt es nach ca. 750 ps zur Ausbildung eines Besetzungsmusters der Guaninhohlräume, das bereits bei den Modellsystemen bevorzugt zu beobachten war.

Insgesamt zeigt die Untersuchung der Kationenbewegung entlang der helikale Achse des Tetraplexes über weite Zeiträume der Simulation jedoch deutliche Unterschiede zu den d[GGGG]₄-Systemen. Insbesondere beeinflusst die Möglichkeit der endständigen Uracil-Basen (3'-Ende) zur effektiven Koordination von K⁺-Ionen die Anordnung der innen liegenden Kationen.

Die Strukturen zu Beginn und zum Ende der Simulationsphase des Systems r[UGGGGU]₄/K sind in Abb. 10.3 dargestellt. Im Vergleich zu der entsprechenden Darstellung der Startstruktur des d[TGGGT]₄/K (vergleiche dazu Abb. A.33 auf S. 264) sind deutliche Unterschiede besonders im Bereich des „backbones“ auszumachen.

Die Form des DNA-Rückgrats weist dabei eine eher „kreisförmige“ Struktur auf, wohingegen die der RNA „quadratisch“ erscheint, in Übereinstimmung mit Röntgenstrukturuntersuchungen an einem r[UGGGG]₄-System [22]. Die Differenzen in der Konformation des „backbones“ können dabei offensichtlich auf die zusätzlichen sterischen Anforderungen durch die Existenz der Hydroxylgruppe zurückgeführt werden.

Betrachtet man den Tetraplex nach einer Simulationsdauer von 920 ps, so lassen sich teilweise Aufwindungstendenzen² erkennen, die der experimentell zu beobachtenden hohen Stabilität entgegenstehen. In der Röntgenstruktur ließen sich Unterschiede in der Ausbildung von Tetramerebenen durch Uracilbasen in Abhängigkeit vom

²Diese beschränken sich weitestgehend auf den Bereich der Uracilbasen. Die Guaninebenen bleiben intakt.

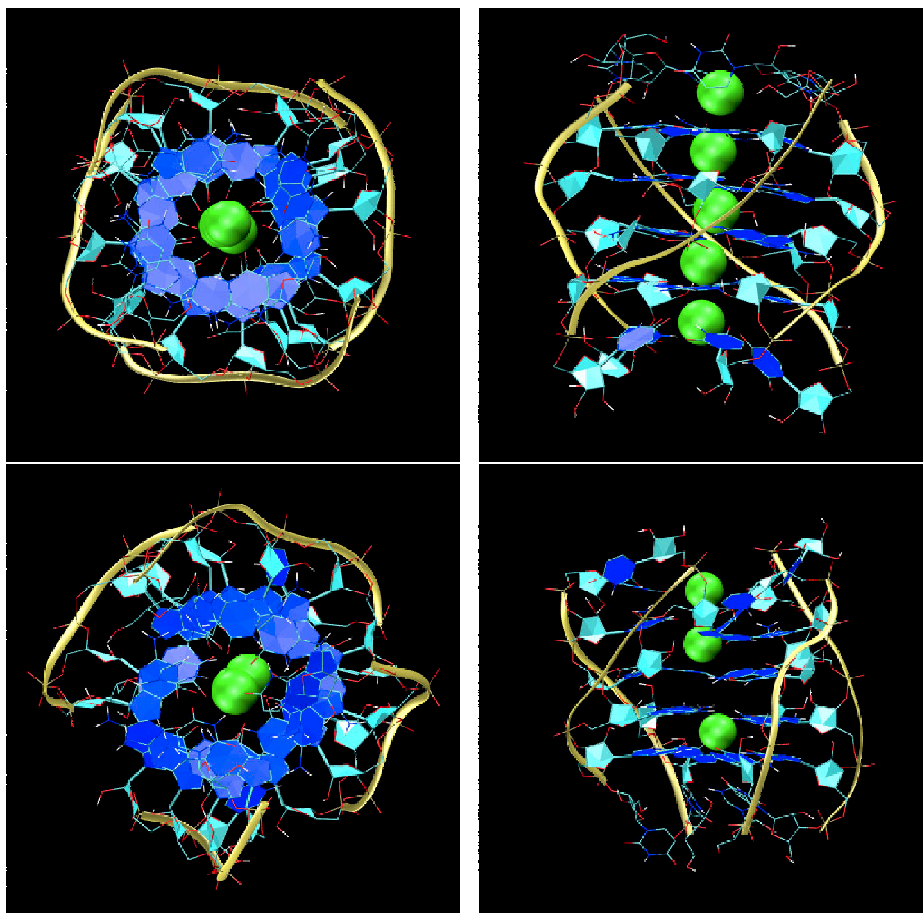


Abb. 10.3: Startstruktur (oben) und Folgestruktur (unten) nach 920 ps für das System r[UGGGGU]₄/K (Aufsicht und Seitenansicht, 5'-Ende: unten)

Strangende beobachten. Dies kann durch die MD-Simulation bestätigt werden, die ebenfalls für die am 3'-Ende angesiedelten Pyrimidinbasen die Möglichkeit der Komplexierung eines Kations anzeigt, wohingegen die U-Einheiten am 5'-Ende nicht zur Einlagerung von K⁺-Ionen neigen.

10.2 Geometrische Größen

Wie bereits bei der Betrachtung der Startstruktur deutlich wurde, treten infolge der veränderten terminalen Basensorte sowie der zusätzlichen OH-Gruppen der Pentosen strukturelle Veränderungen innerhalb des Quadruplexes auf. Die Auswirkungen auf die Ausdehnungen der komplexierenden Hohlräume sowie auf die „äußere“ Geometrie sind daher Gegenstand der folgenden Diskussion.

Die zeitlichen Veränderungen der Ebenenabstände verhalten sich analog zu den Beobachtungen, die bereits bei den Modellsystemen hinsichtlich der besetzten und unbesetzten Käfige gemacht wurden. Die Tab. 10.2 beinhaltet die Mittelwerte der Ebenenabstände mit den zugehörigen Standardabweichungen.

$r[\text{UGGGGU}]_4/\text{K}$	1 - 2	2 - 3	3 - 4
Zeitbereich [ps]	○ 50 - 500	● 50 - 500	● 220 - 650
$\langle \text{Ebenenabstand} \rangle_t$ [Å]	$3,10 \pm 0,18$	$3,04 \pm 0,16$	$3,25 \pm 0,18$

Tabelle 10.2: Mittlere Ebenenabstände mit Standardabweichungen innerhalb des Systems $r[\text{UGGGGU}]_4/\text{K}$ (● besetzt, ○ unbesetzt)

Überraschenderweise nehmen die Ebenenabstände unbesetzter (1-2) und besetzter (2 -3) Hohlräume nahezu identische Werte an, ein Verhalten das zunächst im Widerspruch zu den Beobachtungen an den Modellquadruplexen steht. Eine genaue Betrachtung zeigt jedoch, dass an dieser Stelle insbesondere Kationen, die in direkter Nachbarschaft zum untersuchten Käfig koordiniert sind, ebenfalls die Distanzen entfernter Tetramerebenen beeinflussen. So führt die Wechselwirkung des Kaliumions K-608 mit der Guaninebene eins zu einer Verschiebung dieser Ebene in Richtung des 5'-Endes (nach ca. 20 ps, vergleiche dazu Abb. 10.2). Offensichtlich bewirkt dabei die Ausbildung einer geeigneten Koordinationsumgebung für das Ion durch die Uracil- und Guaninbasen (3'-Ende) eine entsprechende Veränderung der benachbarten Hohlraumgröße.

Betrachtet man die Ausdehnung senkrecht zur helikalen Achse anhand der O6-O6-Abstände, so lassen sich auch an dieser Stelle gegenüber dem DNA-Quadruplex $d[\text{TTGGGGTT}]_4/\text{K}$ (o.r) reduzierte Werte feststellen, wie Abb. 10.4 zu entnehmen ist. Insbesondere fallen die deutlich verringerten Schwankungsbreiten innerhalb des RNA-Quadruplexes auf, die auf das elektrostatisch weniger anspruchsvolle Besetzungsmuster der Basenhohlräume zurückzuführen sind.

Die mittlere Ausdehnung der „äußeren“ Quadruplexstruktur, die durch die Abstände der Phosphoratome innerhalb einer Ebene beschrieben wird, weist gegenüber den vergleichbaren DNA-Systemen eine deutliche Reduktion auf (vergleiche dazu Tab. 9.4 sowie Tab. 9.5).

- Ebene 1 (3') $\leftrightarrow \langle d_{(P-P)} \rangle_{t,n} = (13,85 \pm 0,43) \text{ Å}$

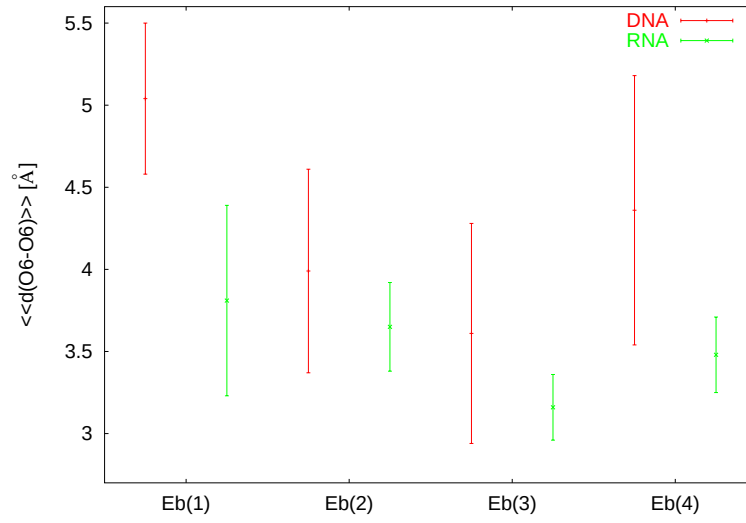


Abb. 10.4: Zeitliche Mittelwerte der gemittelten O6-O6-Abstände des RNA-Systems r[UGGGGU]₄/K im Vergleich zu d[TTGGGGTT]₄/K

- Ebene 2 $\leftrightarrow \langle d_{(P-P)} \rangle_{t,n} = (16,45 \pm 0,27) \text{ \AA}$
- Ebene 3 $\leftrightarrow \langle d_{(P-P)} \rangle_{t,n} = (14,82 \pm 0,65) \text{ \AA}$
- Ebene 4 $\leftrightarrow \langle d_{(P-P)} \rangle_{t,n} = (14,87 \pm 0,65) \text{ \AA}$
- Ebene 5 (5') $\leftrightarrow \langle d_{(P-P)} \rangle_{t,n} = (14,28 \pm 0,57) \text{ \AA}$

Zusätzlich deuten die Unterschiede in den Werten für die einzelnen Ebenen eine Verzerrung im Bereich des Rückgrats an. Die auftretenden Schwankungen sind dabei für die verkürzten Distanzen erhöht.

Betrachtet man die Phosphorabstände innerhalb der Stränge, so lassen sich demgegenüber kaum Unterschiede im Vergleich zu den DNA-Assoziaten feststellen.

- Strang 1 $\leftrightarrow \langle d_{(P-P)} \rangle_{t,n} = (6,53 \pm 0,20) \text{ \AA}$
- Strang 2 $\leftrightarrow \langle d_{(P-P)} \rangle_{t,n} = (6,55 \pm 0,14) \text{ \AA}$
- Strang 3 $\leftrightarrow \langle d_{(P-P)} \rangle_{t,n} = (6,67 \pm 0,18) \text{ \AA}$
- Strang 4 $\leftrightarrow \langle d_{(P-P)} \rangle_{t,n} = (6,69 \pm 0,21) \text{ \AA}$

Abb. 10.5 zeigt den zeitlichen Verlauf des Trägheitsradius für das System $r[\text{UGGGGU}]_4/\text{K}$, der die Lage aller Atome im Bezug auf den Schwerpunkt des Quadruplexes berücksichtigt.

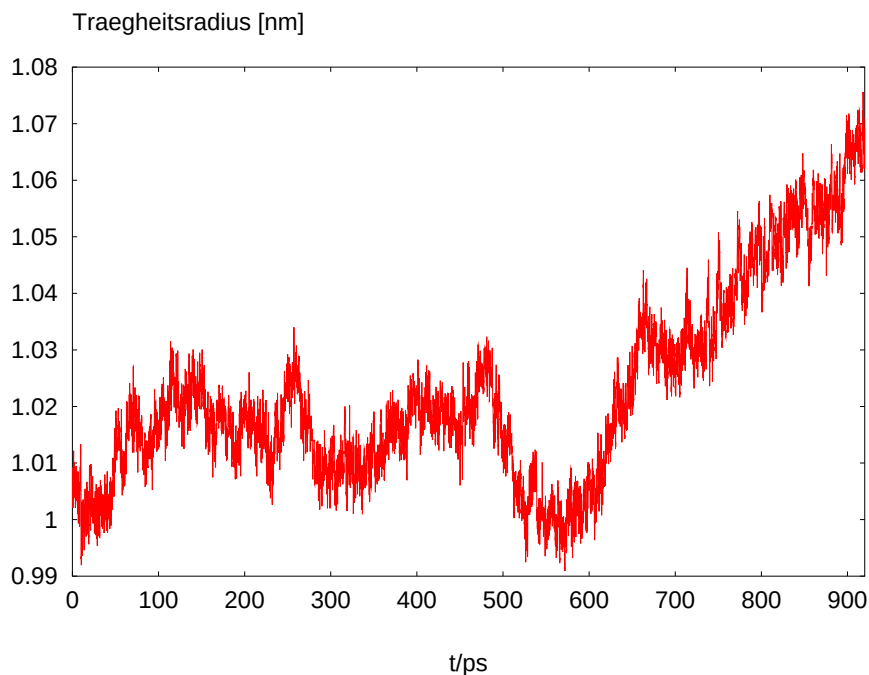


Abb. 10.5: Trägheitsradius des RNA-Systems

Bis ca. 550 ps liegen dabei die Werte in Bereichen, die für $d[\text{TGGGGT}]_4/\text{K}$ (m.r.) typisch sind. Im Anschluss ist ein signifikanter Anstieg zu erkennen, der eher dem des analogen Systems „ohne restraints“ entspricht. Über den gesamten Simulationszeitraum betrachtet, ergibt sich ein Mittelwert von $(1,022 \pm 0,017) \text{ \AA}$. Eine mögliche Ursache für dieses Verhalten zum Ende der Simulation kann in der langsamen, sich über ca. 300 ps hinziehenden Wanderung eines Kaliumions aus dem mittleren Käfig des Quadruplexes in den darüber liegenden Guaninhohlraum am 3'-Ende gesehen werden. Dies bewirkt gleichzeitig eine Verschiebung des im Uracilbereich interkalierten Kations nach außen. Dabei kommt es zu einer nicht unerheblichen strukturellen Veränderung der Gesamtanordnung, wobei der innere Guaninkomplex intakt bleibt.

Abb. 10.6 verdeutlicht dies durch eine Visualisierung der Guanin- und Uracilbasen am 3'-Ende zu unterschiedlichen Simulationszeitpunkten. Nach 100 ps (links) existiert eine geordnete Käfigstruktur, die aus den acht Carbonylsauerstoffatomen der beteiligten Basen gebildet wird und das interkalierte Kaliumion „fixiert“. Die G-Basen nehmen dabei eine weitestgehend planare Anordnung ein, wohingegen die

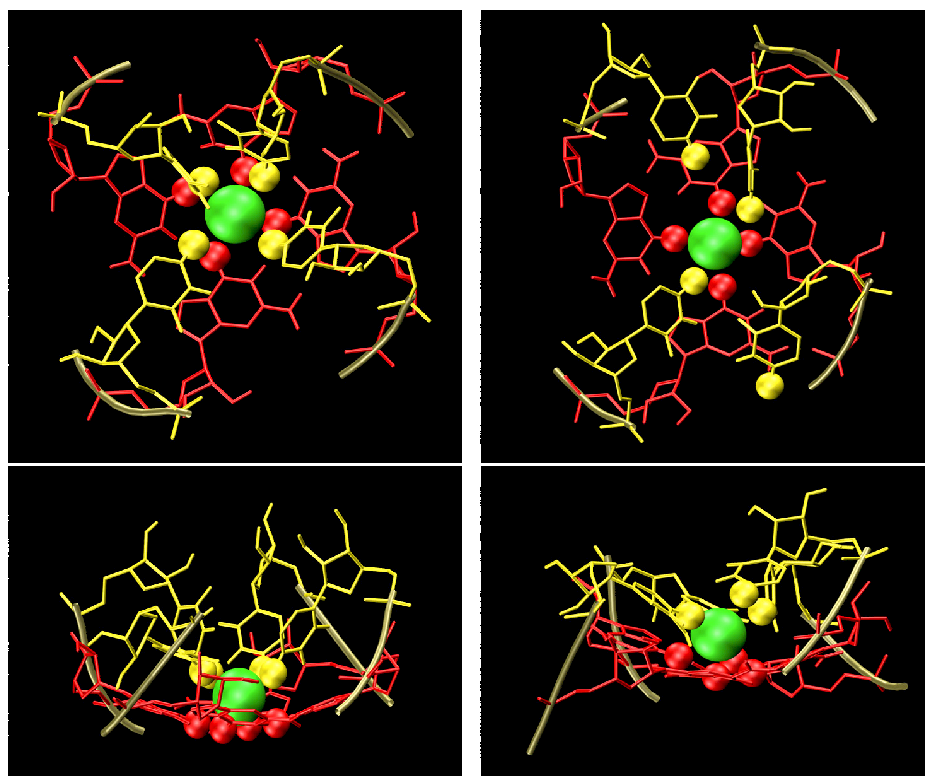


Abb. 10.6: Teilbereiche des $r[UGGGGU]_4/K$ -Systems nach 100 ps (links) sowie 750 ps (rechts) (Guaninbereiche (rot), Thyminbereiche (gelb), Kaliumion (grün); die Carbonylsauerstoffatome (O6, O4) sind ebenfalls besonders hervorgehoben)

U-Basen gewinkelt angeordnet sind. Demgegenüber zeigt sich nach 750 ps (rechts) eine Auflösung der durch die O4-Sauerstoffatome der Pyrimidinbasen gebildeten Ebene. Es verbleibt ein Hohlraum, der durch sechs Sauerstoffatome gebildet wird und das interkalierte Kation weitaus weniger effektiv zu komplexieren vermag. Dementsprechend wird die Ausweichbewegung dieses Ions in Folge der erhöhten interionischen Coulomb-Abstoßung erleichtert (vergleiche dazu Abb. 10.2).

Wie in diesem Abschnitt gezeigt werden konnte, lassen sich geometrische Veränderungen in der Gestalt des Quadruplexes beim Übergang von DNA- hin zu RNA-Systemen beobachten.

Besonders ausgeprägt sind die Unterschiede im Bereich der Ausdehnung des Ionenkanals. Gegenüber den Modellquadruplexen beobachtet man einen erhöhten Abstand der Guaninebenen sowie der O6-O6-Abstände. Beide Merkmale fallen im Gegensatz zu den Aufweitungen, die sich im $d[TTGGGGTT]_4/K$ -System zeigten, jedoch signifikant geringer aus.

Betrachtet man die „äußere“ Struktur des RNA-Tetraplexes anhand der Abstände der Phosphoratome des Rückgrats innerhalb einer Ebene, so zeigt sich eine deutliche Reduzierung gegenüber den DNA-Systemen. Offensichtlich spielen insbesondere im Bereich des „backbones“ die zusätzlichen Hydroxyeinheiten der Ribose eine entscheidende Rolle. Es bilden sich Konformationen aus, die stärker nach innen gerichtet sind, was sich sowohl an den P-P-Abständen als auch am Verlauf des Trägheitsradius ablesen lässt.

10.3 Die Hydrathülle

Bereits bei der Diskussion der Modellsysteme sowie der Quadruplexe mit erweiterten Basensträngen ist die Rolle der umgebenden Solvathülle hinsichtlich der Ausbildung bestimmter Konformationen und deren Stabilisierung eingehend beschrieben worden. Im Folgenden werden Hydratationsaspekte diskutiert, die sich aus den veränderten Merkmalen (endständige Uracilgruppen sowie zusätzliche Hydroxyeinheiten) ergeben, die für eine RNA-Struktur charakteristisch sind.

Abb. 10.7 zeigt „scatterplots“ zu verschiedenen Simulationszeitpunkten für den Bereich der Guaninebene zwei. Die obere Auftragung stellt die Situation über die ersten 20 ps der Simulation dar. Man erkennt deutlich, dass auch für eine RNA-Struktur bevorzugte Anknüpfungspunkte von umgebenden Wassermolekülen vorhanden sind. Der untere Teil der Abbildung beinhaltet die Projektionen der Teilchen für das Zeitintervall von 100 - 120 ps. Gegenüber der vorherigen Auftragung stellt man eine wesentlich unschärfere Lokalisierung der RNA-Atome fest, was auf stärkere Fluktuationen im zugrunde liegenden Zeitfenster schließen lässt. Insbesondere scheint sich die Anordnung der Guaninbasen zueinander verändert zu haben. Eine genaue Zuordnung einzelner Solvensmoleküle zu speziellen Positionen der RNA lässt sich mit Hilfe dieser Darstellungsart jedoch nicht treffen.

Zu diesem Zweck werden die Atome im Bereich der Ebene zwei visualisiert (siehe Abb. 10.8). Die auftretenden intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen der RNA-Fragmente untereinander sowie zwischen den Solvensmolekülen werden dabei ebenfalls berücksichtigt.

Die Hydratisierungssituation zu Beginn der Simulation ist im linken Teil der Abbildung dargestellt. Basierend auf einem Wasserstoffbrückenmuster des Typs N7-H1 bildet sich ein Solvensnetzwerk um die betrachtete Ebene aus. Dabei beobachtet man eine starke Integration der O2*- und H2*-Atome der neu hinzugekommenen Hydroxylgruppen in die Hydratation des Quadruplexes. Es bilden sich Wasserketten von zwei bis drei Molekülen zwischen diesem Hydroxybereich und Phosphatsauerstoffatomen aus, die eine Verbindung zwischen benachbarten Strängen bilden. Die NH₂-Gruppen der Guaninbasen fungieren dabei teilweise als zusätzliche

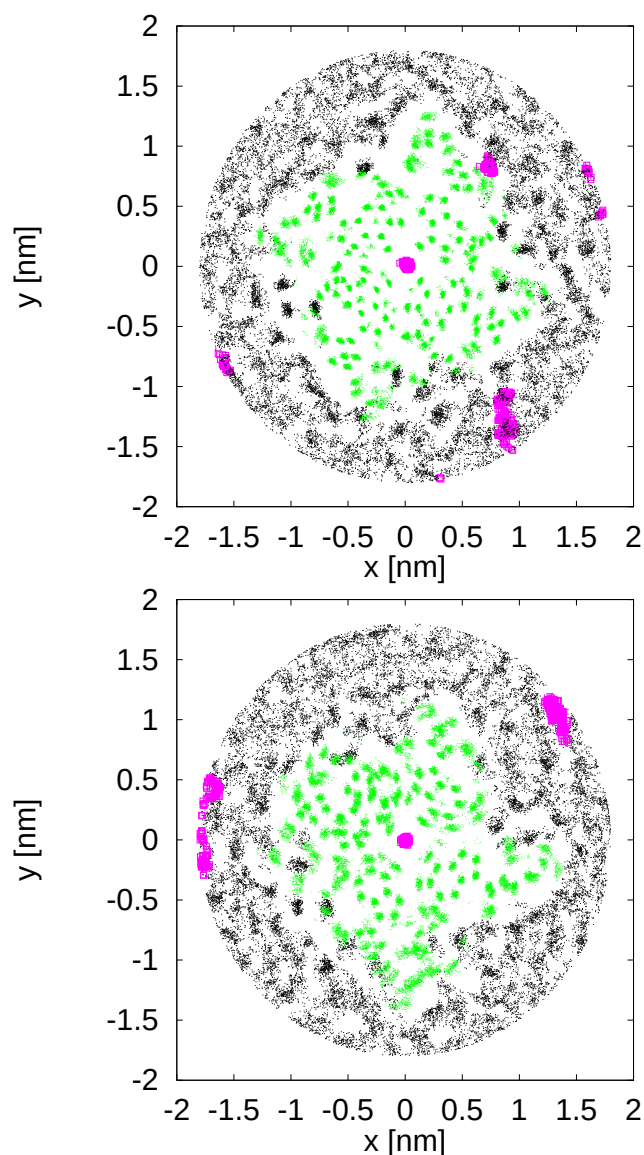


Abb. 10.7: „scatterplots“ für die Ebene zwei des Systems $r[\text{UGGGGU}]_4/\text{K}$ zu verschiedenen Zeitpunkten der Simulation (oben: 0-20 ps, unten: 120-140 ps, 200 Konfigurationen, Schichtdicke 2,5 Å, DNA: grün, H_2O : schwarz, Ionen: pink)

Anknüpfungspunkte, die diese Verbrückung zusätzlich stabilisieren. Entgegen den Beobachtungen an den Modellsystemen, die ein entsprechendes H-Brückenmuster aufweisen (vergleiche dazu Abb. 8.5 auf S. 152), lassen sich jedoch keine Solvensmoleküle lokalisieren, die eine direkte Verbrückung zwischen der NH_2 -Gruppe und den O5^* -Atomen der Phosphordiesterbrücke benachbarter Stränge ausbilden.

