

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht-Karls-Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Frank Aumann

geboren in Mannheim

Tag der mündlichen Prüfung:

13.12.2006

In silicio Streckung und Kompaktierung von Chromatin

Gutachter:
Prof. Dr. Jörg Langowski
Prof. Dr. Dieter W. Heermann

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Februar 2003 bis August 2006 am Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg in der Abteilung Biophysik der Makromoleküle unter der wissenschaftlichen Anleitung von Prof. Dr. Jörg Langowski angefertigt.

Veröffentlichungen:

Aumann F., Lankas F., Caudron M., Langowski J., *Monte Carlo simulation of chromatin stretching*. Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys, 2006. 73(4 Pt 1): p. 041927.

Aumann F., Caudron M., Langowski J., *Chromatin elasticity simulated by a Monte Carlo model*. Verhandl. DPG. (VI), 2005. 40: p. 93. (Abstract)

Aumann F., Caudron M., Langowski J., *Chromatin flexibility simulated by a Monte Carlo model*. Europ. Bio. Phys. J., 2005. 34(6): p. 732. (Abstract)

Manuskripte in Vorbereitung:

Aumann F., Langowski J., *A new potential for the nucleosome-nucleosome interaction: simulation of salt-induced chromatin compaction*. 2006

Aumann F., Sühnel J., Diekmann S., Langowski J., *Spacing of nucleosomal repeat lengths: stable and instable structures in geometrical models and Monte Carlo simulations*. 2006

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wird die Streckung und Kompaktierung einzelner 30-nm-Chromatinfibern mit Hilfe von Monte-Carlo-Simulationen untersucht. Die DNS wird als flexible Polymerkette mit einer Debye-Hückel-Elektrostatik approximiert und basiert auf dem „Zwei-Winkel-Modell“. Nukleosomen werden durch oblate Ellipsoide repräsentiert, die bei physiologischer Salzkonzentration über ein attraktives Gay-Berne-Potential wechselwirken.

Die Strecksimulationen von 100 Nukleosomen langen Fibern zeigen, dass ein Anstieg der Repeatlänge bzw. des Torsionswinkels, ein Abfall des Öffnungswinkels oder vorhandene Linker-Histone zu steiferen Fibern führen. Persistenzlängen und Streckmodule stimmen mit experimentellen Daten überein. Schließlich demonstriere ich, dass die Chromatinfiber wesentlich widerstandsfähiger gegenüber der Dehnung als gegenüber der Biegung ist.

Die Entfaltung der Chromatinfiber bei niedrigen Salzkonzentrationen wird durch ein neues Potential, welches die salzabhängige Extension der Histon-Tails berücksichtigt, reproduziert und somit der „Tail-Bridging“-Effekt bestätigt. Hohe Salzkonzentrationen führen zu flexibleren Fibern; Linker-Histone bewirken eine höhere Kompaktierung. Ein Phasenübergang zu einem 10-nm-Filament wurde nicht beobachtet.

Schließlich demonstrieren meine Simulationen, übereinstimmend mit experimentellen Daten, dass Repeatlängen mit einer Periode von ca. 10 bp quantisiert sind. Neben 1- und 2-Startstrukturen, finde ich Hinweise auf 3-Startstrukturen, die zwar im geometrischen Modell, allerdings noch nicht experimentell beobachtet wurden. Abschließend zeige ich, dass größere Abstände der Anknüpfungspunkte der Linker-DNS zu offeneren, flexibleren Strukturen führen.

Abstract

In this thesis Monte Carlo simulations of stretching and compaction of single 30-nm-chromatin fibers are presented. DNA is approximated by a flexible polymer chain with Debye-Hückel electrostatics and is based on the two-angle-model. Nucleosomes are represented by flat disks interacting at physiological salt concentration via an attractive Gay-Berne potential.

Stretching simulations show that increasing repeat lengths respective torsion angles, decreasing opening angles or the presence of linker histones lead to stiffer fibers. Persistence lengths and elastic moduli agree with experimental data. Finally, we demonstrate that chromatin is more resistant to stretching than to bending.

Unfolding of chromatin in low salt concentration is reproduced by using a new potential including the salt dependent histone tails thus supporting the “tail-bridging” effect. High salt concentration leads to more flexible fibers, presence of linker histones to higher compaction. No phase transition to a 10-nm-filament is observed.