Im rechten Teil der Abb. 10.8 ist die Struktur nach 136 ps dargestellt. Zu diesem Zeitpunkt bestimmt das Hoogsteen-Muster die Anordnung der Guaninbasen in der Ebene zwei. Die Anzahl der Wassermoleküle, die sich in einem vorgegebenen

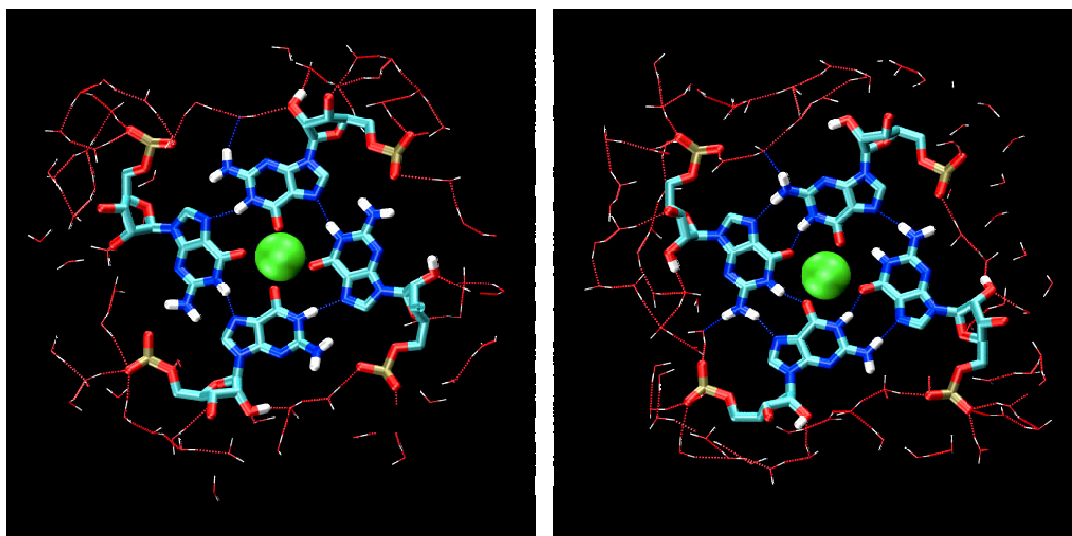


Abb. 10.8: Strukturdarstellung der Bereiche aus Abb. 10.7 (inkl. Wasserstoffbrückenbindungen), links: Startstruktur, rechts: Struktur nach 136 ps

Abstand zu den RNA-Fragmenten befinden, ist deutlich erhöht. Es bilden sich wie im zuvor beschriebenen Fall Solvensnetzwerke aus, deren Abstand zu den Atomen der RNA im Bereich der Furchen kleiner ist. Die bereits oben beschriebenen potenziellen Koordinationspunkte für H_2O -Moleküle werden dabei in stärkerem Maße als Ausgangsposition verbrückender Solvensketten benutzt.

Betrachtet man die Hydratisierung entlang der helikalen Achse im Bereich der Furchen, so erkennt man, dass sich auch für RNA Quadruplexe geordnete Strukturen ausbilden (Abb. 10.9).

Der linke Teil zeigt einen „scatterplot“ über das Zeitintervall von 0 - 20 ps. Dabei treten Solvensmoleküle in Erscheinung, die links und rechts in die RNA-Struktur eingelagert sind. Zusätzlich bevölkern Wassermoleküle den Nahbereich der 3'- und 5'-Enden.³

Zur Verdeutlichung der Wechselwirkungen zwischen RNA und umgebender Hydrathülle, sind am Beispiel eines Furchenbereiches die eingelagerten H_2O -Moleküle inklusive der auftretenden Wasserstoffbrückenbindungen eingezeichnet (rechter Teil der Abb. 10.9). Auch an dieser Stelle spielen die $\text{O}2^*$ - und $\text{H}2^*$ -Atome (grün dargestellt) als Anknüpfungspunkte für die „spine of hydration“ eine entscheidende Rolle.

³Zum Teil dringen die H_2O -Moleküle in die Uracilebene ein, weiten diese auf und komplexieren die dort eingelagerten Kaliumionen. Dies unterstützt den Austritt der terminalen Ionen aus dem Quadruplexverband.

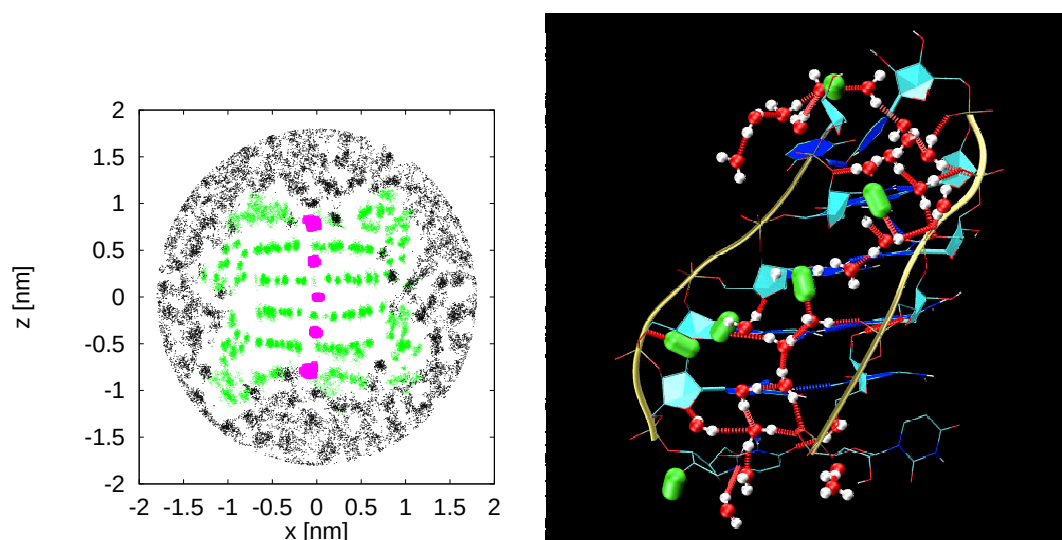


Abb. 10.9: links: „scatterplot“ entlang der helikalen Achse (0-20 ps), rechts: „spine of hydration“ für einen Furchenbereich (O2*- und H2*-Atome sind grün dargestellt)

Wie die Darstellung der Van-der-Waals-Oberfläche (siehe Abb. A.38 auf S. 270) verdeutlicht, befinden sich im Bereich der Furchen zahlreiche polare Positionen der RNA, die für Wassermoleküle zugänglich sind. Im Gegensatz zu der Situation bei den DNA-Systemen fallen dabei die durch die zusätzlichen Hydroxyfunktionen geschaffenen Anknüpfungspunkte auf, die größtenteils in Richtung des „zugänglichen“ Furchenbereiches angeordnet sind.

In Analogie zu den Untersuchungen der DNA-Systeme, zeigt die Projektionsdichte (siehe Abb. A.39 auf S. 270) eine ungleichmäßige Verteilung der Wassermoleküle um die RNA-Stränge auf. Die Furchenbereiche sind durch eine erhöhte Punktdichte gekennzeichnet, wohingegen die Annäherung an die helikale Achse sowie die Entfernung über den Furchenbereich hinaus zu einer Reduzierung der Projektionsdichte der Solvensmoleküle führt. Die Formen der Konturen spiegeln dabei die individuellen Eigenschaften dieses r[UGGGGU]₄/K-Systems gegenüber den entsprechenden DNA-Assoziaten mit erweiterten Basensequenzen wider (vergleiche dazu Abb. A.36 und A.36 auf S. 267).

Tab. 10.3 listet die Residenzzeiten der Wassermoleküle an speziellen RNA-Positionen zusammen mit den zugrunde liegenden Hydratationsradien auf.

Dabei fallen die gegenüber den DNA-Systemen reduzierten Verweilzeiten im Bereich der 3'- und 5'-Enden auf. Ebenso reduzieren sich die Residenzzeiten im Bereich der O4*-Atome als Folge der zusätzlichen Hydroxylgruppen (O2*,H2*), die besonders im Bereich der Guaninbasen bindende Wechselwirkungen zu den umgebenden Sol-

Bereich	r_{Hyd} [nm]	n_{H_2O}	τ_r [ps]
Ion 3'-Ende	0,41	3,59	47,79 $\pm$ 0,89
Ion 5'-Ende	0,37	0,96	139,61 $\pm$ 1,34
Ionen im „bulk“	0,41	8,06	13,28 $\pm$ 1,07
N2	0,55	5,73	93,01 $\pm$ 2,14
O2* _{Gua}	0,41	3,76	49,51 $\pm$ 1,81
O2* _{Ura}	0,41	4,76	20,54 $\pm$ 0,67
O4* _{Gua}	0,38	1,66	25,77 $\pm$ 0,98
O4* _{Ura}	0,39	2,74	19,23 $\pm$ 0,68
P _{Gua}	0,52	11,13	55,99 $\pm$ 3,11
P _{Ura}	0,52	11,71	26,33 $\pm$ 0,92
	h_{Zyl}/r_{Zyl} [nm]	n_{H_2O}	τ_r [ps]
Furchen _{ges}	1,58/1,10	54,89	83,5 $\pm$ 2,19
Furchen _{Gua}	0,96/1,10	29,56	81,00 $\pm$ 1,74

Tabelle 10.3: Hydratationsradien des r[UGGGGU]₄/K-Systems mit zugehörigen Residenzzeiten

vensteilchen ausbilden. Die Hydrathüllen um die Phosphoratome des „backbones“ scheinen hingegen durch die veränderten Strukturmerkmale wenig beeinflusst zu werden, die Verweildauer der H₂O-Moleküle ist nahezu unverändert. Insgesamt überträgt sich die zu beobachtende Reduzierung von τ_r an diskreten RNA-Position auf das Verweilverhalten der Solvensteilchen im gesamten Furchenbereich.

Wie für den Fall der Systeme d[TGGGGT]₄/K und d[TTGGGGTT]₄/K kann auch an dieser Stelle ein Vergleich des durch Photonen-Korrelations-Spektroskopie zugänglichen Translationsdiffusionskoeffizienten mit dem durch eine Simulation bestimmten Analogen angestellt werden. Durch eine Auftragung entsprechend Abb. 9.20 auf S. 208 ergibt sich ein Koeffizient von $D_{T-sim}(304K) = 1,94 \cdot 10^{-6} cm^2 s^{-1}$. Eine Umrechnung entsprechend Gl. 9.2 führt zu einem Translationsdiffusionskoeffizienten von $D_{T-sim}(293K) = 1,42 \cdot 10^{-6} cm^2 s^{-1}$. Dies stimmt sehr gut mit experimentellen Ergebnissen überein, die einen Wert von $D_{T-exp}(293K) = 1,46 \cdot 10^{-6} cm^2 s^{-1}$ ergeben [15].

Kapitel 11

Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden *Molekulardynamische Simulationen* an telomeren Quadruplexstrukturen in wässriger Lösung durchgeführt. Dabei konnten zahlreiche individuelle Merkmale der einzelnen Tetraplexsysteme, wie z.B. Stabilitätsunterschiede in Abhängigkeit von der Kationensorte oder die Anpassung der Quadruplexkonformationen an dynamische Wechselwirkungen mit der Umgebung (interkalierte Ionen, „bulk-Ionen“ sowie Wassermoleküle) auf atomarer Ebene beobachtet und die zugrunde liegenden Mechanismen abgeleitet werden. Diese zumeist sehr speziellen Fragestellungen setzten den Einsatz spezifisch angepasster Auswertungsroutinen für die Trajektorienanalyse voraus, deren Entwicklung und Programmierung einen großen Teil des Arbeitsaufwandes darstellten.

An **d[GGGG]₄-Modellsystemen** wurde der Einfluss unterschiedlicher interkalierter **Erdalkalikationen** charakterisiert. Dabei zeigte sich, dass neben den Alkaliionen erwartungsgemäß auch diese zweiwertigen Kationen zur Stabilisierung von Quadruplexstrukturen geeignet sind.

Im Detail wurden jedoch signifikante Unterschiede festgestellt. So neigten die simulierten Spezies bis auf wenige kurzzeitige Ausnahmen zur Ausbildung eines einheitlichen Besetzungsmusters der äußeren beiden Käfige. Individuelle Differenzen, in Form von Verschiebungen zu den Enden hin, wiesen jedoch auf eine Ionenspezifität hin. Eine Besetzung aller Hohlräume wurde aufgrund der abstoßenden interionischen Coulombkräfte indes vermieden. Im Vergleich zu entsprechenden Alkalisystemen zeigte sich ein deutlich eingeschränktes Ionenwanderungsverhalten entlang der helikalen Achse, das von den anziehenden Coulomb-Wechselwirkungen zwischen den Kationen und Carbonylsauerstoffatomen sowie abstoßenden Lennard-Jones-Kräften dominiert wurde.

Geometrische Veränderungen der lokalen Käfigstrukturen als Folge einer nicht vollständigen Besetzung aller Hohlräume konnten beobachtet werden. Insbesondere zeigte sich, dass die Ebenenabstände besetzter Zwischenräume im Vergleich zu denen unbesetzter deutlich reduziert erschienen, was auf die Coulomb-Anziehung zwischen eingelagerten Ionen und den sie umgebenden O6-Atomen zurückzuführen war. Dabei wiesen das Magnesium- und Strontiumsystem bei gleichem Besetzungsmuster nahezu identische Werte auf, wohingegen das Calciumsystem wesentlich geräumigere Strukturen bevorzugte.

Hinsichtlich der Käfigausdehnung senkrecht zur helikalen Achse konnte eine signifikante Abhängigkeit der Aufweitung vom Besetzungsmuster sowie von den Ionenwanderungen festgestellt werden. Kationen im Nahbereich der Carbonylsauerstoffatome führten dabei zu Verbreiterungen insbesondere der endständigen Purinebenen, was durch die zusätzlichen Wechselwirkungen mit Wassermolekülen unterstützt wurde.

Weitere Flexibilität erlangte die Quadruplexstruktur durch eine Verzerrung der Diederwinkel im Bereich der Quartettebenen. Hierbei konnten besonders ausgeprägte Fluktuationen im $d[\text{GGGG}]_4/\text{Ca}$ -System beobachtet werden, die jedoch noch unterhalb der für Alkaliassoziate charakteristischen Werte lagen.

In Analogie zu den von TÖHL [113] untersuchten Systemen konnten hinsichtlich der äußeren Ausdehnung (P-P-Abstände, Trägheitsradien) des Tetraplexes lediglich geringe Abhängigkeiten vom Ionentyp festgestellt werden.

Nicht-kovalente Bindungen in Form von Wasserstoffbrücken zwischen benachbarten Guaninbasen innerhalb einer Tetramerebene sorgten für eine zusätzliche Stabilität der Stranganordnung. Dabei konnte man zwei unterschiedliche Typen von H-Brücken identifizieren. Während die Magnesium- und Strontiumsysteme zur Ausbildung von H-Brücken des Typs N7-H1 neigten, bevorzugte das Calciumgefüge das Hoogsteen-Muster. Allgemein ließ sich beobachten, dass die Annäherung von Ionen an Ebenen zu einer Präferenz der geräumigeren, N7-H1-Basenordnung führte.

Die Stabilitätsunterschiede innerhalb der Systemreihe konnten durch die Betrachtung einzelner Energieterme quantitativ untermauert werden. Insbesondere spiegelte die Korrelation zwischen geometrischen Veränderungen in lokalen Bereichen und damit verbundenen Modifikationen der energetischen Wechselwirkungen (Coulomb- und Lennard-Jones-Terme) die vielschichtige und komplexe Kopplung der individuellen Systemkomponenten wider.

Die Verhaltensähnlichkeiten der $d[\text{GGGG}]_4/\text{Mg}$ - und $d[\text{GGGG}]_4/\text{Sr}$ -Systeme entsprachen dabei experimentellen Beobachtungen, die den Synergismus dieser beiden Ionensorten in Bezug auf die Bildung bzw. Stabilisierung von Quadruplexen beschrieben haben.

Untersuchungen an **Tetraplexen** mit anfänglich **unterschiedlichen Geschwindigkeiten der interkalierten Kationen** ließen ein sehr ähnliches Verhalten der $d[\text{GGGG}]_4/\text{K}$ -Systeme erkennen. Abweichungen innerhalb dieser Quadruplexreihe wurden dabei maßgeblich durch den „Grad der Störung“ bestimmt. So führten geringe Veränderungen der Geschwindigkeitsvektoren der Ionen im Tetraplexkanal, insbesondere in entgegengesetzter Richtung, zu keinen wesentlichen Veränderungen. Individuelle Merkmale wie Käfigdimensionen, Diederwinkel sowie auftretende Wasserstoffbrückenmuster und beobachteter Energiebeträge konnten jedoch in der Detailanalyse beobachtet werden.

Demgegenüber resultierte aus einer gleichgerichteten Modifikation der Krafteinwirkung der eingelagerten Kationen auf den Quadruplex eine signifikante Destabilisierung des Systems, verbunden mit ausgeprägten Aufwindungserscheinungen des Tetraplexes.

Im Vergleich zu den Erdalkalisystemen ließ sich eine weitaus höhere Mobilität der Kaliumionen erkennen. Die bevorzugte Besetzung der äußeren beiden Käfige war jedoch auch für diese Systemreihe klar auszumachen.

Anhand systematischer Untersuchungen von **$d[\text{GGGG}]_4/\text{Na}$ -Systemen** konnten strukturelle Veränderungen der Quadruplexe infolge systematischer **Temperaturerhöhungen** eingehend studiert werden. Wie die detaillierten Auswertungen zeigten, ist dies eng verknüpft mit einer Aufweitung der Kanalgeometrie, dem Aufbrechen der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Purinbasen sowie bislang nicht beobachteten starken Fluktuationen der „äußeren“ Struktur. Insbesondere äußerte sich der Temperaturanstieg in steigenden Trägheitsradien des DNA-Komplexes und zunehmenden strukturellen Deformationen, die anhand der zeitlichen Entwicklung der rms-Werte verfolgt werden konnten. Diese „Schmelzerscheinungen“ traten oberhalb einer Simulationstemperatur von 320 K auf. Sie liegen somit in einem Bereich, der den experimentell bestimmten Schmelztemperaturen vergleichbarer Tetraplexe entspricht.

Die für die Modellquadruplexe charakteristische Besetzung der terminalen Hohlräume durch Kationen konnte auch an diesen Systemen beobachtet werden. Jedoch ist der Mechanismus zur Erreichung dieser Endkonfiguration abhängig vom Temperaturfaktor.

Durch die Untersuchung des Verhaltens **gemischter Systeme** (einwertige Kaliumionen interkaliert, zweiwertige Erdalkalitionen im „bulk“) konnte gezeigt werden, dass die den Quadruplex umgebenden geladenen Teilchen eine eminente Bedeutung hinsichtlich der Systementwicklung besitzen. Insbesondere wurde eine, im

Unterschied zu reinen Kaliumsystemen, reduzierte Tendenz zur Ionenbewegung entlang der helikalen Achse beobachtet, verbunden mit einer erhöhten Neigung zur Destabilisierung. Die Annäherung der zweiwertigen Kationen führte dabei zu erheblichen strukturellen Veränderungen der Käfiggeometrien und des „backbone“-Bereiches sowie der auftretenden Wasserstoffbrückenmuster. Ein Grund dafür muss sicherlich in der reduzierten bindenden Coulombwechselwirkung zwischen DNA und interkalierten Ionen gesehen werden, die sich im Vergleich zu dem entsprechenden reinen Kaliumsystem offenbarte.

Die Stabilitäten, Konformationen sowie die Funktionalität von DNA-Quadruplexen sind eng verknüpft mit dem Grad der **Hydratation**. Anhand der Visualisierungen mit Hilfe von „scatterplots“, ließen sich in dieser Arbeit Wassermoleküle an den Enden der Tetraplexe identifizieren, die die Koordinationssphäre der interkalierten Ionen erweiterten. Die Einlagerung von Solvensmolekülen in den Furchen der Quadruplexe entsprach dabei experimentellen Beobachtungen an einem d[TGGGGT]₄-System. Diese sogenannte „spine of hydration“ stellt eine Verknüpfung benachbarter DNA-Stränge über Wasserbrücken dar, die dem Gesamtsystem zusätzliche Stabilität verleihen.

Mit Hilfe der Analyse von Filmsequenzen konnte gezeigt werden, dass die Form der Hydratation keine statische Systemeigenschaft darstellt, sondern sich vielmehr hochgradig dynamisch auf die temporären, individuellen Anforderungen einzustellen vermag. Insbesondere die Art der anwesenden Ionen, der Temperaturfaktor aber auch spezielle Quadruplexgeometrien (H-Brücken, Ebenenabstände, etc.) konnten als Parameter identifiziert werden, die die Hydratation des Tetraplexes maßgeblich beeinflussten. So zeigte sich beispielsweise, dass die Erdalkalisysteme zu einer deutlich stärker ausgeprägten Hydratstruktur neigten als die entsprechenden Alkaliassoziate. Temperaturerhöhungen führten dabei zu einem „Verschwimmen“ klar zu definierender Positionen des Wassers im Bereich des Quadruplexes als Folge gesteigener kinetischer Energien der Solvensteilchen.

Die Ausdehnung der Hydrathüllen um spezielle Atompositionen herum konnte durch die Auswertung von Paarkorrelationsfunktionen bestimmt werden, die gleichzeitig einen Zugang zu der Anzahl der Wassermoleküle im jeweiligen Volumenelement eröffneten. Dabei wurde deutlich, dass besonders der Bereich des DNA-Rückgrats eine Vielzahl potenzieller Anknüpfungspunkte für Wassermoleküle bietet.

Die Untersuchung der Residenzzeiten der Solvensteilchen in diesen Hydratschalen, die deutliche Unterschiede erkennen ließ, ermöglichte einen Einblick in die Dynamik der Hydratation. Zum einen konnten Bereiche mit besonders hohen Verweilzeiten für Wassermoleküle identifiziert werden, wie beispielsweise die Quadruplexenden

oder auch spezielle polarisierte Atompositionen innerhalb der Furchen. Zum anderen wurde jedoch auch deutlich, dass diese Residenzzeiten in entscheidendem Maße von den Systemparametern (Ionensorte, Temperatur) abhängen.

Durch die Simulation von **DNA-Quadruplexen mit erweiterten Basensträngen** wurde der Übergang von Modellsystemen hin zu realen Sequenzen erfolgreich vollzogen.

Die während der Simulation „ohne restraints“ auftretenden starken Fluktuationen des Gesamtsystems konnten durch eine differenzierte Betrachtung der rms-Werte in der Hauptsache den endständigen Thymingruppen zugeordnet werden. Diese schwächten jedoch die insgesamt hohe Stabilität des Quadruplexes, insbesondere der innen liegenden Guaninbasen, nicht entscheidend. Dabei stimmte die nicht-planare Anordnung der Thyminbasen mit Ergebnissen aus Röntgenstrukturuntersuchungen überein, die für diese Basensorte ebenfalls keine Quartettbildung beschrieben.

Entgegen den Ergebnissen der Modellsystemreihe zeigte sich an dieser Stelle eine Besetzung aller Guaninkäfige mit Kaliumionen. Zusätzlich konnte erstmalig der Eintritt eines Kations in den Ionenkanal beobachtet werden, der die hohe Tendenz des Systems zur Selbstorganisation unterstreicht. Den Thyminbasen kam dabei die Rolle eines Wegweisers für das Ion in Richtung des Kanaleingangs zu, nachdem sie das geladene Teilchen zuvor aus der Lösung „gefischt“ hatten („Tentakelmechanismus“). Diese sterisch und elektronisch anspruchsvolle Situation führte zu einer Aufweitung der inneren Struktur sowie zu Verzerrungen im „backbone“. Insbesondere konnte die Interkalation von Wassermolekülen beobachtet werden, die sehr wahrscheinlich zur Abschirmung der Kationen untereinander benötigt wurden.

Entsprechende Simulationen mit verstärkten Wasserstoffbrückenbindungen, die zur Analyse des bevorzugten Besetzungsmusters in Abhängigkeit von der „Kanalgeometrie“ (in diesem Fall eines H-Brückenmusters vom Hoogsteen-Typ) durchgeführt wurden, zeigten hingegen ein zu den Modellsystemen analoges Verhalten hinsichtlich der Gesamtstabilität des Tetraplexes sowie der Werte zugehöriger geometrischer Parameter.

Die Stabilisierung des Quadruplexes durch Wassermoleküle konnte auch für die erweiterten Systeme beobachtet werden. Dabei zeigte sich, dass die Solvensnetzwerke innerhalb der Furchen lediglich für den Bereich der Guaninbasen eine regelmäßige Anordnung aufwiesen, sich im Thyminbereich jedoch wesentlich diffuser darstellten. Eine zusätzliche Koordination der endständigen, interkalierten Kationen durch Solvensmoleküle trat dabei auch für die Quadruplexe mit terminalen T-Basen in Erscheinung.

Die Hydratationsradien um spezielle Atompositionen schwankten hinsichtlich der einzelnen Tetraplexe lediglich in geringem Maße. Die Verweildauern der Wassermoleküle in diesen Volumenelementen offenbarten hingegen signifikante Unterschiede. So waren die Residenzzeiten im Bereich der Thymineinheiten deutlich gegenüber denen im Bereich der Guaninbasen reduziert. Gleichzeitig zeigten sich erhöhte Verweilzeiten der Wassermoleküle an den untersuchten Tetraplexpositionen mit zunehmender Stranglänge der DNA-Sequenzen.

Durch die Bestimmung der Translationsdiffusionskoeffizienten konnte eine Beziehung zu experimentell zugänglichen Daten hergestellt werden. Dabei zeigte sich im Vergleich zu Ergebnissen aus der Photonenkorrelationsspektroskopie sowie der dynamischen Lichtstreuung, dass die Translationsbewegung durch die Simulation etwas zu schnell dargestellt wird. Unter Berücksichtigung der zugrunde liegenden Modellannahmen ergibt sich jedoch eine zufriedenstellende Übereinstimmung, die die MD-Simulation als geeignetes Werkzeug zur Untersuchung des Translationsverhaltens von Quadruplexen erscheinen lässt.

Die Simulation eines **r[UGGGGU]₄/K-Systems** erlaubte den direkten **Vergleich zwischen DNA und RNA**. Dabei zeigte sich ebenfalls eine verstärkte Fluktuation des Quadruplexes, die sich, wie im oben beschriebenen Fall, größtenteils auf die endständigen Basengruppen beschränkte. Signifikante Unterschiede ergaben sich insbesondere hinsichtlich der Ausdehnung des Ionenkanals senkrecht zur helikalen Achse, dessen Verringerung zu Veränderungen im „backbone“ führte.

Die zusätzlichen OH-Gruppen wurden in starkem Umfang in die Hydratation des Quadruplexes integriert und bildeten maßgebliche Assoziationspunkte des umgebenden Wassernetzwerks. Gegenüber den DNA-Quadruplexen beobachtete man dabei reduzierte Verweilzeiten der H₂O-Moleküle im Bereich der 3'- und 5'-Enden sowie der Furchen, wohingegen die Hydratation der Phosphoratome weitgehend unverändert blieb.

Ein Vergleich des aus der Simulation erhaltenen Translationsdiffusionskoeffizienten mit dem aus dynamischen Lichtstreuexperimenten zeigte eine gute Übereinstimmung, was ein zusätzliches Indiz für die korrekte Beschreibung des Systemverhaltens von Quadruplexen in wässriger Lösung mit Hilfe des GROMOS-Programmpaketes darstellte.

Mit den Ergebnissen dieser Arbeit konnte ein weiterer wichtiger Schritt in Richtung eines tiefgreifenderen Verständnisses der Wechselwirkungen zwischen Quadruplexen, Kationen und umgebenden Wassermolekülen auf atomarer Ebene getan werden. Dabei wurden spezifische strukturelle Merkmale der individuellen Tetraplexe cha-

rakterisiert sowie Aussagen hinsichtlich der Stabilität und der Dynamik dieser Assoziate getroffen. Ein vollständiges Bild ergab sich jedoch erst durch die konkrete Einbeziehung der Solvensmoleküle, deren Bedeutung bei der Ausbildung von Quadruplexen bislang kaum berücksichtigt wurde.

Die Resultate unterstreichen dabei eindrucksvoll die bedeutsame Rolle der *Molekulardynamischen Simulation* als effizientes Werkzeug zur Analyse der Vorgänge auf atomarer Ebene. Es ergeben sich somit vielfältige Möglichkeiten, Erkenntnisse, beruhend auf experimentellen Techniken, durch MD-Simulationen zu erweitern und ein „ganzheitliches Verständnis“ des Verhaltens von Biomolekülen in ihrer physiologischen Umgebung zu schaffen.

Vor dem Hintergrund der aktuellen Diskussion von Quadruplexen als mögliche Telomeraseinhibitoren im Bereich der Krebstherapie sowie als Schlüsselstrukturen zahlreicher anderer Krankheiten können zukünftige Simulationen entscheidende Hinweise bzgl. der zugrunde liegenden Mechanismen liefern. So ist beispielsweise eine detaillierte Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen Quadruplexen und Proteinen unabdingbar, die höchste Anforderungen an die Kapazitäten moderner Computersysteme stellt. Zusätzlich wäre der Einsatz als Trägermaterial für „kleine Gastmoleküle“, die ihrerseits bzw. in Verbindung mit dem Tetraplex biologische Aktivität besitzen („drug design“ für minimalinvasive Therapien), ein interessanter Simulationsgegenstand.

Neben den Studien dieser hochaktuellen Fragestellungen sollte jedoch die Vertiefung eines grundlegenden Verständnisses des Verhaltens von Tetraplexen nicht vernachlässigt werden. So stellt z.B. die weiterführende Untersuchung polymorpher Systeme mit verschiedenen Basensequenzen und interkalierten Ionensorten eine unabdingbare Voraussetzung dar, ein möglichst lückenloses Bild der vielschichtigen Funktionalität von Quadruplexen zu erhalten.

Diese Arbeit wird hoffentlich dazu dienen, zukünftige Forschungen anzuregen und nützliche Hilfestellungen zu geben.

Anhang A

Ergänzende Informationen

A.1 Allgemeine Angaben

A.1.1 Ionenradien

Kation	Ionenradius [Å]	
	Shannon[102]	Pauling[88]
Li ⁺	1.06	0.60
Na ⁺	1.32	0.95
K ⁺	1.65	1.33
Rb ⁺	1.75	1.48
Cs ⁺	1.88	1.69
Mg ²⁺	1.03	0.65
Ca ²⁺	1.26	0.99
Sr ²⁺	1.40	1.13
Ba ²⁺	1.56	1.35

Tabelle A.1: Unterschiedliche Skalen der Ionenradien einiger Kationen. Die Skala von PAULING basiert vorwiegend auf theoretischen Berechnungen, die andere auf Röntgenstrukturdaten.

A.1.2 Systemimmanente Größen

Die Tab. A.2 und A.3 enthalten die Simulationsparameter der einzelnen Systeme, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit simuliert wurden. Die verschiedenen Schritte während der Equilibrierungsphase sind in den Tab. A.4 und A.5 beschrieben.

Simulationsparameter	Bezeichnung	Systeme		
		Alkali ¹	Erdalkali	Gemischt
Anzahl der DNA-Moleküle	N_{mol}	1	1	1
Anzahl der Atome pro DNA	N_{DNA}	396	396	396
Anzahl der Wassermoleküle	N_{H_2O}	1008	1014	1010
Anzahl der Kationen	N_{Kation}	12	6	8
minimaler Abstand Box/DNA	d_{min}	8 Å	8 Å	8 Å
Integrationszeitschritt	dt	2 fs	2 fs	2 fs
Temperaturrelaxationszeit	τ_t	0.1 ps	0.1 ps	0.1 ps
Temperatur	T	300 K	300 K	300 K
Druck	p	1 atm	1atm	1 atm
Druckrelaxationszeit	τ_p	0.5 ps	0.5 ps	0.5 ps
cutoff-Radius	r_i/r_a	12/16 Å	12/16 Å	12/16 Å
Frequenz (neue Paarliste)	f_{Pl}	50 ps^{-1}	50 ps^{-1}	50 ps^{-1}
Equilibrierungszeit	t_e	58 ps	58 ps	58 ps

Tabelle A.2: Simulationsparameter für die Modellsysteme d[GGGG]₄

¹Für die Systeme d[GGGG]₄Na(300) - d[GGGG]₄Na(400) sollten die veränderten Simulationstemperaturen beachtet werden (siehe Tab. 4.4 auf S. 49).

System	N_{DNA}	N_{H_2O}	N_{Kation}	d_{min} Å	r_i/r_a Å	t_e [ps]
d[TGGGGT] ₄ /K	564	1789	20	10,5	12/19	76
d[TGGGGT] ₄ /K (d.r.)	564	1789	20	10,5	12/19	86
d[TTGGGGTT] ₄ /K	732	2430	28	10,5	12/19	106
d[TTGGGGTT] ₄ /K (d.r.)	732	2430	28	10,5	12/19	116
r[UGGGGU] ₄	604	1804	20	10,5	12/19	76

Tabelle A.3: Simulationsparameter für die erweiterten Systeme. Größen, die nicht aufgeführt sind, entsprechen denen in Tab. A.2.

d[TGGGGT] ₄ /K sowie r[UGGGGU] ₄ /K								
Nr.	Anzahl Zeitschritte	Dauer des Zeitschritts [ps]	Zeit [ps]	τ_t [ps]	τ_p [ps]	d.r.	p.r. ²	$k_{restraints}$ [kJ·mol ⁻¹ ·nm ⁻²]
1	10000	0,0008	8	0,01	0,05	-	+	5000
2	10000	0,0012	20	0,04	0,20	+	-	80000
3	5000	0,0016	28	0,04	0,20	+	-	40000
4	5000	0,0016	36	0,07	0,35	+	-	20000
5	5000	0,0020	46	0,07	0,35	+	-	10000
6	5000	0,0020	56	0,10	0,50	+	-	5000
7	5000	0,0020	66	0,10	0,50	+	-	2000
8	5000	0,0020	76	0,10	0,50	+	-	1000
9a	5000	0,0020	86	0,10	0,50	-	-	0
9b	5000	0,0020	86	0,10	0,50	+	-	1000

Tabelle A.4: Ablauf der Equilibrierung für die Systeme d[TGGGGT]₄/K und r[UGGGGU]₄/K; mit (DNA) und ohne „distance restraining“ (Schritt 9)

²p.r. $\equiv$ position restraining

d[TTGGGGTT] ₄ /K								
Nr.	Anzahl Zeitschritte	Dauer des Zeitschritts [ps]	Zeit [ps]	τ_t [ps]	τ_p [ps]	d.r.	p.r.	$k_{restraints}$ [kJ·mol ⁻¹ nm ⁻²]
1	10000	0,0008	8	0,01	0,05	-	+	5000
2	10000	0,0012	20	0,04	0,20	-	+	5000
3	10000	0,0016	36	0,07	0,35	+	-	10000
4	10000	0,0020	56	0,10	0,50	+	-	5000
5	15000	0,0020	56	0,10	0,50	+	-	5000
6	15000	0,0020	86	0,10	0,50	+	-	2000
7a	10000	0,0020	136	0,10	0,50	-	-	0
7b	10000	0,0020	136	0,10	0,50	+	-	1000

Tabelle A.5: Ablauf der Equilibrierung für die Systeme d[TTGGGGTT]₄/K mit und ohne „distance restraining“ (Schritt 7)

A.2 Erdalkaliionen

A.2.1 Kationenfluktuation

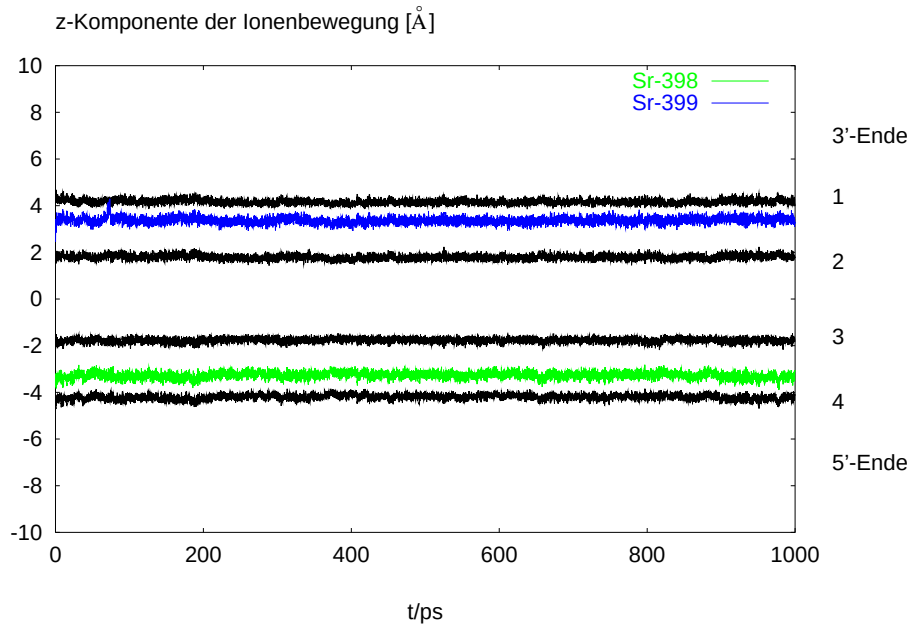


Abb. A.1: Kationenbewegung entlang der helikalen Achse im System d[GGGG]₄/Sr

A.2.2 Ebenenabstände

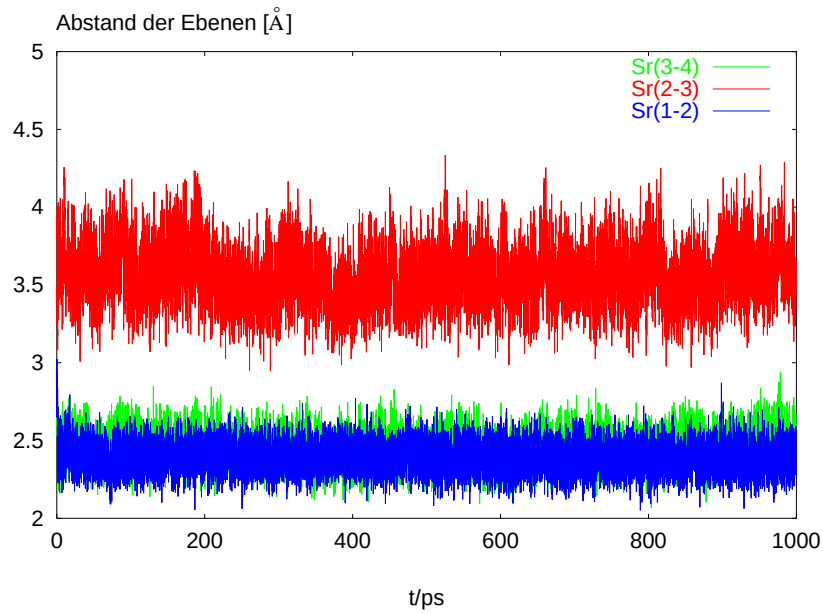
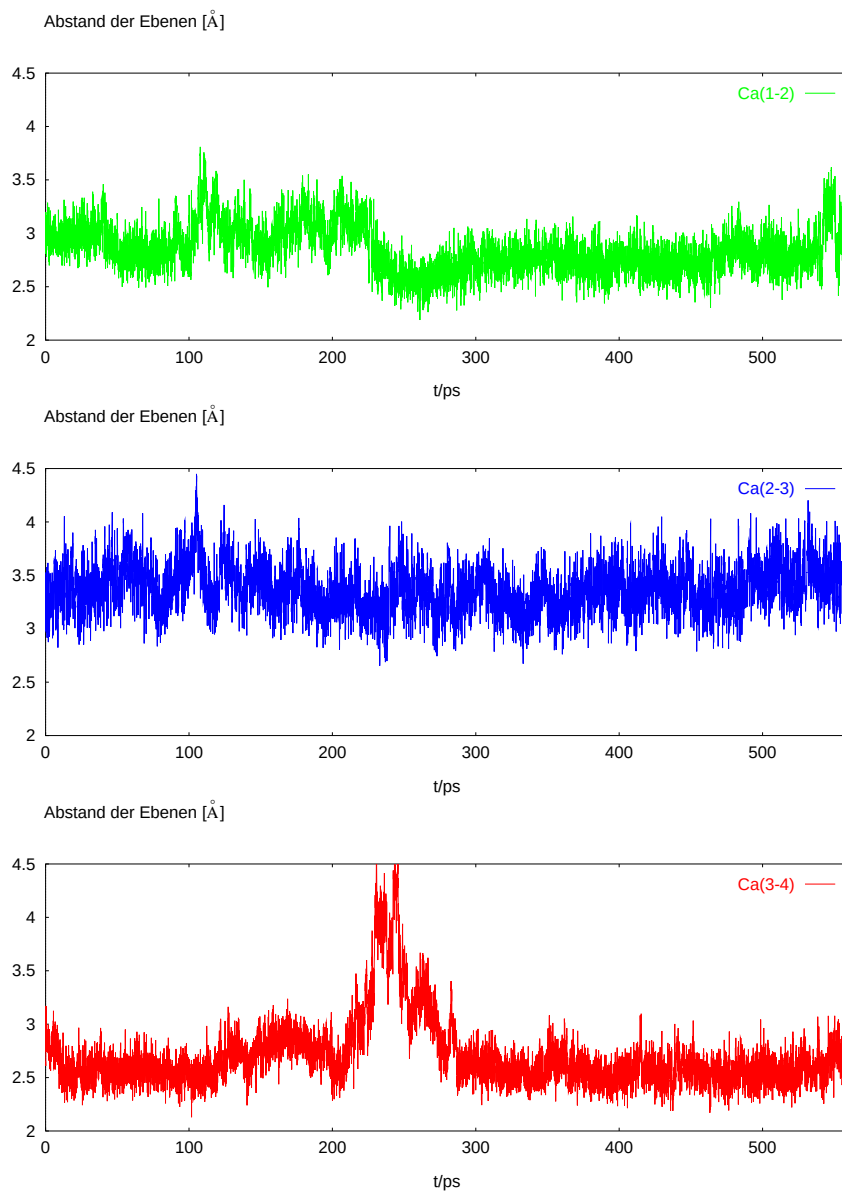


Abb. A.2: Ebenenabstände im System d[GGGG]₄/Sr

Abb. A.3: Ebenenabstände im System $d[\text{GGGG}]_4/\text{Ca}$

A.2.3 O6-O6-Abstände

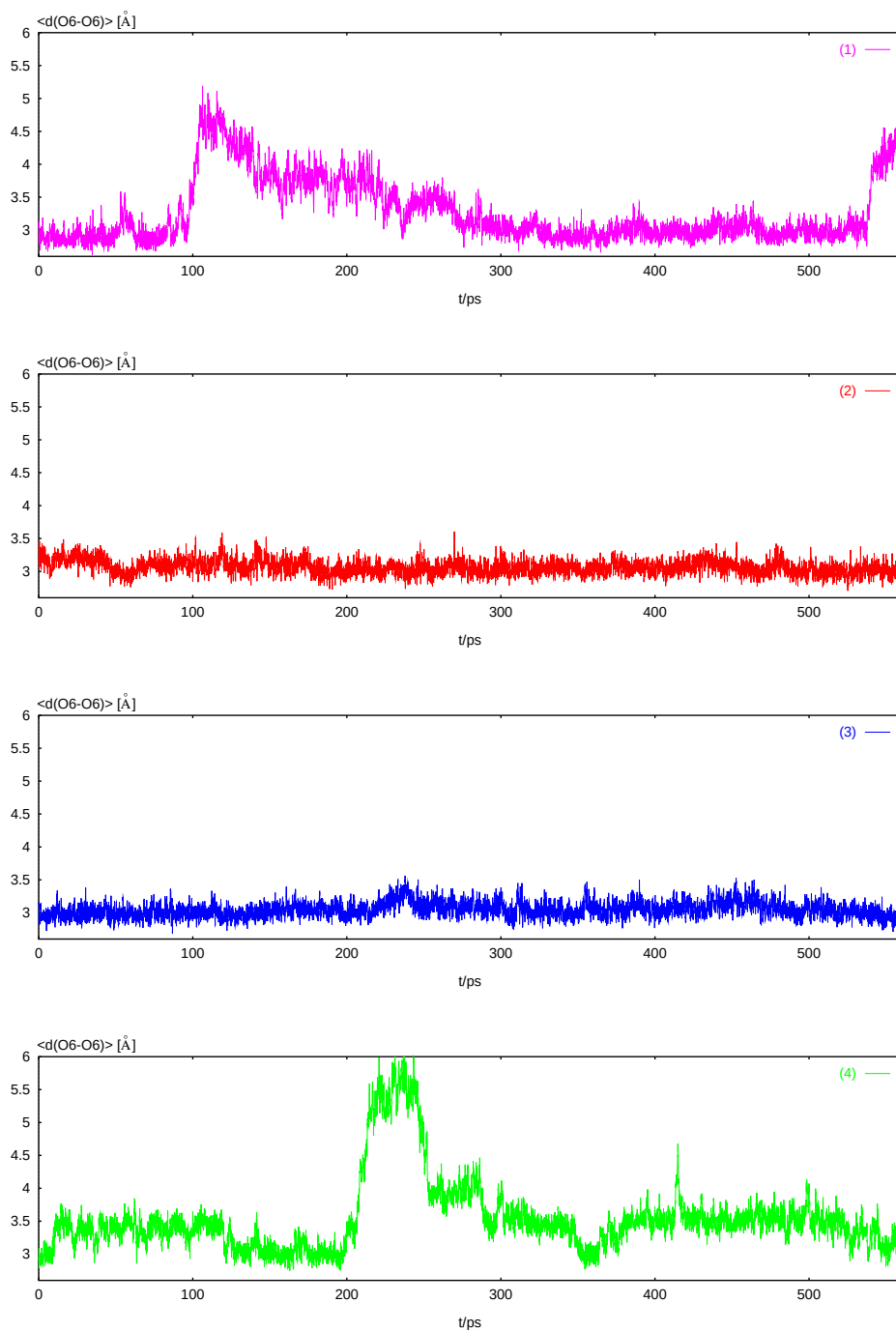


Abb. A.4: Mittlere O6-O6-Abstände innerhalb der einzelnen Ebenen des Systems $d[\text{GGGG}]_4/\text{Ca}$

A.2.4 Diederwinkel

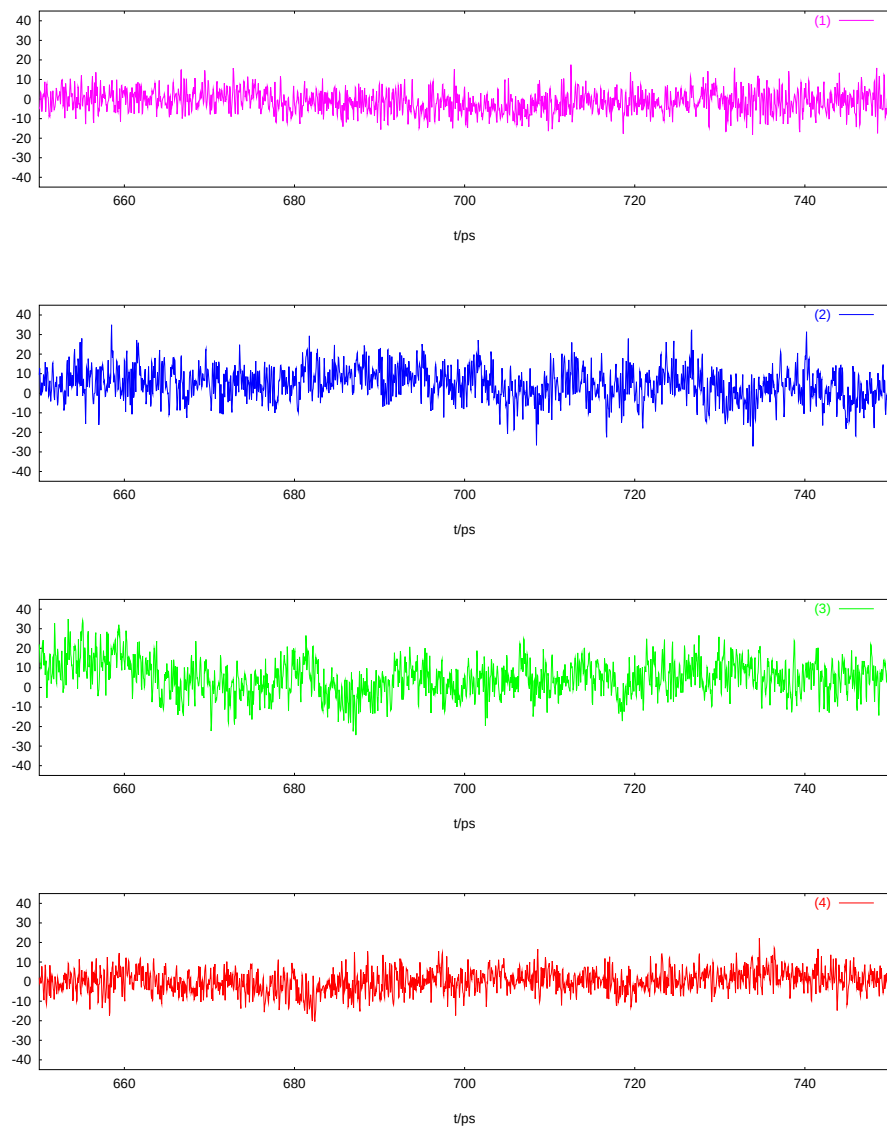


Abb. A.5: Diederwinkel innerhalb der Ebenen des Systems $d[\text{GGGG}]_4/\text{Sr}$

A.2.5 Wasserstoffbrückenbindungen

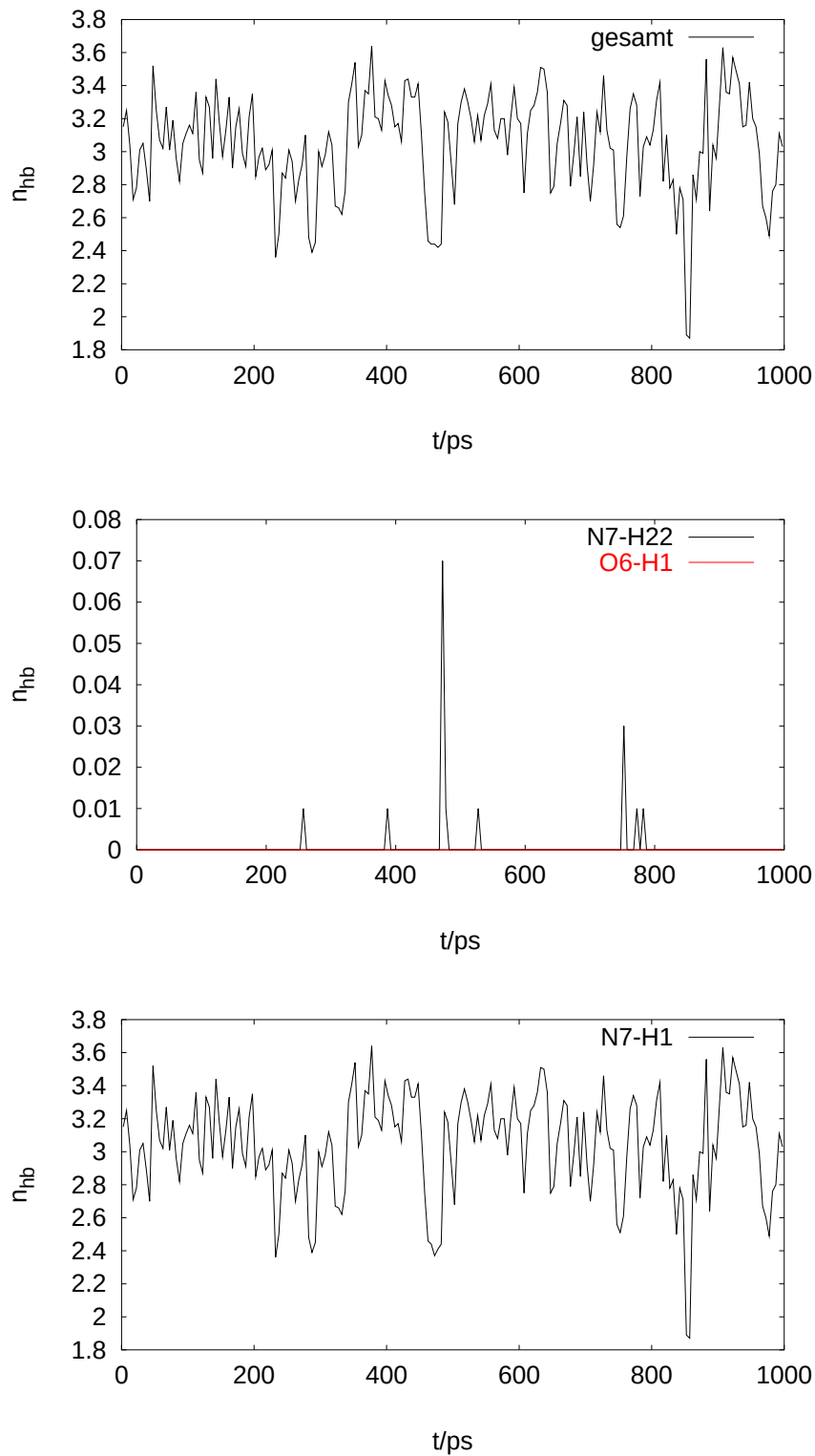


Abb. A.6: Gesamtanzahl: Wasserstoffbrücken, Hoogsteen-Anteil, N7-H1-Anteil in Ebene 3 des Systems d[GGGG]₄/Sr, gemittelt wurde jeweils über einen Zeitbereich von 5 ps

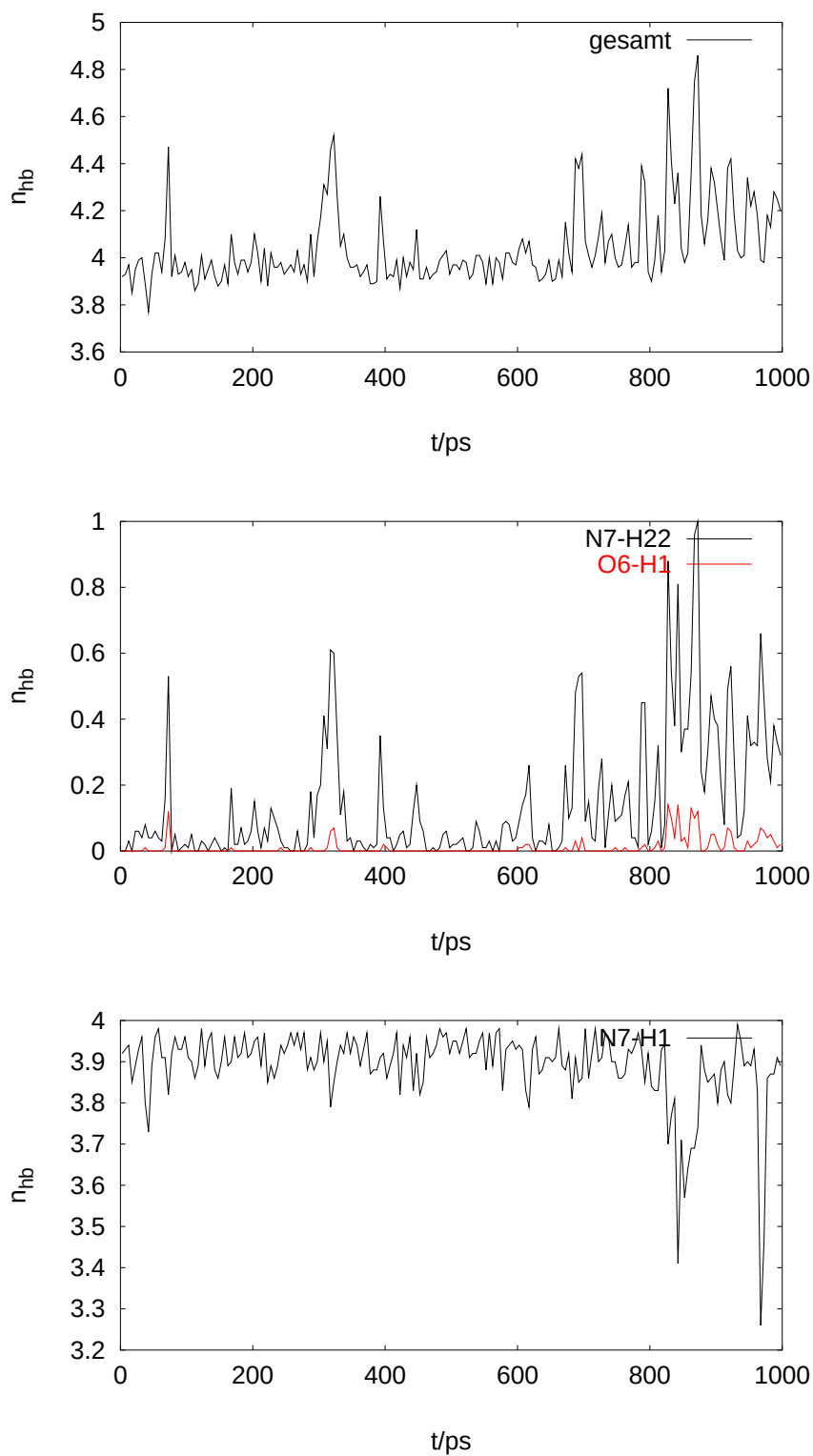


Abb. A.7: Gesamtanzahl: Wasserstoffbrücken, Hoogsteen-Anteil, N7-H1-Anteil in Ebene 4 des Systems d[GGGG]₄/Sr, gemittelt wurde jeweils über einen Zeitbereich von 5 ps

A.2.6 Energiebetrachtungen

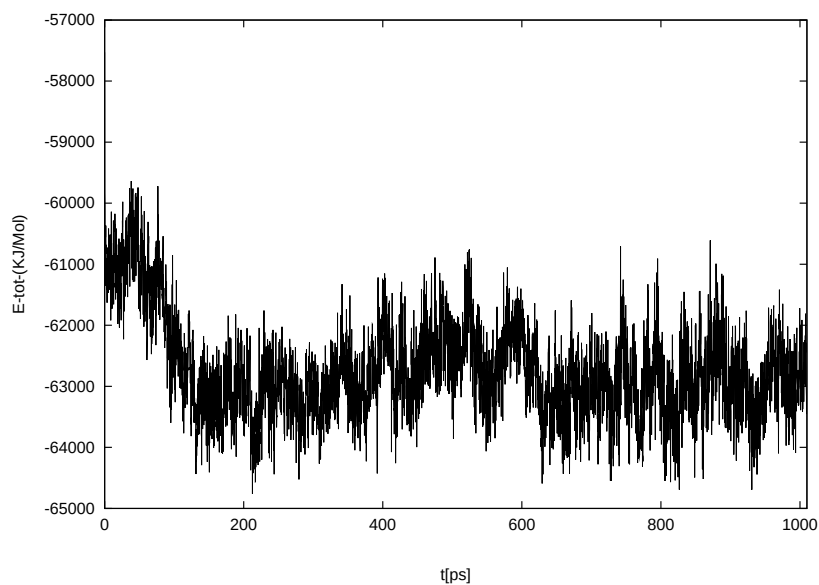


Abb. A.8: Verlauf der Gesamtenergie für das System d[GGGG]₄/Mg

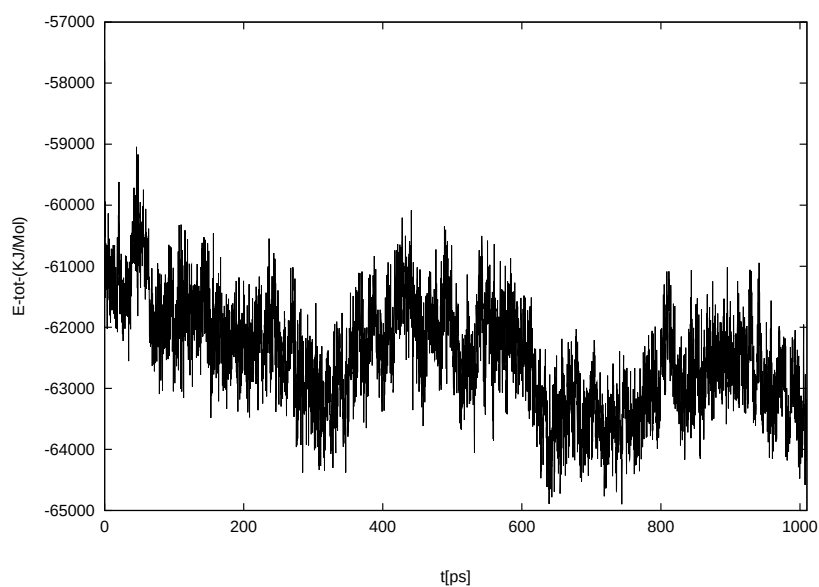


Abb. A.9: Verlauf der Gesamtenergie für das System d[GGGG]₄/Sr

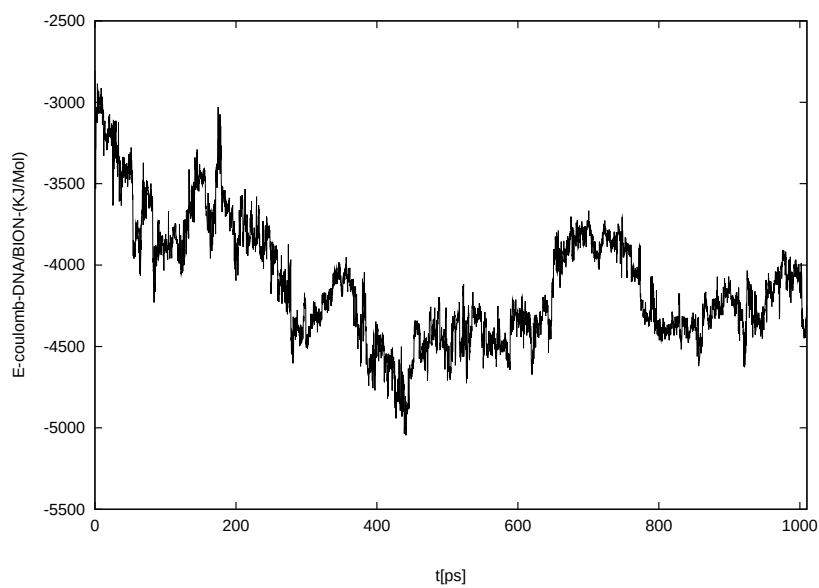


Abb. A.10: Verlauf der Coulombenergie DNA/BI für das System $d[\text{GGGG}]_4/\text{Mg}$

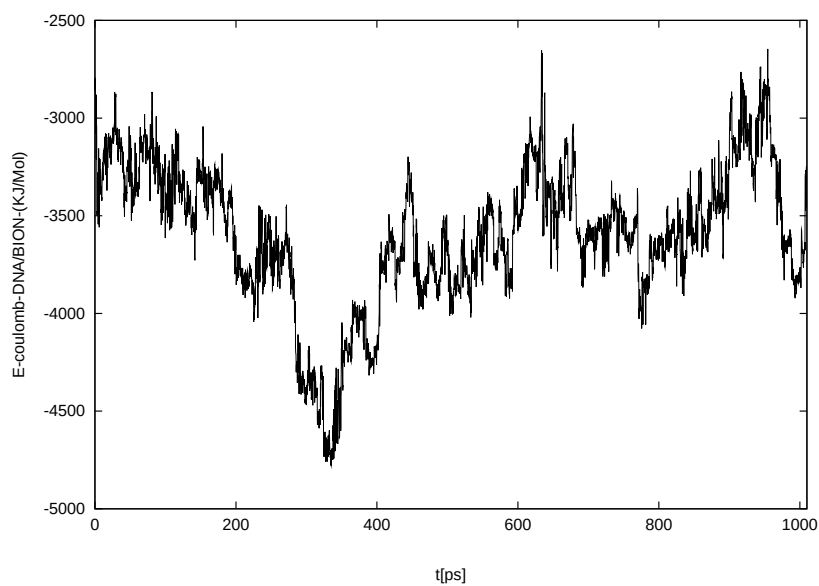


Abb. A.11: Verlauf der Coulombenergie DNA/BI für das System $d[\text{GGGG}]_4/\text{Sr}$

A.3 Startbedingungen

A.3.1 Kationenfluktuation

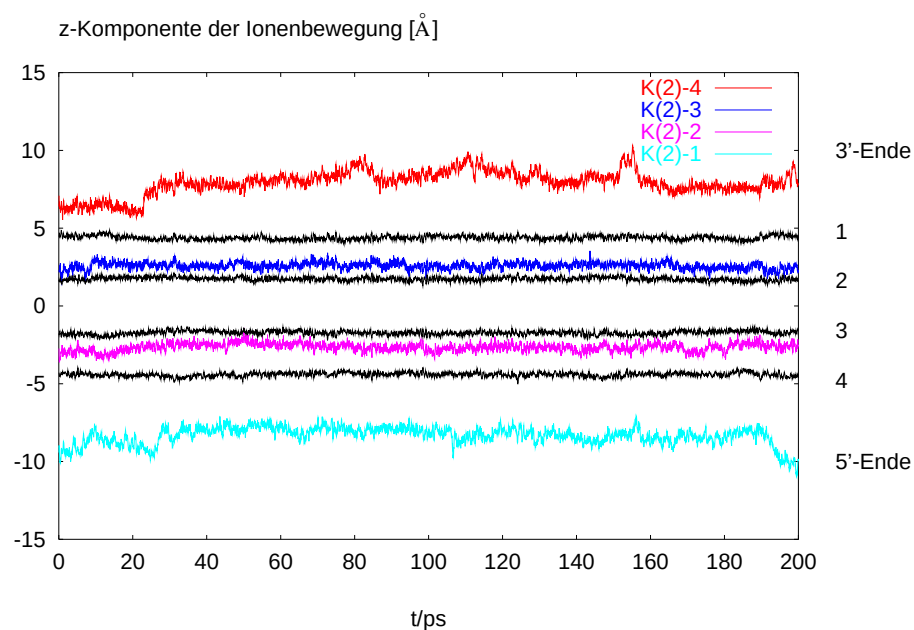


Abb. A.12: Kationenbewegung entlang der helikalen Achse für das K(2)-System

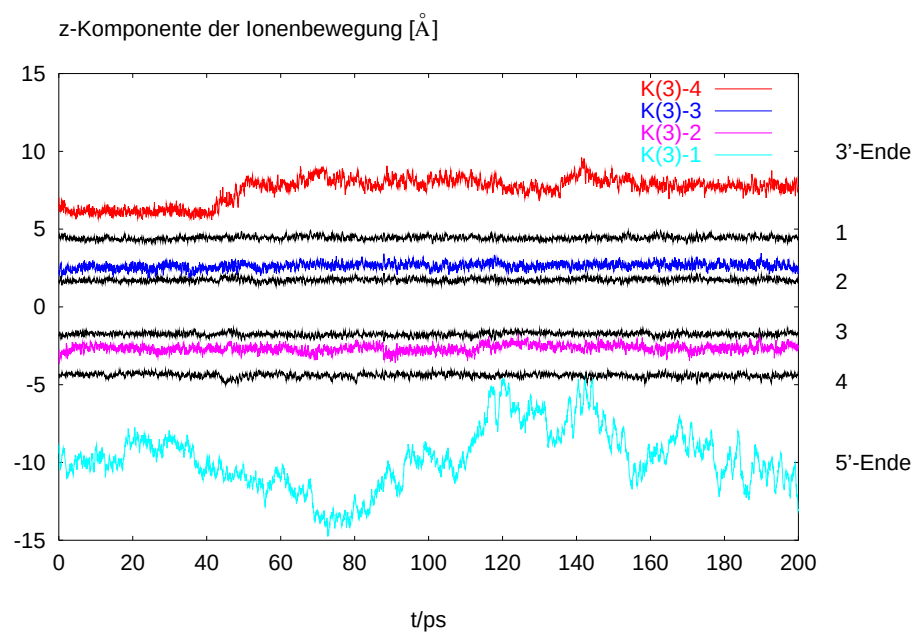


Abb. A.13: Kationenbewegung entlang der helikalen Achse für das K(3)-System

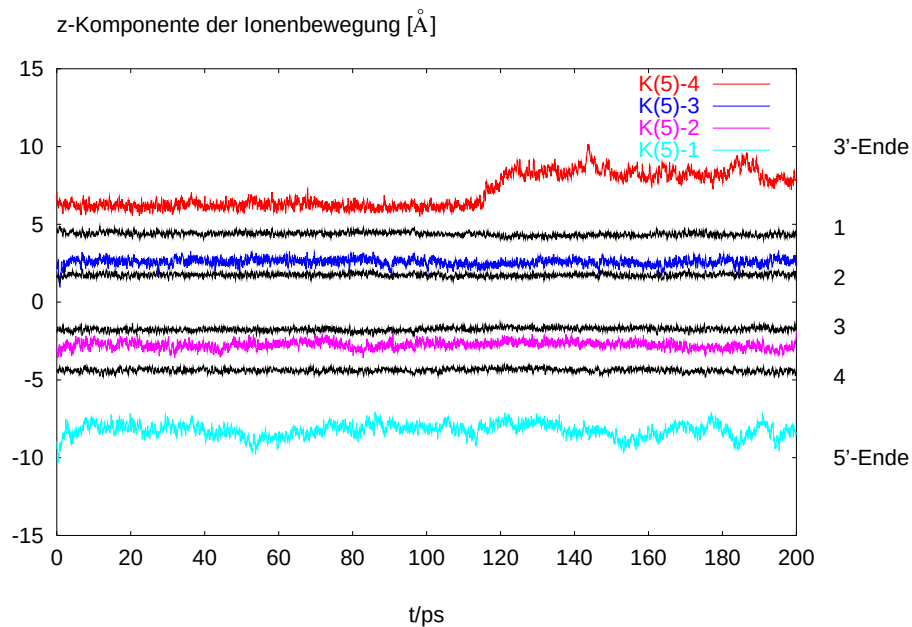


Abb. A.14: Kationenbewegung entlang der helikalen Achse für das K(5)-System

A.3.2 Geometrische Größen

$\langle d_{(O6-O6)} \rangle_{t,n}$ [Å]	Ebene 1	Ebene 2	Ebene 3	Ebene 4
d[GGGG] ₄ /K(1)	3,16 ± 0,19	2,82 ± 0,07	2,87 ± 0,11	2,99 ± 0,16
d[GGGG] ₄ /K(2)	3,11 ± 0,16	2,80 ± 0,07	2,83 ± 0,10	3,04 ± 0,19
d[GGGG] ₄ /K(3)	3,14 ± 0,18	2,80 ± 0,07	2,82 ± 0,08	3,04 ± 0,21
d[GGGG] ₄ /K(4)	3,74 ± 0,46	2,94 ± 0,08	3,02 ± 0,16	3,55 ± 0,54
d[GGGG] ₄ /K(5)	3,00 ± 0,15	2,80 ± 0,07	2,85 ± 0,10	3,02 ± 0,14

Tabelle A.6: Mittlere Carbonylsauerstoffabstände mit Standardabweichungen innerhalb der Ebenen des jeweiligen Quadruplexes der Systeme K(1) - K(5)

A.3.3 Energien

	K(1)	K(2)	K(3)	K(4)	K(5)
$\overline{E}_{tot}[kJ/mol]$	$-5,90 \cdot 10^4$	$-5,91 \cdot 10^4$	$-5,89 \cdot 10^4$	$-5,89 \cdot 10^4$	$-5,94 \cdot 10^4$
σ	$0,04 \cdot 10^4$	$0,04 \cdot 10^4$	$0,04 \cdot 10^4$	$0,04 \cdot 10^4$	$0,05 \cdot 10^4$
$\overline{E}_{pot-tot}[kJ/mol]$	$-6,78 \cdot 10^4$	$-6,78 \cdot 10^4$	$-6,76 \cdot 10^4$	$-6,75 \cdot 10^4$	$-6,81 \cdot 10^4$
σ	$0,05 \cdot 10^4$	$0,04 \cdot 10^4$	$0,04 \cdot 10^4$	$0,04 \cdot 10^4$	$0,05 \cdot 10^4$
$\overline{E}_{coul-DNA/DNA}[kJ/mol]$	$-2,83 \cdot 10^3$	$-2,65 \cdot 10^3$	$-2,71 \cdot 10^3$	$-2,91 \cdot 10^3$	$-2,74 \cdot 10^3$
σ	$0,22 \cdot 10^3$	$0,18 \cdot 10^3$	$0,17 \cdot 10^3$	$0,18 \cdot 10^3$	$0,19 \cdot 10^3$
$\overline{E}_{coul-DNA/CI}[kJ/mol]$	$-6,23 \cdot 10^3$	$-6,50 \cdot 10^3$	$-6,45 \cdot 10^3$	$-5,70 \cdot 10^3$	$-6,70 \cdot 10^3$
σ	$0,29 \cdot 10^3$	$0,26 \cdot 10^3$	$0,23 \cdot 10^3$	$0,52 \cdot 10^3$	$0,33 \cdot 10^3$
$\overline{E}_{coul-CI/CI}[kJ/mol]$	$9,3 \cdot 10^2$	$10,20 \cdot 10^2$	$8,24 \cdot 10^2$	$7,97 \cdot 10^2$	$11,30 \cdot 10^2$
σ	$1,24 \cdot 10^2$	$0,89 \cdot 10^2$	$1,72 \cdot 10^2$	$1,29 \cdot 10^2$	$1,47 \cdot 10^2$
$\overline{E}_{lj-DNA/DNA}[kJ/mol]$	$-1,34 \cdot 10^3$	$-1,36 \cdot 10^3$	$-1,37 \cdot 10^3$	$-1,36 \cdot 10^3$	$-1,35 \cdot 10^3$
σ	$0,03 \cdot 10^3$	$0,09 \cdot 10^3$	$0,04 \cdot 10^3$	$0,03 \cdot 10^3$	$0,02 \cdot 10^3$
$\overline{E}_{lj-DNA/CI}[kJ/mol]$	$4,69 \cdot 10^1$	$4,80 \cdot 10^1$	$4,60 \cdot 10^1$	$6,16 \cdot 10^1$	$4,64 \cdot 10^1$
σ	$1,21 \cdot 10^1$	$1,27 \cdot 10^1$	$1,28 \cdot 10^1$	$1,42 \cdot 10^1$	$1,28 \cdot 10^1$
$\overline{E}_{lj-CI/CI}[kJ/mol]$	$-2,68 \cdot 10^{-3}$	$-3,77 \cdot 10^{-3}$	$-4,61 \cdot 10^{-3}$	$-2,66 \cdot 10^{-3}$	$-7,89 \cdot 10^{-3}$
σ	$1,36 \cdot 10^{-3}$	$2,77 \cdot 10^{-3}$	$4,35 \cdot 10^{-3}$	$1,97 \cdot 10^{-3}$	$5,44 \cdot 10^{-3}$
$\overline{\mathbf{E}}_{coul} + \overline{\mathbf{E}}_{lj}[\mathbf{kJ/mol}]$	$-9,43 \cdot 10^3$	$-9,44 \cdot 10^3$	$-9,66 \cdot 10^3$	$-9,11 \cdot 10^3$	$-9,62 \cdot 10^3$
$(\overline{\mathbf{E}}_{coul} + \overline{\mathbf{E}}_{lj})_{DNA/CI}$ [kJ/mol]	$-6,19 \cdot 10^3$	$-6,46 \cdot 10^3$	$-6,41 \cdot 10^3$	$-5,64 \cdot 10^3$	$-6,66 \cdot 10^3$

Tabelle A.7: Mittlere Gesamtenergie, gesamte potentielle Energie sowie Coulomb- (DNA/CI) (CI/CI) (DNA/DNA) und entsprechende Lennard-Jones-Energien für die Systeme K(1) - K(5)

A.4 Temperatureinfluss

A.4.1 Kationenfluktuation

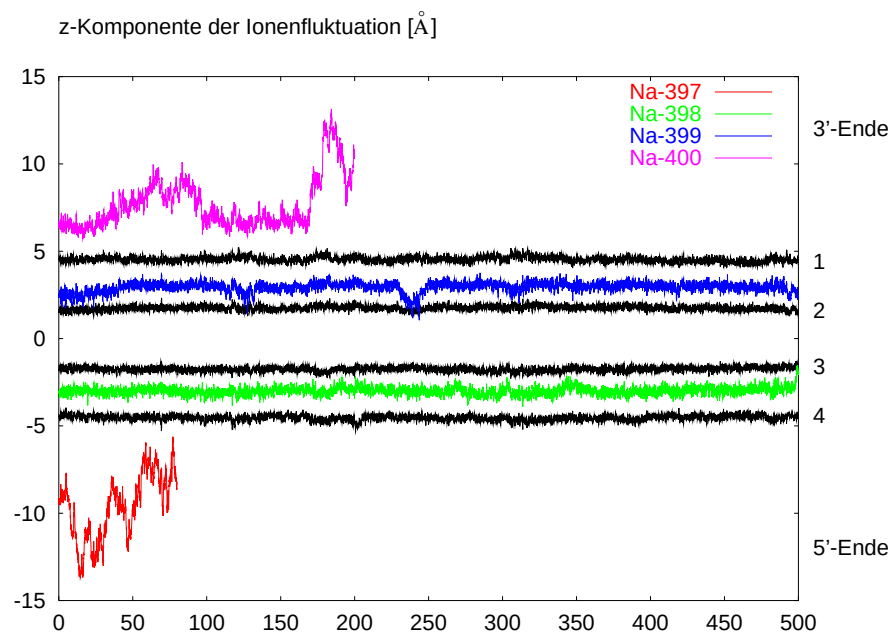


Abb. A.15: Kationenbewegung entlang der helikalen Achse für das Na(340)-System

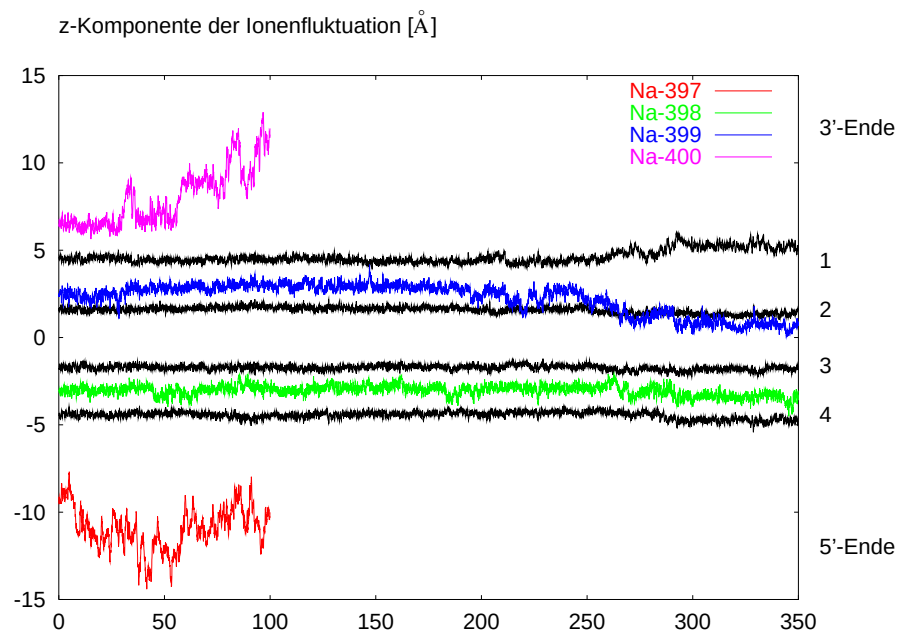


Abb. A.16: Kationenbewegung entlang der helikalen Achse für das Na(360)-System

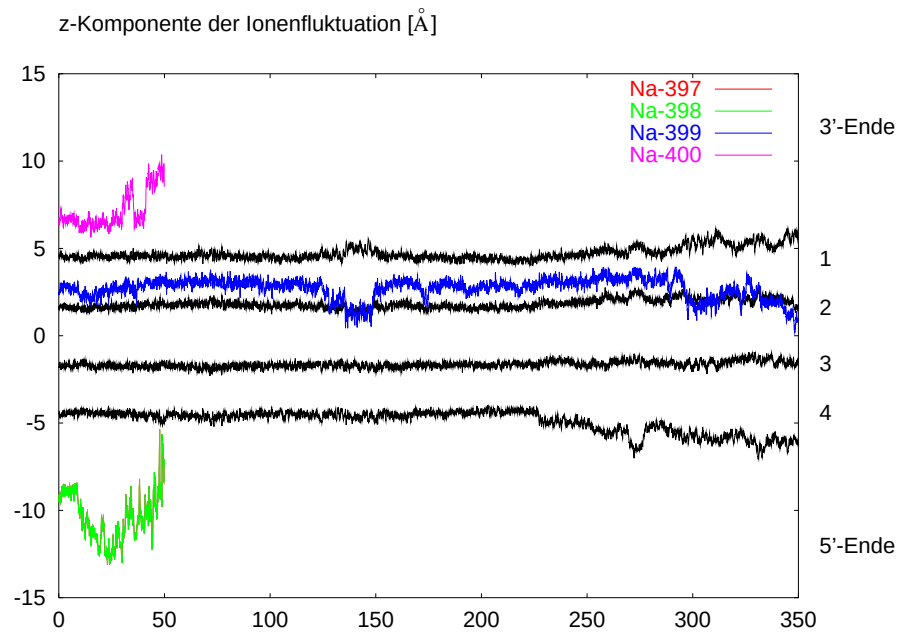


Abb. A.17: Kationenbewegung entlang der helikalen Achse für das Na(400)-System

A.4.2 Ebenenabstände

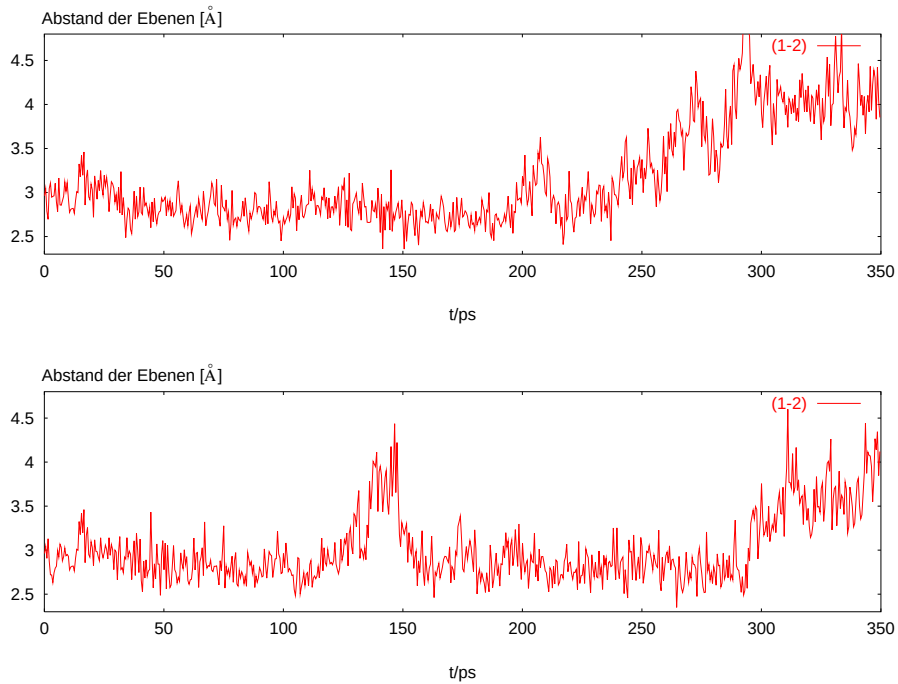


Abb. A.18: Ebenenabstände für die Systeme Na(360) [oben] - Na(400) [unten]

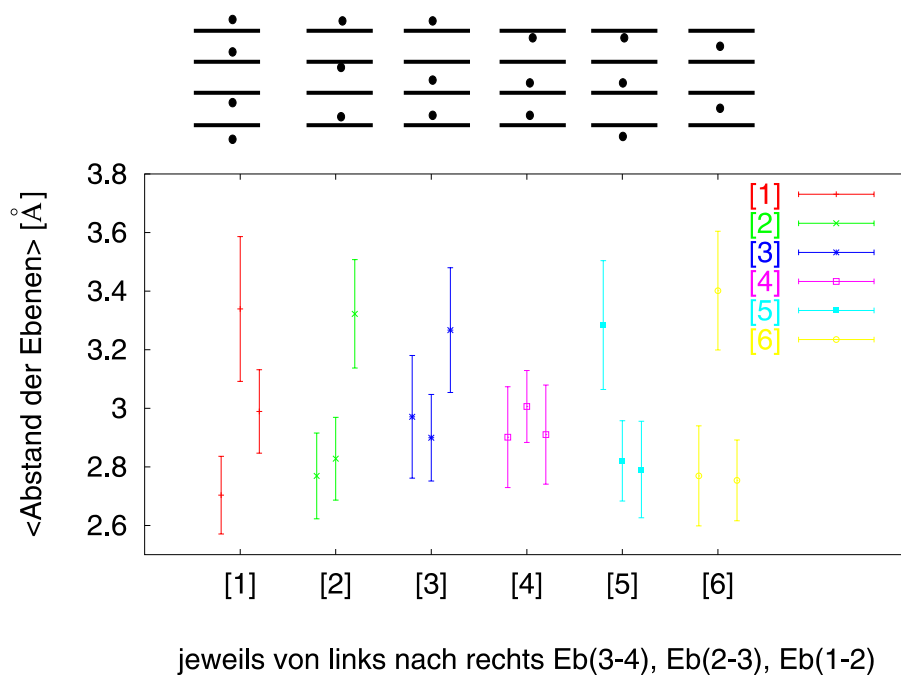


Abb. A.19: Mittlere Ebenenabstände mit Standardabweichung für das Na(300)-System, gemittelt über verschiedene Zeitbereiche [x]; die zugehörigen Besetzungsmuster sind oberhalb der Auftragung eingefügt; das 3'-Ende ist nach oben gerichtet

$\langle \text{Ebenenabstand} \rangle_t$ [Å]	1 - 2	2 - 3	3 - 4
d[GGGG] ₄ /Na(320)	2,83 ± 0,20	3,45 ± 0,24	2,78 ± 0,16
d[GGGG] ₄ /Na(340)	2,82 ± 0,18	3,46 ± 0,27	2,83 ± 0,16
d[GGGG] ₄ /Na(360)	3,15 ± 0,55	3,27 ± 0,25	2,80 ± 0,20
d[GGGG] ₄ /Na(400)	3,00 ± 0,38	3,42 ± 0,29	3,34 ± 0,81

Tabelle A.8: Mittlere Ebenenabstände mit Standardabweichungen innerhalb der Systeme Na(320) - Na(400)

A.4.3 Diederwinkel

		Ebene 1 (3')	Ebene 2	Ebene 3	Ebene 4 (5')
Na(300)	$\langle \delta \rangle_t$	0,49°	2,00°	-0,66°	-1,24°
	σ	11,75°	11,43°	10,98°	11,07°
Na(320)	$\langle \delta \rangle_t$	-1,01°	-0,19°	0,59°	1,75°
	σ	12,95°	11,25°	12,26°	13,34°
Na(340)	$\langle \delta \rangle_t$	-2,84°	-1,73°	-1,67°	-3,47°
	σ	15,17°	12,93°	14,60°	15,25°
Na(360)	$\langle \delta \rangle_t$	-8,98°	6,36°	7,62°	9,88°
	σ	47,99°	20,39°	22,14°	21,49°
Na(400)	$\langle \delta \rangle_t$	-5,94°	6,99°	5,59°	-20,28°
	σ	38,44°	18,30°	17,26°	50,19°

Tabelle A.9: Mittlere Diederwinkel mit Standardabweichung für die Systeme Na(300)
- Na(400)

A.4.4 Wasserstoffbrückenmuster

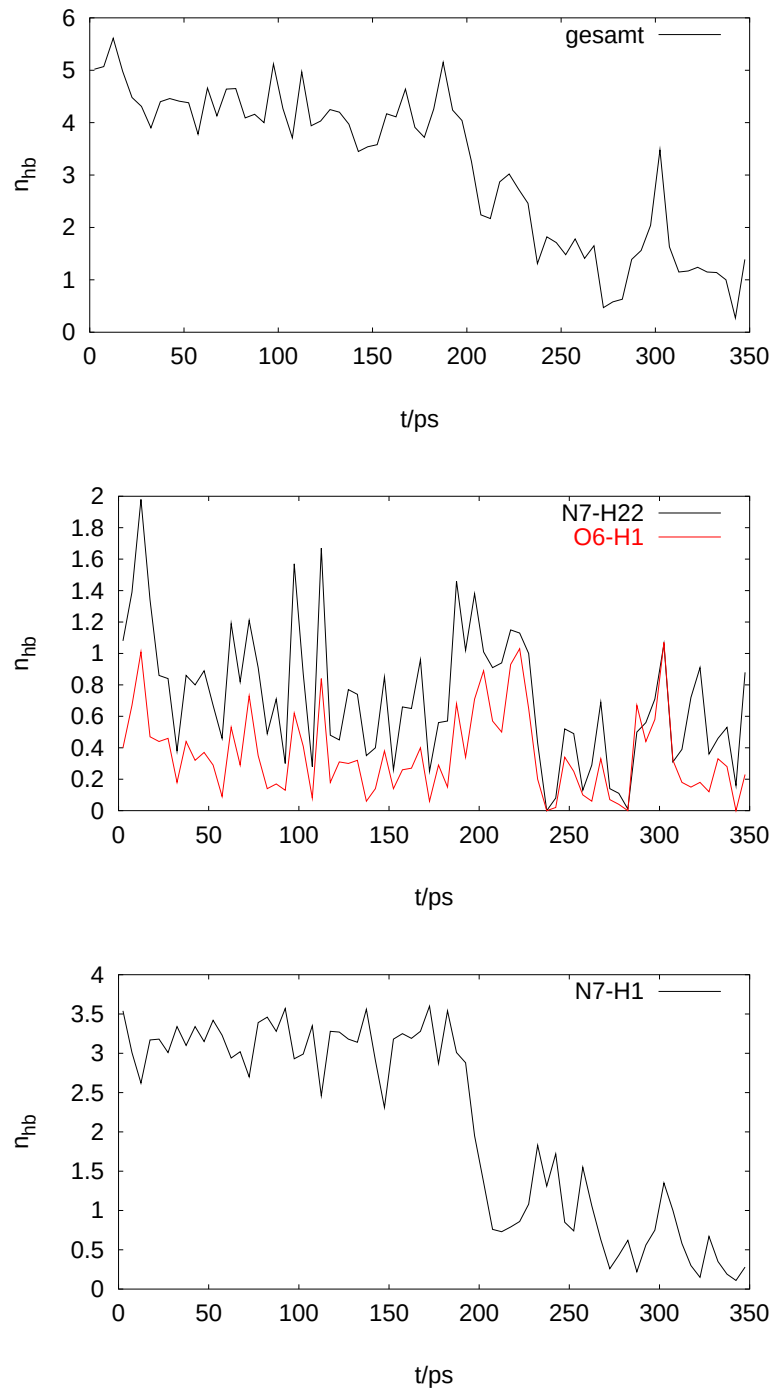


Abb. A.20: Gesamtanzahl: Wasserstoffbrücken, Hoogsteen-Anteil, N7-H1-Anteil in Ebene 1 des Na(360)-Systems, gemittelt wurde jeweils über einen Zeitbereich von 5 ps

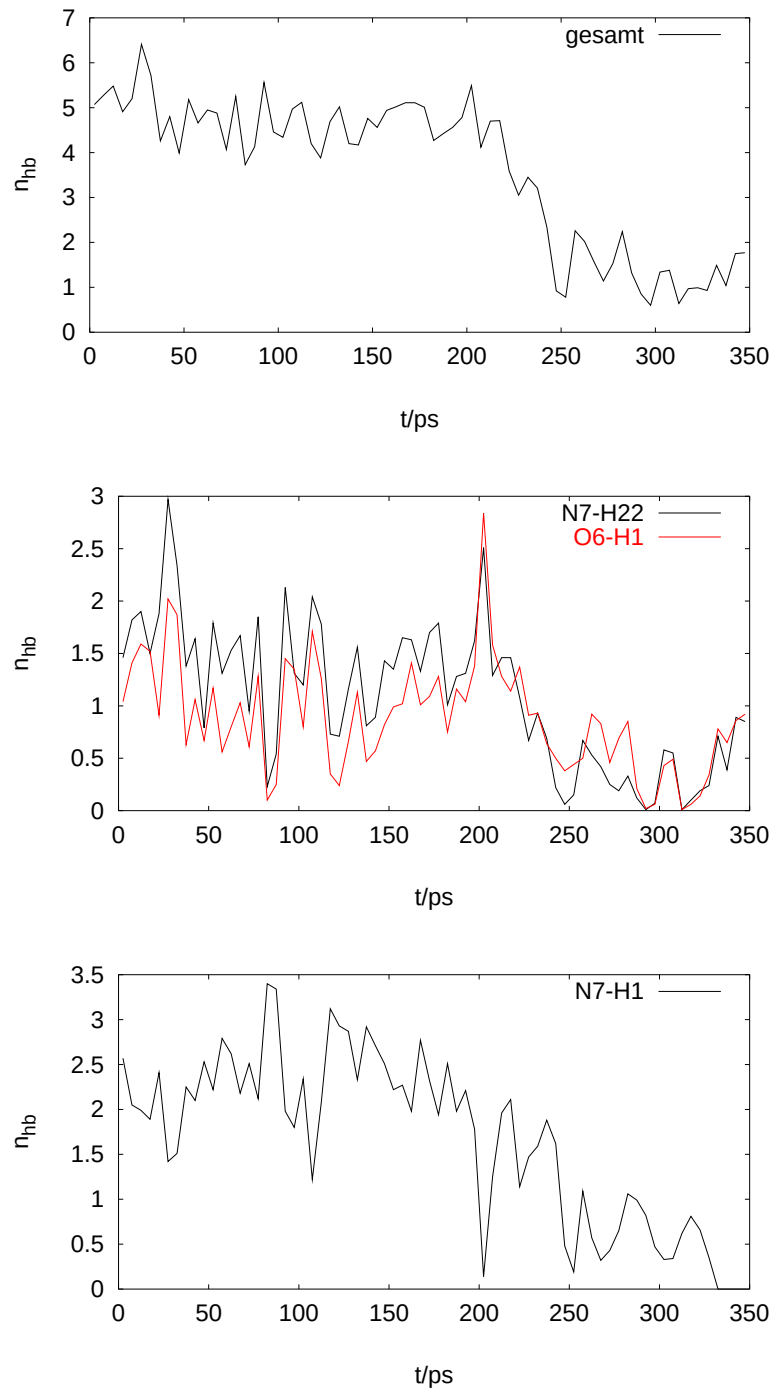


Abb. A.21: Gesamtanzahl: Wasserstoffbrücken, Hoogsteen-Anteil, N7-H1-Anteil in Ebene 4 des Na(400)-Systems, gemittelt wurde jeweils über einen Zeitbereich von 5 ps

A.4.5 Energetische Betrachtungen

	Na(300)	Na(320)	Na(340)	Na(360)	Na(400)
$\overline{E}_{tot}[kJ/mol]$	$-5,80 \cdot 10^4$	$-5,60 \cdot 10^4$	$-5,44 \cdot 10^4$	$-5,21 \cdot 10^4$	$-4,85 \cdot 10^4$
σ	$0,06 \cdot 10^4$	$0,05 \cdot 10^4$	$0,06 \cdot 10^4$	$0,06 \cdot 10^4$	$0,07 \cdot 10^4$
$\overline{E}_{pot-tot}[kJ/mol]$	$-6,67 \cdot 10^4$	$-6,52 \cdot 10^4$	$-6,41 \cdot 10^4$	$-6,24 \cdot 10^4$	$-5,99 \cdot 10^4$
σ	$0,06 \cdot 10^4$	$0,05 \cdot 10^4$	$0,06 \cdot 10^4$	$0,06 \cdot 10^4$	$0,07 \cdot 10^4$
$\overline{E}_{coul-DNA/DNA}[kJ/mol]$	$-2,95 \cdot 10^3$	$-3,04 \cdot 10^3$	$-3,01 \cdot 10^3$	$-3,36 \cdot 10^3$	$-3,21 \cdot 10^3$
σ	$0,21 \cdot 10^3$	$0,27 \cdot 10^3$	$0,23 \cdot 10^3$	$0,30 \cdot 10^3$	$0,28 \cdot 10^3$
$\overline{E}_{coul-DNA/CI}[kJ/mol]$	$-5,83 \cdot 10^3$	$-5,64 \cdot 10^3$	$-5,97 \cdot 10^3$	$-5,57 \cdot 10^3$	$-5,58 \cdot 10^3$
σ	$0,71 \cdot 10^3$	$0,29 \cdot 10^3$	$0,35 \cdot 10^3$	$0,36 \cdot 10^3$	$0,30 \cdot 10^3$
$\overline{E}_{coul-CI/CI}[kJ/mol]$	$6,88 \cdot 10^2$	$5,51 \cdot 10^2$	$5,57 \cdot 10^2$	$6,06 \cdot 10^2$	$5,27 \cdot 10^2$
σ	$2,36 \cdot 10^2$	$2,20 \cdot 10^2$	$2,50 \cdot 10^2$	$1,74 \cdot 10^2$	$1,40 \cdot 10^2$
$\overline{E}_{lj-DNA/DNA}[kJ/mol]$	$-1,35 \cdot 10^3$	$-1,33 \cdot 10^3$	$-1,34 \cdot 10^3$	$-1,30 \cdot 10^3$	$-1,26 \cdot 10^3$
σ	$0,03 \cdot 10^3$	$0,04 \cdot 10^3$	$0,03 \cdot 10^3$	$0,03 \cdot 10^3$	$0,06 \cdot 10^3$
$\overline{E}_{lj-DNA/CI}[kJ/mol]$	$8,89 \cdot 10^1$	$8,34 \cdot 10^1$	$8,26 \cdot 10^1$	$7,96 \cdot 10^1$	$6,80 \cdot 10^1$
σ	$1,70 \cdot 10^1$	$1,51 \cdot 10^1$	$1,50 \cdot 10^1$	$1,67 \cdot 10^1$	$2,26 \cdot 10^1$
$\overline{E}_{lj-CI/CI}[kJ/mol]$	$-6,95 \cdot 10^{-3}$	$-2,97 \cdot 10^{-3}$	$-4,03 \cdot 10^{-3}$	$-5,35 \cdot 10^{-3}$	$-4,21 \cdot 10^{-3}$
σ	$6,05 \cdot 10^{-3}$	$3,52 \cdot 10^{-3}$	$4,19 \cdot 10^{-3}$	$3,53 \cdot 10^{-3}$	$3,75 \cdot 10^{-3}$
$\overline{\mathbf{E}}_{coul} + \overline{\mathbf{E}}_{lj}[\mathbf{kJ/mol}]$	$-9,36 \cdot 10^3$	$-9,37 \cdot 10^3$	$-9,68 \cdot 10^3$	$-9,54 \cdot 10^3$	$-9,45 \cdot 10^3$
$(\overline{\mathbf{E}}_{coul} + \overline{\mathbf{E}}_{lj})_{DNA/CI}$ [kJ/mol]	$-5,74 \cdot 10^3$	$-5,56 \cdot 10^3$	$-5,89 \cdot 10^3$	$-5,49 \cdot 10^3$	$-5,51 \cdot 10^3$

Tabelle A.10: Mittlere Gesamtenergie, gesamte potentielle Energie sowie Coulomb- (DNA/CI) (CI/CI) (DNA/DNA) und entsprechende Lennard-Jones-Energien für die Systeme Na(300) - Na(400)

A.5 Quadrupele mit gemischten Ionentypen

A.5.1 Folgestrukturen

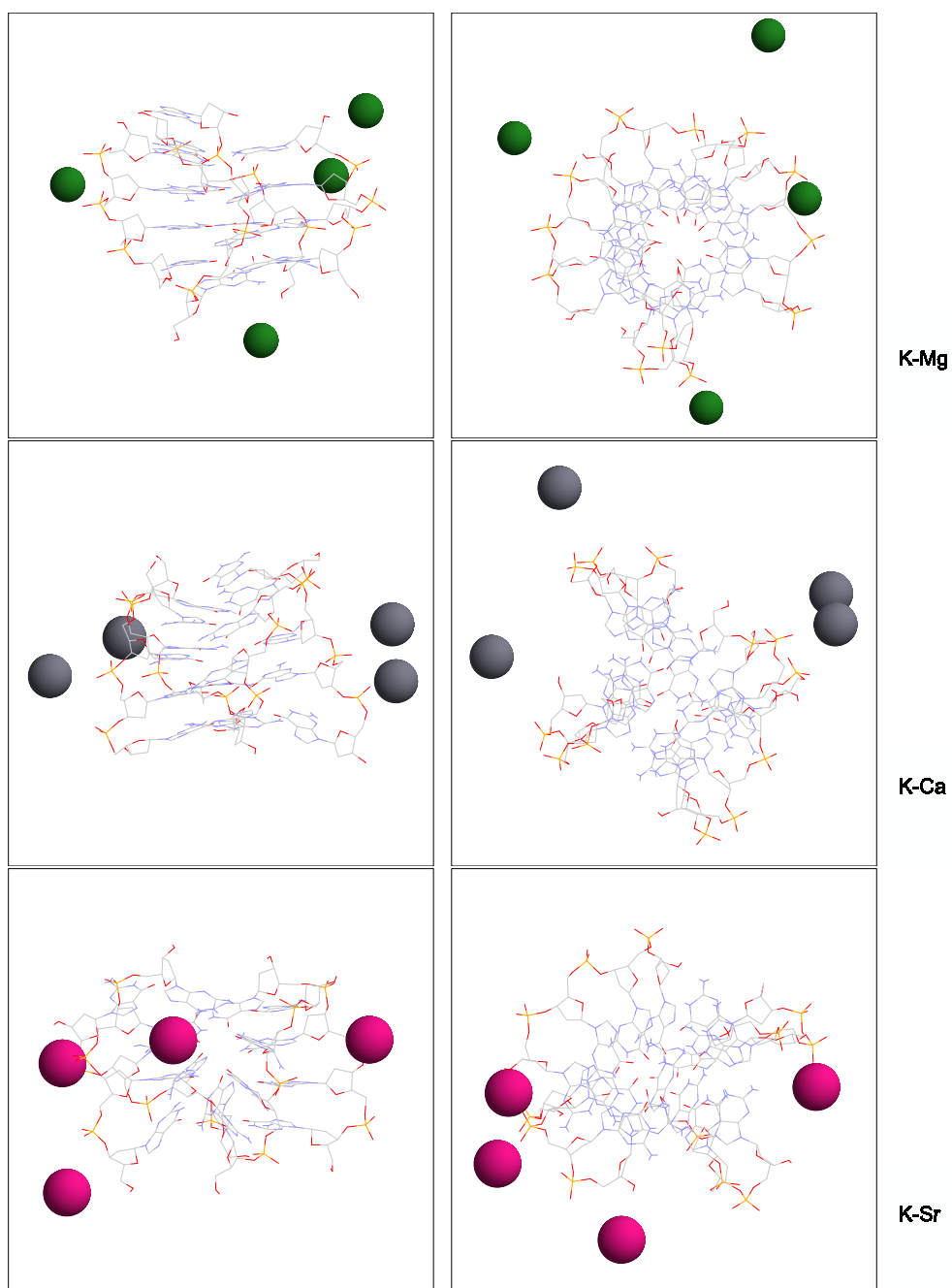


Abb. A.22: Folgestrukturen der simulierten Systeme d(GGGG)₄/K-Mg (610 ps), /K-Ca (760 ps), /K-Sr (480ps) (Aufsicht und Seitenansicht, Erdalkaliionen entsprechend ihres Ionenradius (Kaliumionen nicht eingezeichnet))

A.5.2 Ionenwanderungsprozesse in gemischten Systemen

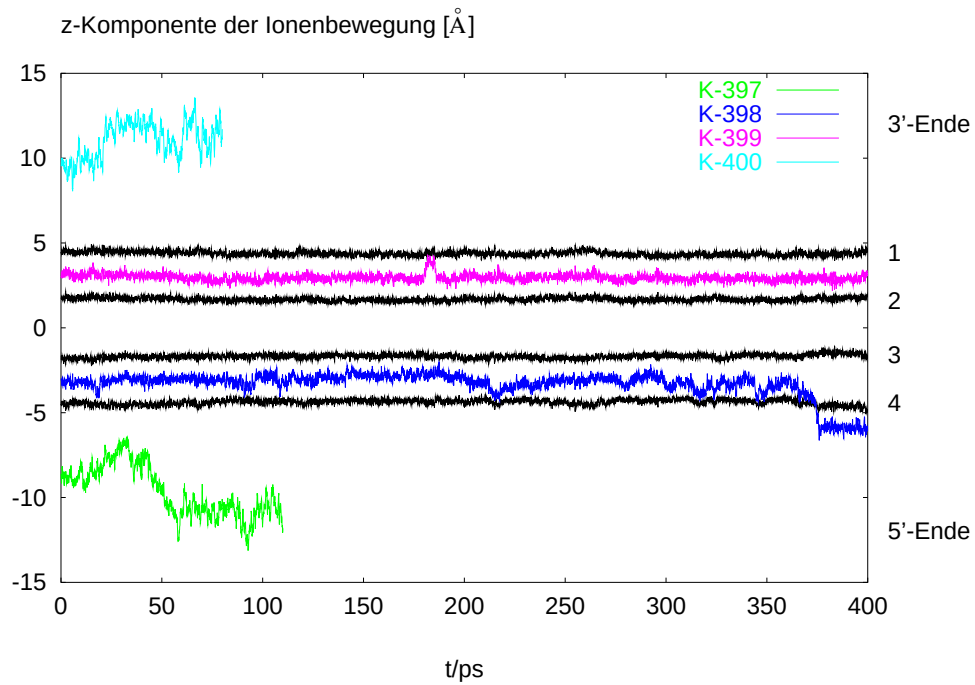


Abb. A.23: Kationenbewegung entlang der helikalen Achse für das d[GGGG]₄/K-Sr-System

A.5.3 O6-O6-Abstände

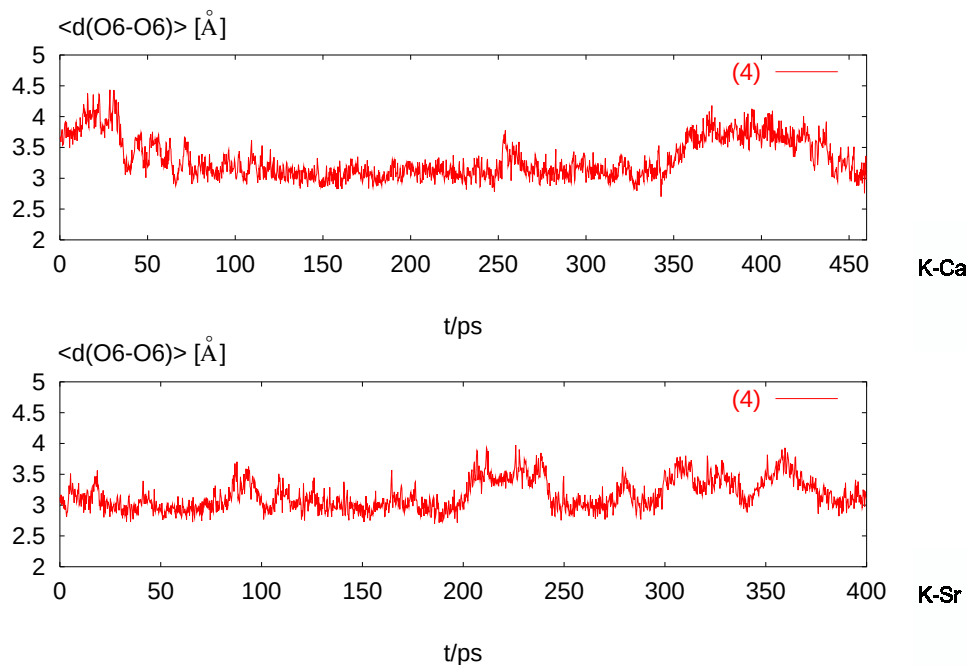


Abb. A.24: Mittlere O6-O6-Abstände innerhalb der Ebene vier des Systems d[GGGG]₄/K-Ca sowie des Systems d[GGGG]₄/K-Sr

A.5.4 Diederwinkel

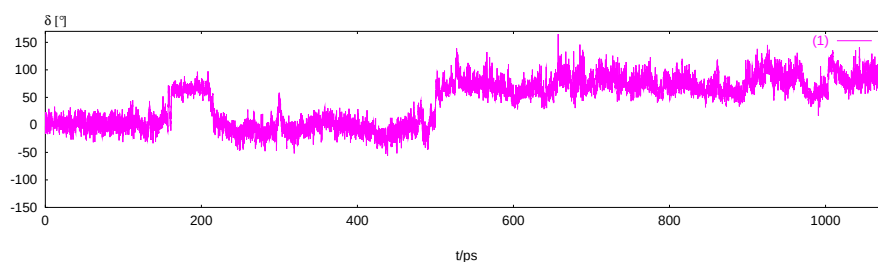


Abb. A.25: Mittlere Diederwinkel innerhalb der Ebene eins des Systems d[GGGG]₄/K-Mg

A.5.5 Wasserstoffbrückenmuster

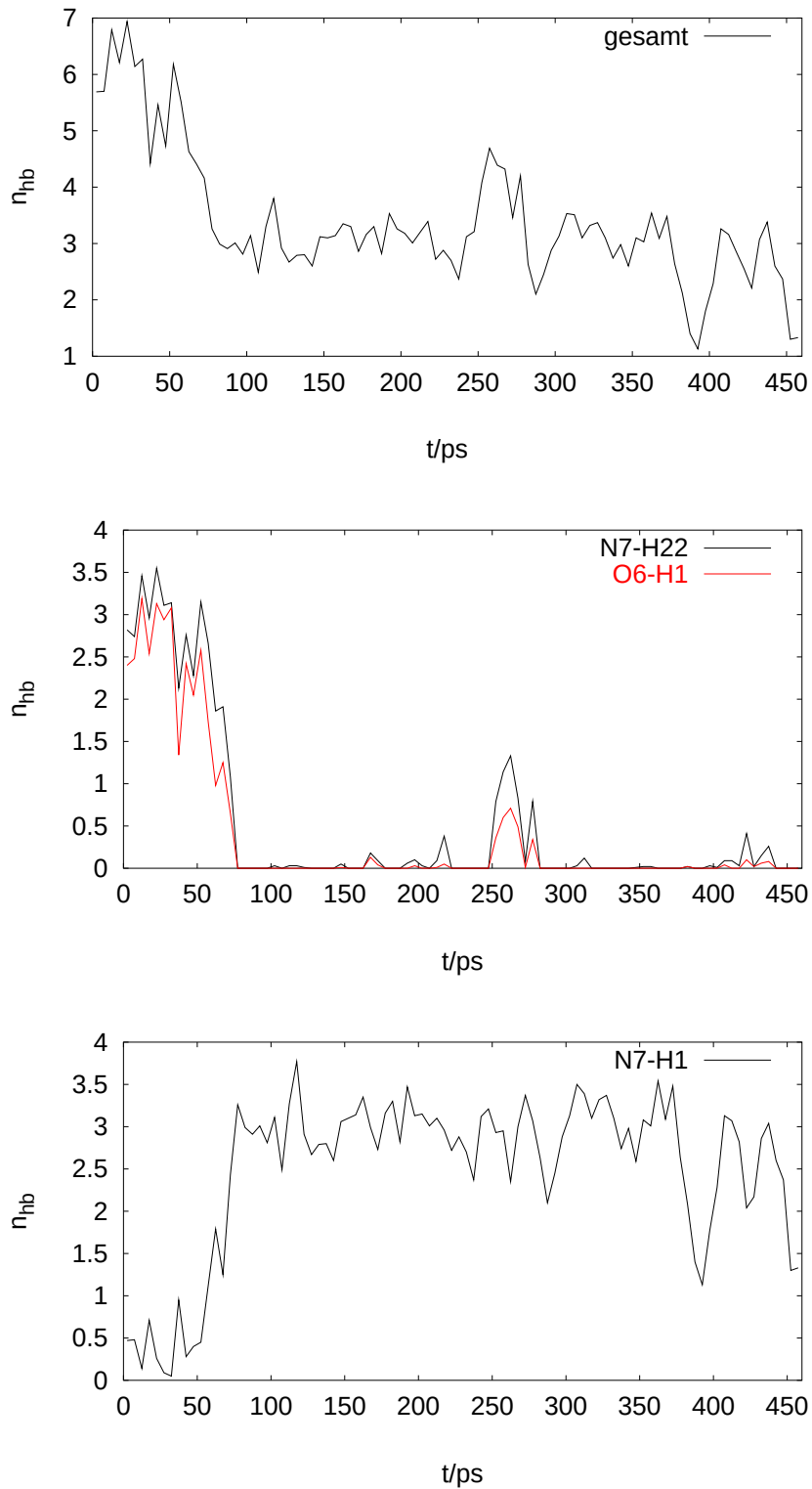


Abb. A.26: Gesamtanzahl: Wasserstoffbrücken, Hoogsteen-Anteil, N7-H1-Anteil in Ebene 1 des K-Ca-Systems, gemittelt wurde jeweils über einen Zeitbereich von 5 ps

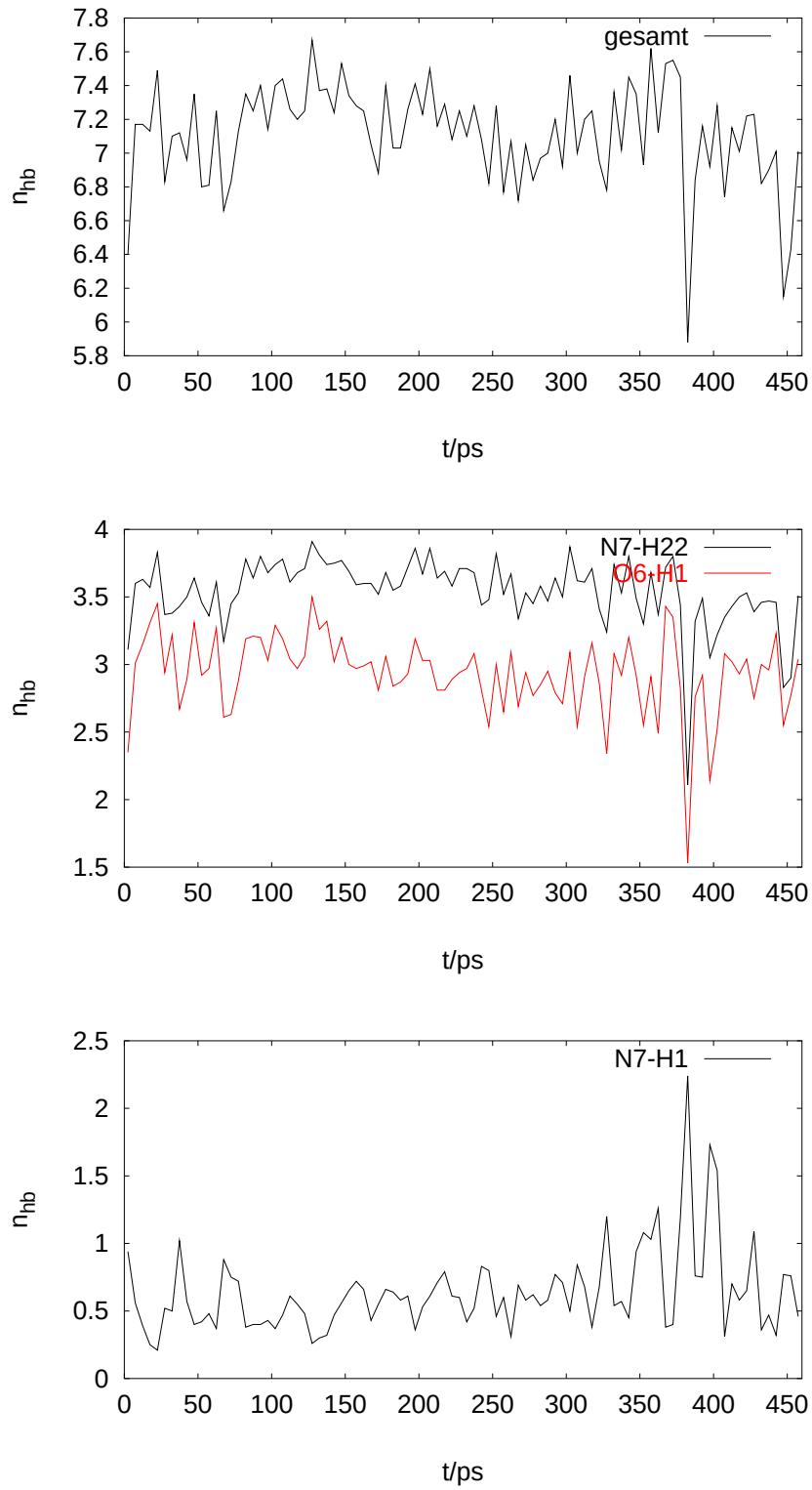


Abb. A.27: Gesamtanzahl: Wasserstoffbrücken, Hoogsteen-Anteil, N7-H1-Anteil in Ebene 2 des K-Ca-Systems, gemittelt wurde jeweils über einen Zeitbereich von 5 ps

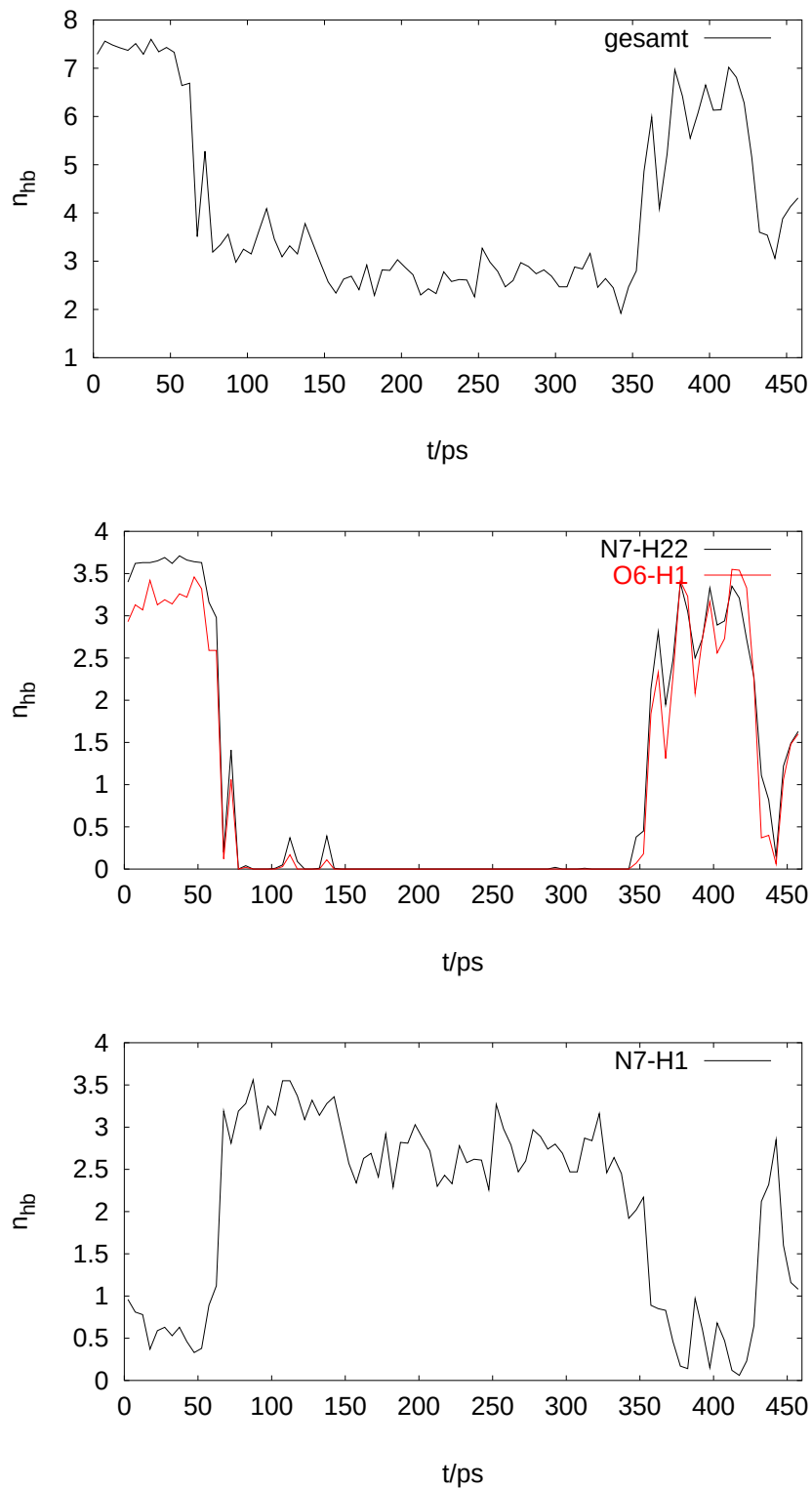


Abb. A.28: Gesamtanzahl: Wasserstoffbrücken, Hoogsteen-Anteil, N7-H1-Anteil in Ebene 3 des K-Ca-Systems, gemittelt wurde jeweils über einen Zeitbereich von 5 ps

A.6 Hydrathülle

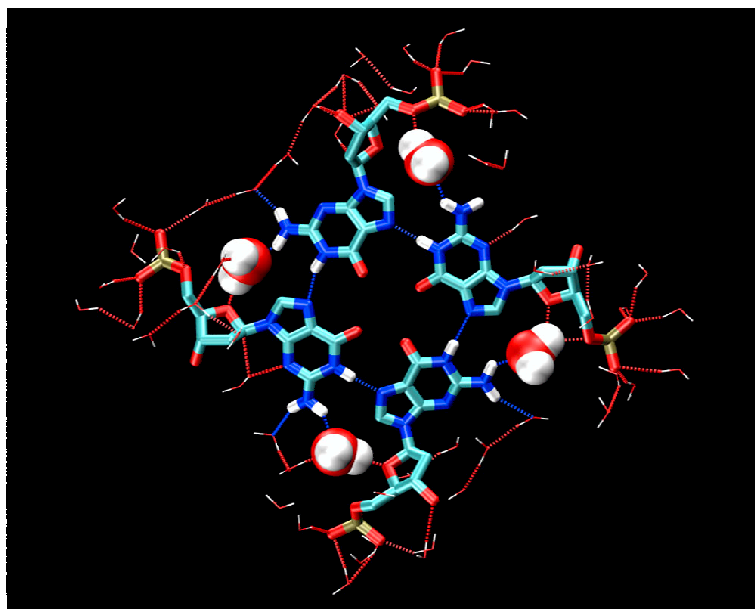


Abb. A.29: Ebene drei des Systems $d[\text{GGGG}]_4/\text{Mg}$

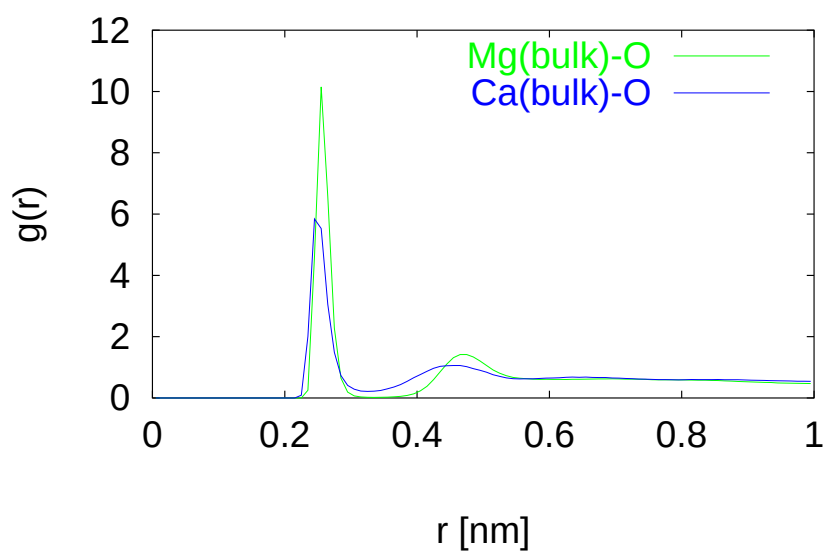


Abb. A.30: Radiale Verteilungsfunktion für das Magnesium- und Strontiumsystem

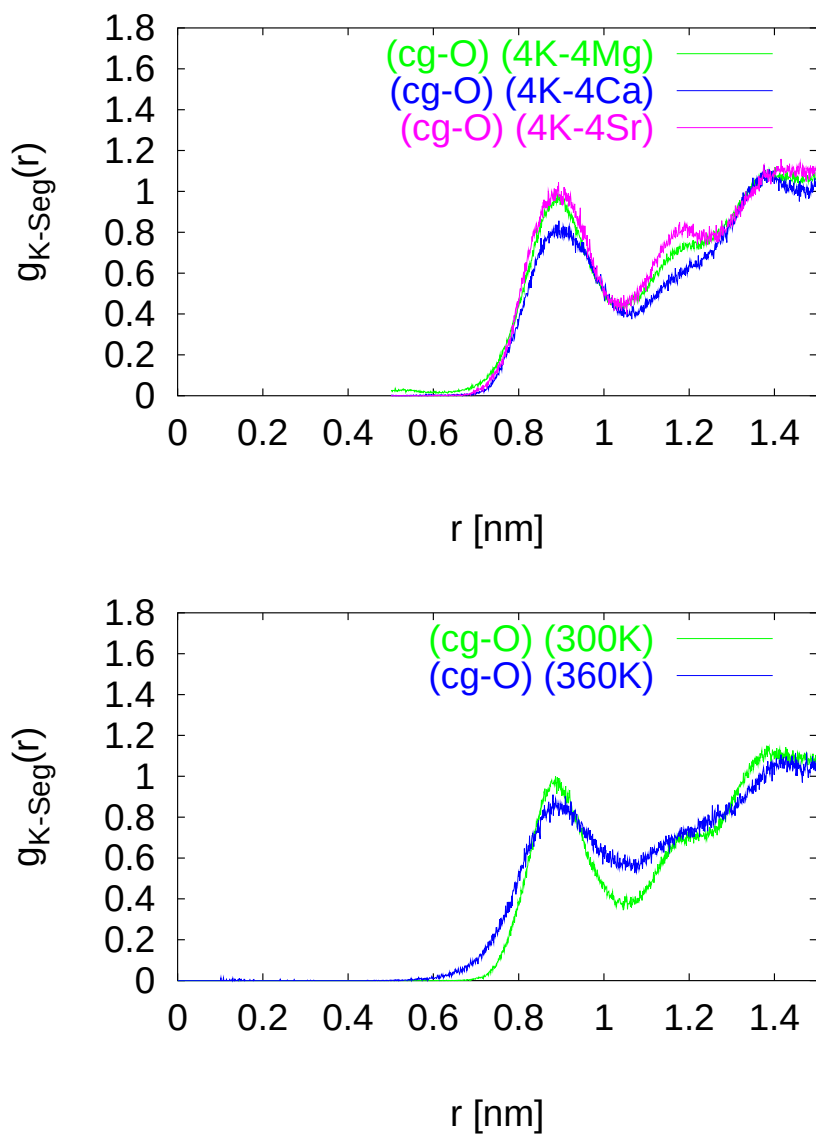


Abb. A.31: Radialsymmetrische Verteilung der Projektionen (Wassermoleküle) in eine Ebene senkrecht zur helikalen Achse durch den Ursprung für die gemischten Systeme sowie für zwei Natriumsysteme bei 300 K und 360 K. Die Histogrammflächen besitzen die Form von Kreisringen.

A.7 Quadruplex-DNA mit erweiterten Basensequenzen

A.7.1 Kationenfluktuation und Strukturen

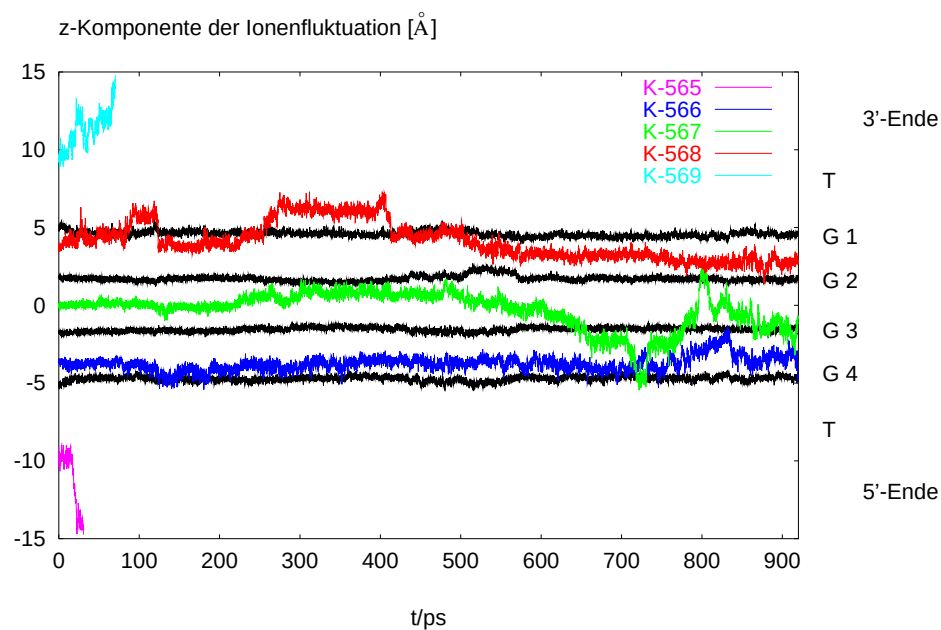


Abb. A.32: Kationenbewegung entlang der helikalen Achse für das System $d[TGGGGT]_4/K$ (o.r.)

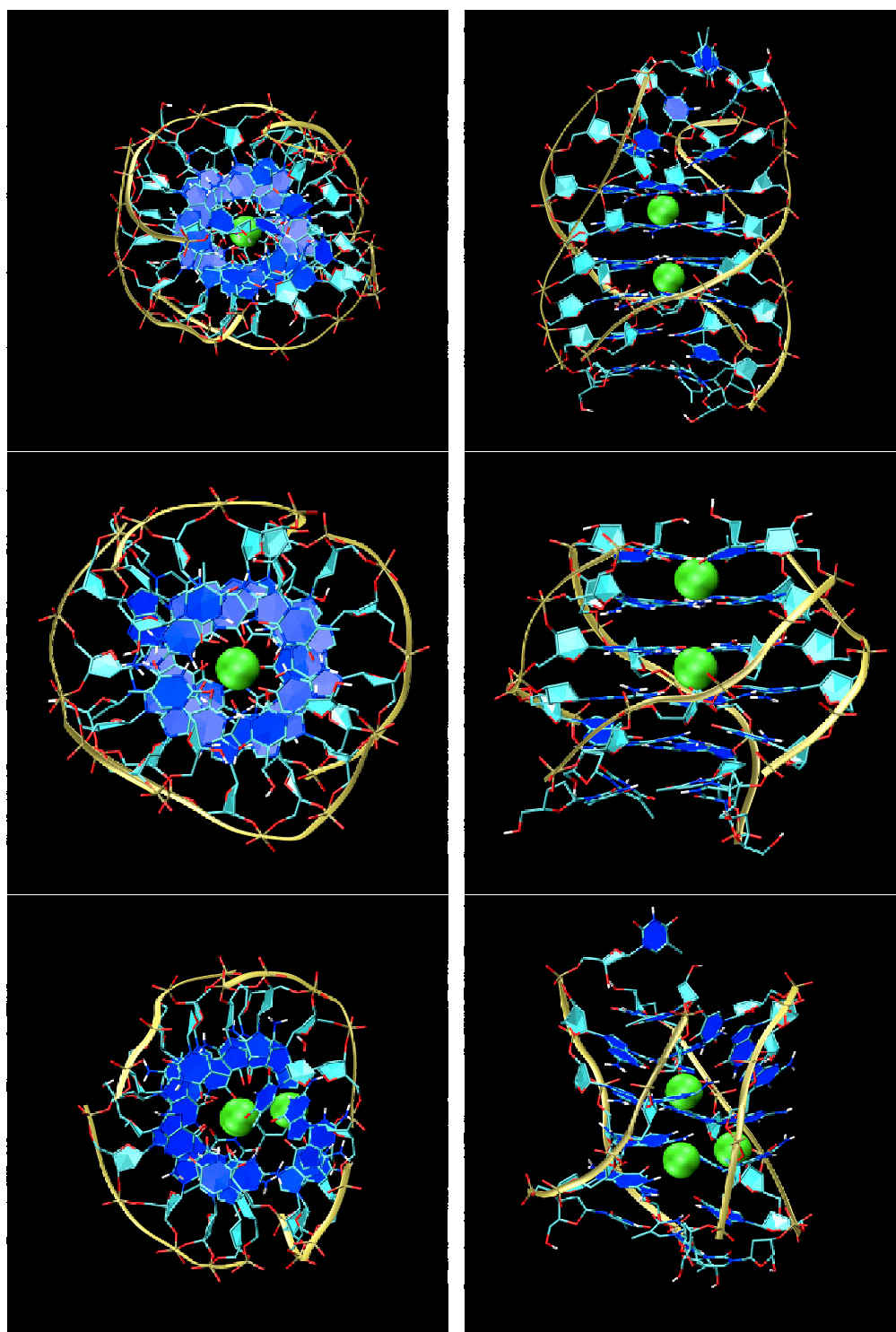


Abb. A.33: Startstrukturen (links) und Folgestrukturen (rechts) für die Systeme $d[\text{TTGGGGTT}]_4/\text{K}$ (m.r.), $d[\text{TGGGGT}]_4/\text{K}$ (m.r.), $d[\text{TGGGGT}]_4/\text{K}$ (o.r.) (Aufsicht und Seitenansicht, 5'-Ende: unten)

A.7.2 Trägheitsradius

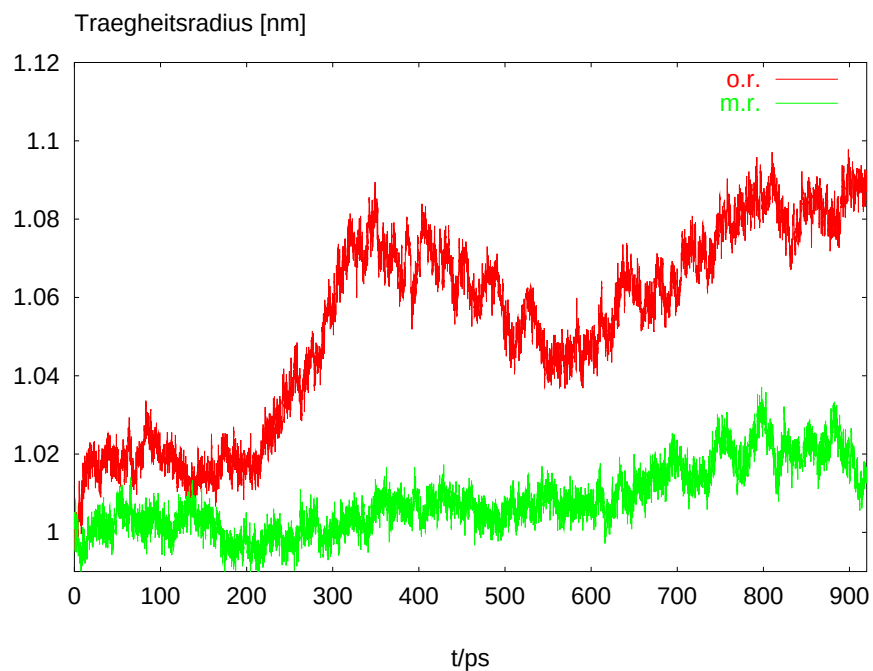


Abb. A.34: Trägheitsradien der Systeme d[TGGGGT]₄/K

A.7.3 Wasserstoffbrückenbindungen

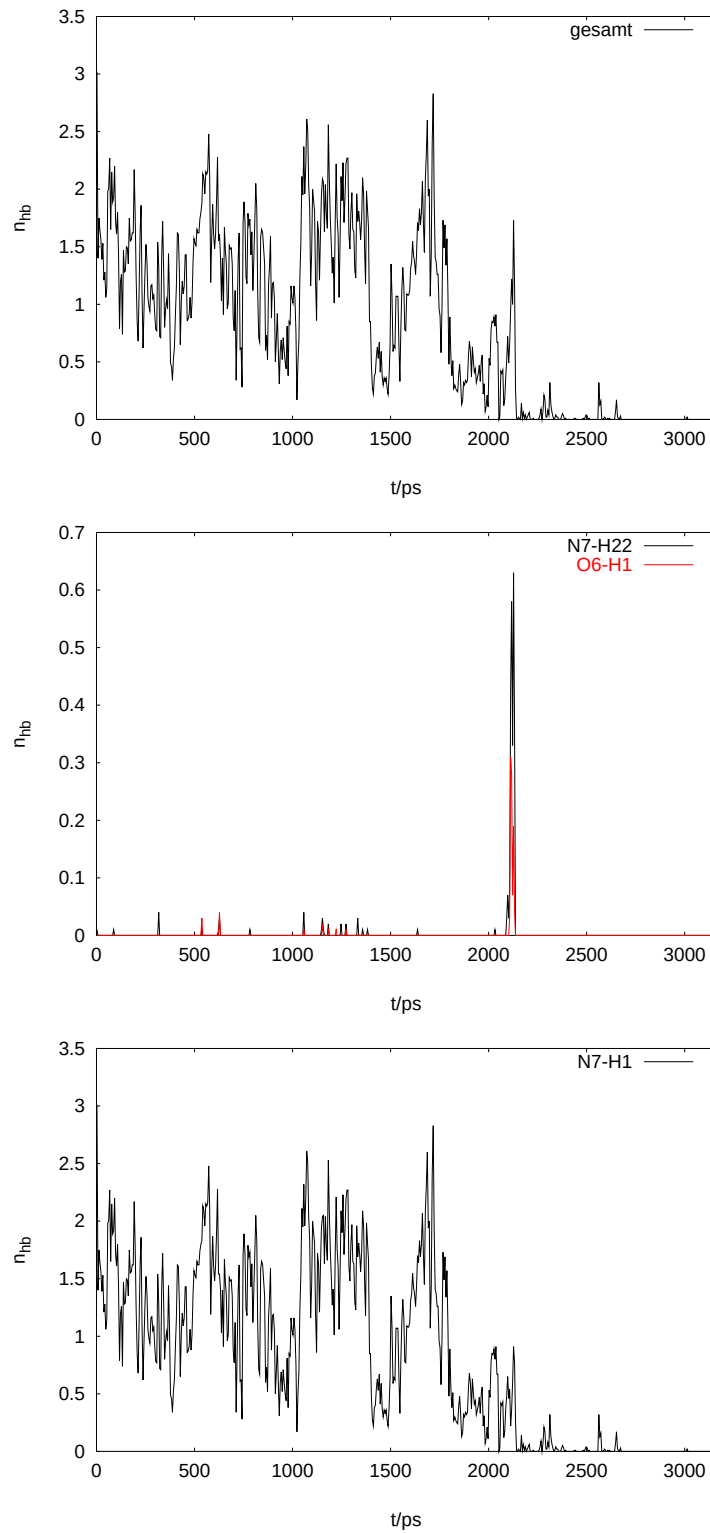


Abb. A.35: Gesamtanzahl: Wasserstoffbrücken, Hoogsteen-Anteil, N7-H1-Anteil in Ebene 2 des Systems d[TTGGGGTT]₄/K (o.r.), gemittelt wurde jeweils über einen Zeitbereich von 5 ps

A.7.4 Projektionsdichte

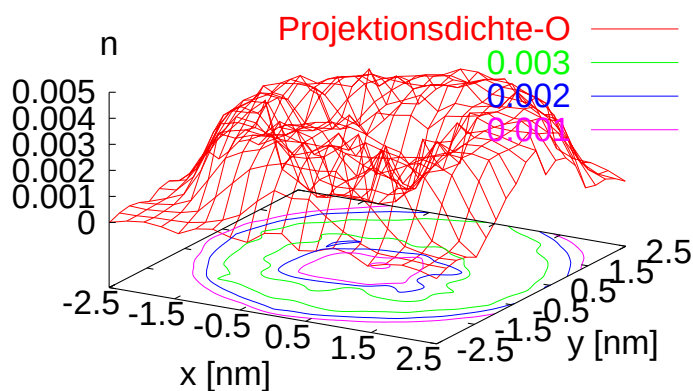


Abb. A.36: Projektionsdichte im System $d[\text{TG GGGT}]_4/\text{K}$ (o.r.); n kann als zeitlicher Mittelwert der Teilchen betrachtet werden, die innerhalb des jeweiligen Histogrammelementes mit der Kantenlänge $0,1 \text{ \AA}$ auftreten.

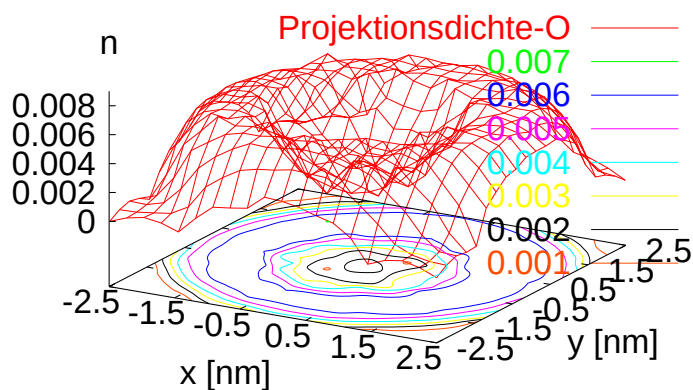


Abb. A.37: Projektionsdichte im System $d[\text{TT GGGG TT}]_4/\text{K}$ (o.r.); n kann als zeitlicher Mittelwert der Teilchen betrachtet werden, die innerhalb des jeweiligen Histogrammelementes mit der Kantenlänge $0,1 \text{ \AA}$ auftreten.

A.7.5 Hydratationsradien

d[TGGGGT] ₄ /K	ohne „restraints“		mit „restraints“	
Bereich	r_{Hyd} [nm]	n_{H_2O}	r_{Hyd} [nm]	n_{H_2O}
Ion 3'-Ende	0,39	1,68	0,36	1,00
Ion 5'-Ende	0,41	2,24	0,41	1,88
Ionen im „bulk“	0,41	8,15	0,41	8,21
N2	0,53	7,13	0,53	4,85
O4* _{Gua}	0,41	2,85	0,39	2,38
O4* _{Thy}	0,39	2,79	0,39	2,43
P _{Gua}	0,51	12,23	0,51	12,36
P _{Thy}	0,51	12,04	0,51	12,61
	h_{Zyl}/r_{Zyl} [nm]	n_{H_2O}	h_{Zyl}/r_{Zyl} [nm]	n_{H_2O}
Furchen _{ges}	1,58/1,11	71,96	1,62/1,09	62,81
Furchen _{Gua}	0,96/1,11	43,62	0,98/1,09	36,48

Tabelle A.11: Hydratationsradien der d[TGGGGT]₄/K-Systeme inkl. der Anzahl eingelagerter Wassermoleküle

d[TTGGGGTT] ₄ /K	ohne „restraints“		mit „restraints“	
Bereich	r_{Hyd} [nm]	n_{H_2O}	r_{Hyd} [nm]	n_{H_2O}
Ion 3'-Ende	0,41	4,51	0,41	0,07
Ion 5'-Ende	0,41	1,07	0,41	0,36
Ionen im „bulk“	0,41	8,49	0,41	8,53
N2	0,55	7,31	0,55	6,17
O4* _{Gua}	0,42	2,92	0,39	2,31
O4* _{Thy}	0,40	2,92	0,40	3,19
P _{Gua}	0,61	20,98	0,61	22,25
P _{Thy}	0,61	21,52	0,61	22,54
	h_{Zyl}/r_{Zyl} [nm]	n_{H_2O}	h_{Zyl}/r_{Zyl} [nm]	n_{H_2O}
Furchen _{ges}	2,34/1,15	124,68	2,20/1,09	101,45
Furchen _{Gua}	1,00/1,15	41,74	0,94/1,09	37,93

Tabelle A.12: Hydratationsradien der d[TTGGGGTT]₄/K-Systeme inkl. der Anzahl eingelagerter Wassermoleküle

A.8 Quadruplex RNA

A.8.1 Van-der-Waals-Oberfläche

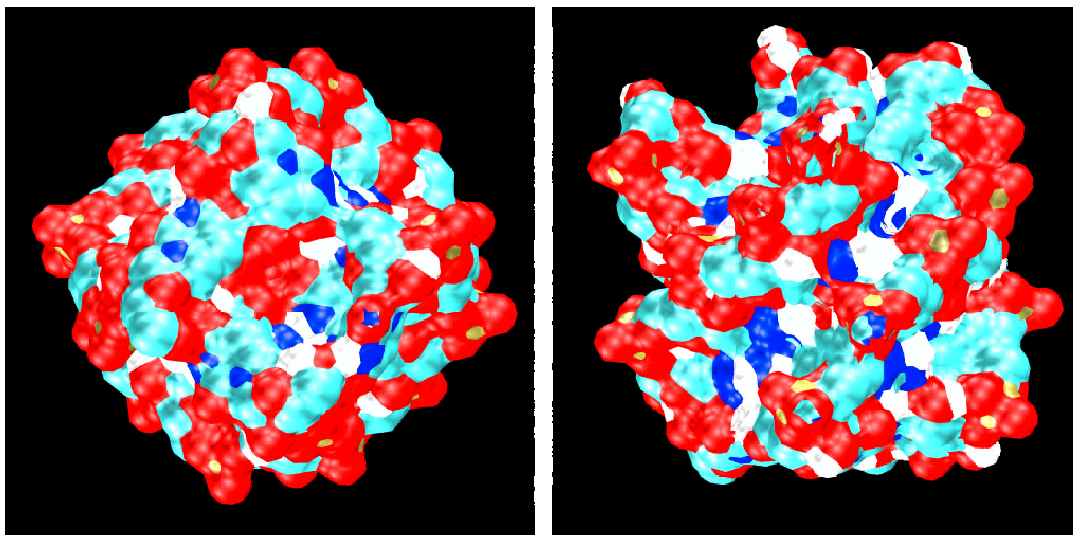


Abb. A.38: Van-der-Waalsche Oberfläche des Systems $r[UGGGGU]_4/K$ zu Beginn der Simulation (Kohlenstoff: mintgrün, Wasserstoff: weiß, Stickstoff: blau, Sauerstoff: rot, Phosphor: gold)

A.8.2 Projektionsdichte

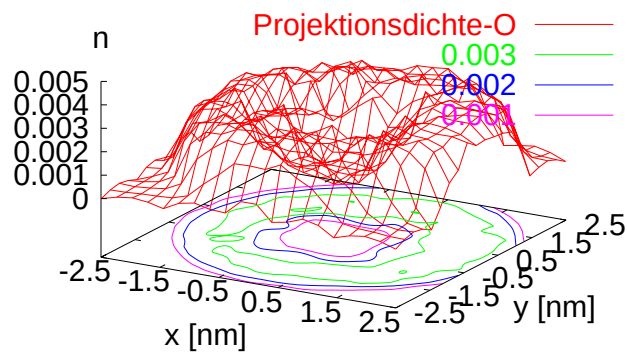


Abb. A.39: Projektionsdichte der Wassermoleküle für das System $r[UGGGGU]_4/K$

Literaturverzeichnis

- [1] *HyperChem: Release 2, Computational Chemistry*. Autodesk Inc., Sausalito CA, USA, 1992.
- [2] F. Aboul-ela, A. I. H. Murchie, D.G. Normann, and D.M.J. Lilley. Solution structure of a parallel-stranded tetraplex formed by d(TG₄T) in the presence of sodium ions by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Mol. Biol.*, 243:458–471, 1994.
- [3] F. Aboul-ela, A.I.H. Murchie, and D.M.J. Lilley. NMR study of parallel-stranded tetraplex formation by the hexanucleotide d(TG₄T). *Nature*, 360:280–282, 1992.
- [4] B. Alberts and L. Jaenicke. *Molekularbiologie der Zelle*. VCH, Weinheim, 2. edition, 1990.
- [5] B.J. Alder and T.E. Wainwright. Phase Transitions for a Hard Sphere System. *J. Chem. Phys.*, 27:1208–1209, 1957.
- [6] M.P. Allen and D.J. Tildesley. *Computer Simulation of Liquids*. Clarendon Press, Oxford, 1987.
- [7] N.L. Allinger. Conformational Analysis. 130. MM2 A Hydrocarbon Force Field Utilizing V1 and V2 Torsional Terms. *J. Am. Chem. Soc.*, 99:8127–8134, 1977.
- [8] Halle B. and Denisov VP. Water and monovalent ions in the minor groove of B-DNA oligonucleotides as seen by NMR. *Biopolymers*, 48(4):210–233, 1998.
- [9] V.I. Bashkirow, H. Schertan, J.A. Solinger, and W.D. Buerstedde. *J. Cell. Biol.*, 136:761–773, 1997.
- [10] H.J.C. Berendsen, J.R. Grigera, and T.P. Straatsma. The Missing Term in Effective Pair Potentials. *J. Phys. Chem.*, 91:6269–6271, 1987.

- [11] H.J.C. Berendsen and W.G.J. Hol. Long-Range Electrostatic Forces. *Europhysics News*, 17:8–10, 1986.
- [12] H.J.C. Berendsen, J.P. Postma, W.F. van Gunsteren, and J. Hermans. Molecular Dynamics with Coupling to an External Bath. *J. Chem. Phys.*, 81:3684–3690, 1984.
- [13] H.J.C. Berendsen, J.P.M. Postma, W.F. van Gunsteren, and J. Hermans. *Interaction Models for Water in Relation to Protein Hydration*. D.Reidel Publishing Company, 1981.
- [14] G.M. Blackburn and M.J. Gait. *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*. Oxford University Press, Oxford, sec. ed. edition, 1996.
- [15] M. Bolton. *Struktur und Dynamik telomerer DNA in Lösung. Kationenspezifischer Einfluss auf intra- und intermolekulare Wechselwirkungen*. PhD thesis, Universität Bielefeld, 2001.
- [16] B.R. Brooks, R.E. Bruccoleri, B.D. Olafson, D.J. States, S. Swaminathan, and M. Karplus. CHARMM: A Program for Macromolecular Energy, Minimization, and Dynamics Calculations. *J. Comput. Chem.*, 4:187, 1983.
- [17] R.M. Brunne, E. Liepinsh, G. Otting, K. Wüthrich, and W.F. van Gunsteren. Hydration of Proteins. A Comparison of Experimental Residence Times of Water Molecules Solvating the Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor with Theoretical Model Calculations. *J. Mol. Biol.*, 231:1040–1048, 1993.
- [18] R.W. Buckheit, J.L. Roberson, C. Lackman-Smith, J.R. Wyatt, T.A. Vickers, and D.J. Ecker. Potent and Specific inhibition of HIV Envelope-mediated Cell Fusion and Virus Binding by G-quartet-forming Oligonucleotide. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 10:1497–1506, 1994.
- [19] F.M. Chen. Supramolecular Self-Assembly of $d(TGG)_4$, Synergistic Effects of K^+ und Mg^{2+} . *Biophys. J.*, 73:348–356, 1997.
- [20] M.E. Davis and J.A. McCammon. Electrostatics in Biomolecular Structure and Dynamics. *Chem. Rev.*, 90:509–521, 1990.
- [21] H. Deng and W.H. Braulin. Duplex to quadruplex equilibrium of the self-complementary oligonucleotide (GGGGCCCC). *Biopolymers*, 35:677–681, 1995.

- [22] J. Deng, Y. Xiong, and M. Sundaralingam. X-ray analysis of an RNA tetraplex (UGGGGU)₄ with divalent Sr²⁺ ions at subatomic resolution (0.61 Å). *Biophysics*, 98 (24):13665–13670, 2001.
- [23] H.R. Drew and R.E. Dickerson. Structure of a B-DNA Dodecamer. III. Geometry of Hydration. *J. Mol. Biol.*, 151:535–556, 1981.
- [24] H.R. Drew and R.E. Dickerson. Structure of B-DNA Dodecamer. III. Geometry of Hydration. *J. Mol. Biol.*, 151:535–556, 1981.
- [25] W. Eimer and T. Dorfmueller. Self-Aggregation of Guanosine 5'-Monophosphate Studied by Dynamic Light-Scattering Techniques. *J. Phys. Chem.*, 96:6790–6800, 1992.
- [26] D. Sun et al. Inhibition of human telomerase by a G-quadruplex interactive compound. *J. Med. Chem.*, 40:2113–2116, 1997.
- [27] F.A. Tanious et al. Substituent position dictates the intercalative DNA-binding mode for anthracene-9,10-dione antitumor drugs. *Biochemistry*, 31:11632–11640, 1992.
- [28] H. Han et al. Accelerated assembly of G-quadruplex structures by a small molecule. *Biochemistry*, 38:6981–6986, 1999.
- [29] H. Sun et al. The Bloom's syndrome helicase unwinds G4 DNA. *J. Biol. Chem.*, 273:27587–27592, 1998.
- [30] J.J. Schuitmaker et al. Photodynamic therapy: a promising modality for the treatment of cancer. *J. Photochem. Photobiol.*, 34:3–12, 1996.
- [31] M. Agbandje et al. Anthracene-9,10-diones as potential anticancer agents. Synthesis, DNA binding, and biological studies on a series of 2,6-disubstituted derivatives. *J. Med. Chem.*, 35:1418–1429, 1992.
- [32] N. Baran et al. The SV40 large T-antigen helicase can unwind four-stranded DNA structures linked by G-quartets. *Nucleic Acids Res.*, 25:297–303, 1997.
- [33] N.V. Anantha et al. Porphyrin binding to quadrupled T₄G₄. *Biochemistry*, 37:2709–2714, 1998.
- [34] R. Giraldo et al. Promotion of parallel DNA quadruplexes by a yeast telomere binding protein: a circular dichroism study. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 91:7658–7662, 1994.

- [35] R. Steff et al. Formation Pathways of a Guanine-Quadruplex DNA Revealed by Molecular Dynamics and Thermodynamic Analysis of the Substates. *Biophysical Journal*, 85:1787–1804, 2003.
- [36] R.J. Welinger et al. Saccharomyces telomeres acquire single-strand TG1-3 tails late in S phase. *Cell*, 72:51–60, 1993.
- [37] M. Falk, K.A. Hartmann Jr., and R.C. Lord. Hydration of Deoxyribonucleic Acid. III. A Spectroscopic Study of the Effect of Hydration on the Structure of Deoribonucleic Acid. *J. Am. Chem. Soc.*, 85:391–394, 1963.
- [38] M. Falk, K.A. Hartmann Jr., and R.C. Lord. Hydration of Desoxyribonucleic Acid. II. An Infrared Study. *J. Am. Chem. Soc.*, 85:387–391, 1963.
- [39] G. Fang and T.R. Cech. The β -subunit of Oxitricha telomere binding protein promotes G-quartet formation by telomeric DNA. *Cell*, 74:875–885, 1993.
- [40] G. Fang and T.R. Cech. Characterization of a G-quartet formation reaction promoted by the β -subunit of the Oxitricha telomere binding protein. *Biochemistry*, 32:11646–11657, 1993.
- [41] O.Y. Fedoroff, M. Salazar, H. Han, V.V. Chemeris, S.M. Kerwin, and L.H. Hurley. NMR-based model of a telomerase-inhibiting compound bound to G-quadruplex DNA. *Biochemistry*, 37:12367–12374, 1998.
- [42] M. Feig and B.M. Pettitt. A molecular simulation picture of DNA hydration around A- and B-DNA. *Biopolymers*, 48(4):199–209, 1998.
- [43] R. Fletcher. *Practical Methods of Optimization*. John Wiley, New York, 1981.
- [44] R.E. Franklin and R.G. Gosling. The Structure of Sodium Thymonucleate Fibres. *Acta Chrystallogr.*, 6:673–677, 1953.
- [45] D. Frenkel and B. Smit. *Understanding Molecular Simulation - From Algorithms to Applications*. Academic Press, San Diego, 1996.
- [46] M. Fry and L.A. Loeb. Human Werner syndrome DNA helicase unwinds tetrahelical structures of the fragile X syndrome repeat sequence d(CGG)_n. *J. Biol. Chem.*, 274:12797–12802, 1999.
- [47] M. Gellert, M.N. Lipsett, and D.R. Davis. Helix Formation by Guanyllic Acid. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 48:2013–2018, 1962.
- [48] C.W. Greider. Telomeres do D-loop-t-loop. *Cell*, 97:419–422, 1999.

- [49] J.D. Griffith, L. Comeau, S. Rosenfield, R.M. Stansel, A. Bianchi, H. Moss, and T. Lange. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell*, 97:503–514, 1999.
- [50] J. Guenot and P.A. Kollman. Conformational and Energetic Effects of Truncating Nonbonded Interactions in an Aqueous Protein Dynamics Simulation. *J. Comput. Chem.*, 14:295–311, 1993.
- [51] R. Haberlandt and S. Fritzsche und G. Peinel und K. Heinzinger. *Molekuldynamik - Grundlagen und Anwendungen*. Vieweg, Braunschweig, 1994.
- [52] S. Haider, G. N. Parkinson, and S. Neidle. Crystal Structure of the Potassium Form of an Oxytricha nova G-quadruplex. *J. Mol. Biol.*, 320:189–200, 2002.
- [53] B. Halle and V.P. Denisov. Water and monovalent ions in the minor groove of B-DNA oligonucleotides as seen by NMR. *Biopolymers*, 48(4):210–233, 1998.
- [54] C.C. Hardin, T. Watson, M. Corregan, and C. Bailey. Cation-Dependent Transition between the Qudruplex and Watson-Crick Hairpin Forms of $d(CGCG_3GCG)$. *Biochemistry*, 31:833–841, 1992.
- [55] J. Hermans, H.J.C. Berendsen, W.F. van Gunsteren, and J.P.M. Postma. A Consistant Empirical Potential for Water-Protein Interactions. *Biopolymers*, 23:1513–1518, 1984.
- [56] Z.I. Hodes, G. Nemethy, and H.A. Scheraga. Model for the conformational analysis of hydrated peptides. Effect of hydration on the conformational stability of the terminally blocked residues of the 20 naturally occurring amino acids. *Biopolymers*, 18(7):1565–1610, 1979.
- [57] R.W. Impey, P.A. Madden, and I.R. McDonald. Hydration and Mobility of Ions in Solution. *J. Phys. Chem.*, 87:5071–5083, 1983.
- [58] E. Izbicka, R.T. Wheelhouse, E. Raymond, K.K. Davidson, R.A. Lawrence, D. Sun, B.E. Windle, L.H. Hurley, and D.D. Von Hoff. Effects of cationic porphyrins as G-Quadruplex interactive agents in human tumor cells. *Cancer Res.*, 59:639–644, 1999.
- [59] N. Jing, R.F. Rando, Y. Pommier, and M.E. Hogan. Ion selective folding of loop domains in apotent anti-HIV oligonucleotide. *Biochemistry*, 36:12498–12505, 1997.

- [60] W.L. Jorgensen. Transferable Intermolecular Potential Functions for Water, Alcohols and Ethers - Application to Liquid Water. *J. Am. Chem. Soc.*, 103:335–340, 1981.
- [61] W.L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J. Madura, R.W. Impey, and M.L. Klein. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.*, 79:926–935, 1983.
- [62] W.L. Jorgensen and J. Tirado-Rives. The OPLS Potential Function for Proteins. Energy Minimizations for Crystals of Cyclic Peptides and Crambin. *J. Am. Chem. Soc.*, 110:1657–1667, 1988.
- [63] C. Kang, X. Zhang, R. Ratliff, R. Moyzis, and A. Rich. Christal Structure of Four-Stranded Oxytricha Telomeric DNA. *Nature*, 356:126–164, 1992.
- [64] B.I. Kankia and L.A. Marky. Folding of the thrombin aptamer into a G-quadruplex with $\text{Sr}(2+)$: stability, heat, and hydration. *J. Am. Cem. Soc.*, 123:10799–10804, 2001.
- [65] A. Kettani, S. Bouaziz, A. Gorin, H. Zhao, R.A. Jones, and D. J. Patel. Solution structure of a Na cation stabilized DNA quadruplex containing GGG and GCGC tetraeds formed by GGGG repeats observed in adeno-associated viral DNA. *J. Mol. Biol.*, 282:619–636, 1998.
- [66] A. Kettani, R.A. Kumar, and D.J. Patel. Solution structure of a DNA quadruplex containing the fragile X syndrome triplet repeat. *J. Mol. Biol.*, 254:638–656, 1995.
- [67] T. Kowall and A. Geiger. Molecular-Dynamics Simulation Study of 18-Crown-6 in Aqueous-Solution. 1. Structure and Dynamics of the Hydration Shell. *J. Phys. Chem.*, 98:6216–6224, 1994.
- [68] P. Kronshage. Wechselwirkung von Alkali- und Erdalkalimetallionen mit Quadruplex G-DNA –Molekulardynamische Simulation–, Diplomarbeit, Universität Bielefeld, 1997.
- [69] A.J.C. Ladd. Long-Range Dipolar Interactions in Computer Simulations of Polar Liquids. *Mol. Phys.*, 36:463–474, 1978.
- [70] G. Laughlan, A.I.H. Murchie, D.G. Norman, M.H. Moore, P.C.E. Moody, D.M.J. Lilley, and B. Luisi. The High-Resoulution Crystal Structure of a Parallel-Stranded Guanine Tetraplex. *Science*, 265:520–524, 1994.

- [71] J. Lautz, H. Kessler, W.F. van Gunsteren, H.P. Weber, and R.M. Wenger. On the Dependence of Molecular Conformation on the Type of Solvent Environment: A Molecular Dynamics Study of Cyclosporin A. *Biopolymers*, 29:1669–1687, 1990.
- [72] A. R. Leach. *Molecular Modelling, Principles and Applications*. 2001.
- [73] B. Lewin. *Gene: Lehrbuch der molekularen Genetik*. VCH, Weinheim, 2. edition, 1991.
- [74] B. Lewin. *Genetik*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1998.
- [75] L. L.Sandell and V.A. Zakian. Loss of a yeast telomere: arrest, recovery, and chromosomes loss. *Cell*, 75:729–739, 1993.
- [76] R. MacKinnon. Potassium channels. *FEBS Letters*, 555:62–65, 2003.
- [77] V.M. Marathias and P.H. Bolton. Determinants of DNA quadruplex structural type. *Biochemistry*, 38:4355–4364, 1999.
- [78] O. Matsuoka, E. Clementi, and M. Yoshime. CI Stydy of Water Dimer Potential Surface. *J. Chem. Phys.*, 64:1351, 1976.
- [79] J.A. McCammon and S.C. Harvey. *Dynamics of Proteins and Nucleic Acids*. Cambridge, 1987.
- [80] R. McElligott and R.J. Wellinger. The terminal DNA structure of mammalian chromosomes. *EMBO J*, pages 3705–3714, 1997.
- [81] T. Miura and G.J. Thomas Jr. Structural Polymorphism of Telomere DNA-Interquadruplex and Duplex-Quadruplex Conversions Probed by Raman-Spectroscopy. *Biochemistry*, 33:7848–7856, 1994.
- [82] D. Miyoshi, S. Matsumuru, W. Li, and N. Sugimoto. Structural polymorphism of telomeric DNA regulated by pH and divalent cation. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 22:203–221, 2003.
- [83] V. Mohan, P.E. Smith, and B.M. Pettitt. Molecular Dynamics Solution of Ions and Water around Triplex DNA. *J. Phys. Chem.*, 97:12984–12990, 1993.
- [84] V. Mohan, P.E. Smith, and B.M. Pettitt. Evidence for a New Spine of Hydration: Solvation of DNA Triple Helices. *J. Am. Chem. Soc.*, 97:9297–9298, 1993.

- [85] D. Mohanty and M. Bansal. Conformational Polymorphism in G-tetraplex Structures: Strand reversal by Base Flipover or Sugar Flipover. *Nucl. Acids Rs.*, 21:1767–1774, 1993.
- [86] S. Neidle, R.J. Harrison, A.P. Reszka, and M.A. Read. Structure-activity relationships among guanine-quadruplex telomerase inhibitors. *Pharmacology and Therapeutics*, 85:133–139, 2000.
- [87] A.W. Oliver and G.G. Kneale. Structural characterization of DBA and RNA sequences recognized by the gene 5 protein of bacteriophage fd. *Biochem. J.*, 339:525–531, 1999.
- [88] L. Pauling. *The Nature of the Chemical Bond*. Cornell University Press, New York, third edition, 1960.
- [89] L. Perera, U. Essmann, and M.L. Berkowitz. Effect of the Treatment of Long-Range Forces on the Dynamics of Ions in Aqueous Solutions. *J. Chem. Phys.*, 102:450–456, 1994.
- [90] P.J. Perry and L.R. Kelland. Telomeres and telomerase: targets for cancer chemotherapy. *Exp. Opin. Ther. Patents*, 8:1567–1586, 1998.
- [91] P.J. Perry, A.P. Reszka, A.A. Wood, M.A. Read, S.M. Gowan, H.S. Dosanjh, J.O. Trent, T.C. Jenkins, L.R. Kelland, and S. Neidle. Human telomerase inhibition by regioisomeric disubstituted amidoanthracene-9,10-diones. *J. Med. Chem.*, 41:4873–4884, 1998.
- [92] K. Phillips, Z. Dauter, A.I.H. Murchie, D.M.J. Lilley, and B. Luisi. The Crystal structure of a Parallel-stranded Guanine tetraplex at 0.95 Å Resolution. *J. Mol. Biol.*, 273:171–182, 1997.
- [93] T.J. Pinnavaia, C.L. Marshall, C.M. Mettler, C.L. Fisk, H.T. Miles, and E.D. Becker. Alkali Metal Ion Specificity in the Solution Ordering of a Nucleotide, 5-Guanosine Monophosphat. *J. Am. Chem. Soc.*, 100:3625–3627, 1978.
- [94] A. Rahman. Correlation in the Motion of Atoms in Liquid Argon. *Physical Review*, 136:405–411, 1964.
- [95] M. Rigby, E.B. Smith, W.A. Wakham, and G.C. Maitland. *The Forces between Molecules*. Oxford University Press, New York, 1986.
- [96] W. Saenger. *Principles of Nucleic Acid Structure*. Springer-Verlag, New York, 1984.

- [97] R.H. Sarma. *Nucleic Acid Geometry and Dynamics*. Pergamon Press, New York, 1980.
- [98] C. Schaffitzel and I. Berger. Mikroskopische Darstellung viersträngiger DNA in der eukaryotischen Zelle. *BIOspektrum*, 6:574–577, 2001.
- [99] P. Schultze, F.W. Smith, and J. Feigon. Refined solution structure of the dimeric quadruplex formed from the Oxytricha telomeric oligonucleotide d(GGGGTTTTGGGG). *Structure*, 2:221–233, 1994.
- [100] D. Sen and W. Gilbert. A Sodium-Potassium Switch in the Formation of Fourstranded G4-DNA. *Nature*, 344:410–414, 1990.
- [101] D. Sen and W. Gilbert. Novel DNA Superstructures Formed by Telomer-like Oligomers. *Biochemistry*, 31:65–70, 1992.
- [102] R.D. Shannon. Revised Effective Ionic Radii and systematic Studies of Interatomic distances in Halides and Chalcogenides. *Acta Crystallogr.*, A32:751–767, 1976.
- [103] T. Shida, K. Yokoyama, S. Tamai, and J. Sekiguchi. Self-Assoziation of Telomeric Short Oligodeoxyribonucleotides Containing a dG Cluster. *Chem. Pharm. Bull.*, 39:2207–2211, 1991.
- [104] T. Simonsson. G-Quadruplex DNA Structures - Variations on a Theme. *Biol. Chem.*, 382:621–628, 2001.
- [105] U.C. Singh, F.K. Brown, P.A. Bash, and P.A. Kollman. An Approach to the Application of free Energie Perturbation Methods Using Molecular Dynamics. *J. Am. Chem. Soc.*, 109:1607–1614, 1987.
- [106] P.E. Smith and J. Feigon. Strand Orientation in the DNA Quadruplex Formed from the Oxytricha Telomere Repeat Oligonucleotide $d(G_4T_4G_4)$ in Solution. *Biochemistry*, 32:8682–8692, 1993.
- [107] P.E. Smith and W.F. van Gunsteren. Translational and Rotational Diffusion of Proteins. *J. Mol. Biol.*, 236:629–636, 1994.
- [108] N. Spackova, I. Berger, and J. Sponer. Nanosecond Molecular Dynamics Simulations of Parallel and Antiparallel Guanine Quadruplex DNA Molecules. *J. Am. Chem. Soc.*, 121:5519–5534, 1999.

- [109] N. Spackova, I. Berger, and J. Sponer. Structural Dynamics and Cation Interactions of DNA Quadruplex Molecules Containing Mixed Guanine/Cytosine Revealed by Large-Scale MD Simulations. *J. Am. Chem. Soc.*, 123:3295–3307, 2001.
- [110] L. Stryer. *Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg and Berlin and New York, 1991.
- [111] L. Stryer. *Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg and Berlin and New York, 1999.
- [112] W.I. Sundquist and A. Klug. Telomeric DNA dimerizes by formation of guanine tetraeds between hairpin loops. *Nature*, 342:825–829, 1989.
- [113] J. Töhl. *Quadruplex-DNA-Konformere in wässriger Lösung. Einfluss der Kationenspezifität auf die Struktur und Dynamik*. PhD thesis, Universität Bielefeld, 1996.
- [114] W. F. van Gunsteren and A. E. Mark. Validation of molecular dynamics simulation. *Journal of Chemical Physics*, 108(15):6109–6116, 1998.
- [115] W.F. van Gunsteren and H.J.C. Berendsen. Algorithms for Macromolecular Dynamics and Constraint Dynamics. *Mol. Phys.*, 34:1311–1327, 1977.
- [116] W.F. van Gunsteren and H.J.C. Berendsen. *Groningen Molecular Simulations (GROMOS) Library Manual*. GROMOS, Groningen, The Netherlands, 1987.
- [117] W.F. van Gunsteren and H.J.C. Berendsen. Molekuldynamik-Computersimulationen; Methodik, Anwendung und Perspektiven in der Chemie. *Angewandte Chemie*, 102:1020–1055, 1990.
- [118] Y. Wang and D.J. Patel. Solution structure of a parallel-stranded G-quadruplex DNA. *J. Mol. Biol.*, 234:1171–1183, 1993.
- [119] R.C. Weast, editor. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, 1986.
- [120] S. Weerasinghe, P.E. Smith, V. Mohan, Y.K. Cheng, and B.M. Pettitt. Nanosecond Dynamics and Structure of a Model DNA Triple Helix in saltwater Solution. *J. Am. Chem. Soc.*, 117:2147–2158, 1995.
- [121] S.J. Weiner, P.A. Kollman, D.A. Case, U.C. Singh, C. Ghio, G. Alagona, S. Profeta Jr, and P. Weiner. A New Force Field for Molecular Mechanical

- Simulation of Nucleic Acids and Proteins. *J. Am. Chem. Soc.*, 106:765–784, 1984.
- [122] S.J. Weiner, P.A. Kollman, D.T. Nguyen, and D.A. Case. An All Atom Force Field for Simulations of Proteins and Nucleic Acids. *J. Comput. Chem.*, 7:230–252, 1986.
- [123] E. Westhof. *Water and Biological Macromolecules*. The Macmillan Press LTD, Houndmills, Basingstoke, Hampshire and London, 1993.
- [124] R. T. Wheelhouse, D. Sun, H. Han, and L.H. Hurley. Cationic porphyrins as telomerase inhibitors: the interaction of tetra(N-methyl-4-pyridyl)porphine with quadruplex DNA. *J. Am. Chem. Soc.*, 120:3261–3262, 1998.
- [125] J.R. Williamson. Guanin-Quartetts. *Current Opinion in Structural Biology*, 3:357–362, 1993.
- [126] J.R. Williamson. G-Quartett Structures in Telomeric DNA. *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 23:703–730, 1994.
- [127] J.R. Williamson, M.K. Raghuramann, and T.R. Cech. Monovalent Cation-Induced Structure of Telomeric DNA: The G-Quartett Mode. *Cell*, 59:871–880, 1989.
- [128] A. Włodarczyk, J. Gapinski, A. Patkowski, and A. Dobek. Structural polymorphism of telomeres studied by photon correlation spectroscopy. *Acta Biochimica Polonica*, 46 No 3, 1999.
- [129] A.M. Zahler and et al. Inhibition of telomerase by G-quartet DNA structures. *Nature*, 350:718–720, 1991.
- [130] V.A. Zak. Telomeres: beginning to understand the end. *Science*, 270:1601–1607, 1995.