Furthermore, our simulations demonstrate the quantization of repeat lengths of organisms by a period of 10 bp. Besides 1- and 2- start structures, we report evidence for 3-start structures, which have not been found in experiments yet. Finally we show that higher distances between the attachment points of the linker DNA lead to more open and flexible structures.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	11
Vorwort.....	15
Biologische Grundlagen	1
1.1 DNS-Struktur und Struktureigenschaften.....	3
1.2 Das Nukleosom	5
1.2.1 Nukleosom-Core-Partikel (NCP).....	6
1.2.2 Histon-Tails	7
1.2.3 „Tail-Bridging“-Effekt.....	8
1.2.4 Linker-Histon	11
1.2.5 Linkerlänge und Repeatlänge.....	13
1.3 Die 30-nm-Chromatinfiber	15
1.3.1 Modelle der Chromatinfiber	16
1.3.2 Massenbelegungsdichte und Sedimentationskoeffizient	18
1.3.3 Persistenzlänge und Streckmodul	19
Physikalische Grundlagen	21
2.1 Polymerphysik	21
2.1.1 Ideale Zufallskette (freely jointed chain)	21
2.1.2 Kuhnlänge L_{Kuhn}	25
2.1.3 Wurmartige oder persistente Kette (WLC).....	26
2.2 Monte-Carlo-Verfahren	28
2.2.1 Simple Sampling.....	29
2.2.2 Importance Sampling.....	30
Modellierung	35

3.1 Geometrisches Modell	36
3.2 Diskretisierung	38
3.2.1 Diskretisierung der DNS	40
3.2.2 Diskretisierung der Nukleosomen.....	40
3.2.3 Linkerlänge und Repeatlänge.....	41
3.3 Monte-Carlo-Schritte	42
3.4 Elastische und elektrostatische Wechselwirkungen	43
3.4.1 Elastische Wechselwirkungen	43
3.4.2 Elektrostatische Wechselwirkung der DNS	44
3.4.3 Parametrisierung der Wechselwirkung	47
3.5 Nukleosomen-Wechselwirkung: Gay-Berne-Potential	48
3.5.1 Gay-Berne-Potential	48
3.5.2 Parametrisierung des Gay-Berne-Potentials	51
3.6 Streckpotential	54
3.7 Nukleosomen-Wechselwirkung: Tails-Potential	54
3.7.1 Tails-Potential.....	54
3.7.2 Parametrisierung des Tails-Potentials	57
3.8 Erweitertes geometrisches Modell	59
Methoden	63
4.1 Das Simulationsprotokoll	63
4.1.1 Startkonformation und Relaxierung	63
4.1.2 Korrelation der simulierten Daten	65
4.2 Analyse	67
4.2.1 Konturlänge	67
4.2.2 Massenbelegungsdichte	70
4.2.3 Durchmesser der Fiber	70
4.2.4 Neigung der Nukleosomen und der DNS zur Fiberachse.....	70
4.2.5 Sedimentationskoeffizient.....	71
4.2.6 Persistenzlänge der Biegung.....	72
4.2.7 Streckmodul	74

4.3 Aufbau des Simulationsprogramms.....	76
Ergebnisse und Diskussion	79
5.1 In silicio Streckung von Chromatin	79
5.1.1 Biegesteifigkeit der Fiber: Die Persistenzlänge L_p	81
5.1.2 Entropische Beiträge	84
5.1.3 Strecksteifigkeit der Fiber: Der Streckmodul ϵ	86
5.1.4 Wie steif ist die 30-nm-Chromatinfiber?.....	87
5.1.5 Effekt des Nukleosom-Stamms	90
5.1.6 Diskussion	91
5.2 In silicio Kompaktierung von Chromatin	97
5.2.1 Tails-Potential vs. Gay-Berne-Potential.....	98
5.2.2 Quantitative Analyse der Kompaktierung	102
5.2.3 Diskussion	106
5.3 Äquilibrierung von geometrisch konstruierten Chromatinfibern	111
5.3.1 Stabile und instabile Fibern	114
5.3.2 N-Start-Fibern.....	118
5.3.3 Einfluss des Anknüpfungswinkels δ	119
5.3.4 Diskussion	123
Zusammenfassung und Ausblick	127
Abbildungsverzeichnis	131
Tabellenverzeichnis	134
Abkürzungsverzeichnis	134
Literaturverzeichnis	136
Danksagung.....	151

Inhaltsverzeichnis

Vorwort

"The total human sequence is the grail of human genetics."

Walter Gilbert, Science, 27 Juni 1986

Dieses Zitat von W. Gilbert, Nobelpreisträger für Chemie im Jahre 1980 und Mitbegründer der DNS-Sequenzanalyse, verdeutlicht die Euphorie, die zu Beginn des Humanen Genomprojekts in der Wissenschaft vorherrschte. Ziel dieses Projekts war es, das menschliche Genom vollständig zu sequenzieren, d.h. die Reihenfolge der Basen Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin in der DNS zu bestimmen. Ein Block von drei Basen kodiert eine Aminosäure. Letztere bilden die Grundbausteine der Proteine. Doch schon bevor die vollständige „Entschlüsselung“ des menschlichen Genoms im Jahr 2001 bekannt gegeben wurde, zeigte sich, dass dies nur ein erster, wenn auch wichtiger, Schritt darstellt, um die Grundlagen des Lebens zu verstehen. Eric Lander, Mitglied des Whitehead Institutes und Professor am Massachusetts Institute of Technology (MIT), fasst diese Erkenntnis wie folgt zusammen:

*"We've called the human genome the blueprint,
the Holy Grail, all sorts of things.*

*It's a parts list. If I gave you the parts list
for the Boeing 777 and it has 100,000 parts,
I don't think you could screw it together,
and you certainly wouldn't understand why it flew."*

Eric Lander, Millennium Evening im Weißen Haus, 14 Oktober 1999

Um Erbkrankheiten zu erforschen oder molekulare Mechanismen der Krebsentstehung besser zu verstehen, reicht die Kenntnis der Basensequenz im Allgemeinen nicht aus. Es zeigte sich, dass strukturelle Eigenschaften der DNS sowie deren Organisation im Zellkern von entscheidender Bedeutung sind. So kann eine starke

Kompaktierung der DNS z.B. deren Ablesen verhindern, während bestimmte räumliche Orientierungen, z.B. Schleifen, die Aktivität von Genen verstärken können. Weiterhin bestehen die Substrate essenzieller biologischer Prozesse wie Transkription, Replikation, Rekombination, DNS-Reparatur und Zellteilung nicht nur aus reiner DNS. Es handelt sich um Protein-DNS-Komplexe, die als Chromatin bezeichnet werden und sich in verschiedenen Stadien einer Kompaktierungshierarchie befinden. Die Kompaktierung des Chromatins kann sowohl von der Zeit, z.B. der Stufe des Zellzyklus, als auch von der Position im Zellkern abhängen und wird von der Zelle selbst aktiv reguliert. Um diese strukturelle Variabilität des Chromatins auf molekularer Basis zu verstehen, wurden dessen mechanische Eigenschaften in verschiedenen Einzelmolekül-Experimenten untersucht.

Ziel dieser Arbeit ist es diese Resultate zu interpretieren und somit das fundamentale Verständnis des Chromatins, insbesondere auf der Kompaktierungsebene der 30-nm-Chromatin-Fiber, zu erweitern. Mit Hilfe von Computersimulationen, die auf einem neuartigen physikalischen Modell der Chromatinfiber beruhen, werden Daten von Streck- und Kompaktierungsexperimenten interpretiert. Hierzu werden strukturelle Parameter der Chromatinfiber, wie z.B. ihre Streck- und Biegesteifigkeit, bestimmt. Sowohl die räumliche Aufteilung als auch die Dynamik des genetischen Materials im Interphase-Nukleus hängen stark von diesen nanomechanischen Parametern ab.

Kapitel 1

Biologische Grundlagen

Als Genom bezeichnet man die gesamte genetische Information eines Organismus. Diese Information ist auf einem langen, unverzweigten, linearen Polymer, der Desoxyribonukleinsäure (DNS) durch Nukleotide kodiert. Drei Nukleotide werden als Codon bezeichnet und legen eine Aminosäure fest. Aminosäuren sind die Grundbausteine der Proteine. Die kodierenden Bereiche der DNS werden Gene genannt, von denen der Mensch zwischen 20000 - 25000 besitzt. Zum Vergleich: Eine Maus besitzt ca. 20000 Gene, der nematodische Wurm *C. elegans* ca. 19000, Hefe (*S. cerevisiae*) ca. 6000 und die Mikrobe, welche für Tuberkulose verantwortlich, ca. 4000. Die DNS von Schimpanse und Mensch stimmt zu 98% überein [10].

Die Gene nehmen nur einen geringen Teil der DNS ein, beim Menschen ca. 5%. Die Mehrzahl der DNS besitzt keine kodierende Funktion und wird deshalb als nicht-kodierend bezeichnet. Neben den Genen unterscheidet man drei weitere spezialisierte DNS-Sequenzen: die DNS-Replikations-Startpunkte, die etwa alle 100000 bp auftreten, das Centromer, welches die Teilung der Chromosomen während der Mitose und Meiose reguliert, und die Telomere, welche die Enden der DNS schützen und für die komplette Replikation der DNS sorgen. Das Genom eines Menschen besteht aus ca. $2 \cdot 3,3 \cdot 10^9$ Nukleotidpaaren. Da der Abstand zwischen zwei Nukleotiden ca. 0,34 nm [1, 4] beträgt, ergibt sich für die Gesamtlänge des Genoms $0,34 \text{ nm} \cdot 6,6 \cdot 10^9 \approx 2 \text{ m}$. Die Natur vermag nun diese riesige Informationsmenge in einem sehr kleinen Raum unterzubringen, dem Zellkern, dessen Durchmesser 3-10 μm beträgt. Dabei ist der Zelle, trotz des enormen Kompaktierungsfaktors von 10000, das gezielte Ablesen der genetischen Information möglich. Die Faltung des Genoms wird durch DNS-bindende Proteine erreicht. In Eukaryonten, d.h. Organismen wie der Mensch, deren Zellen einen Zellkern besitzen, sind dies spezielle Proteine: die Histone (vgl. 1.2). Der DNS-Protein-Komplex wird aufgrund seiner Einfärbbarkeit mit basischen

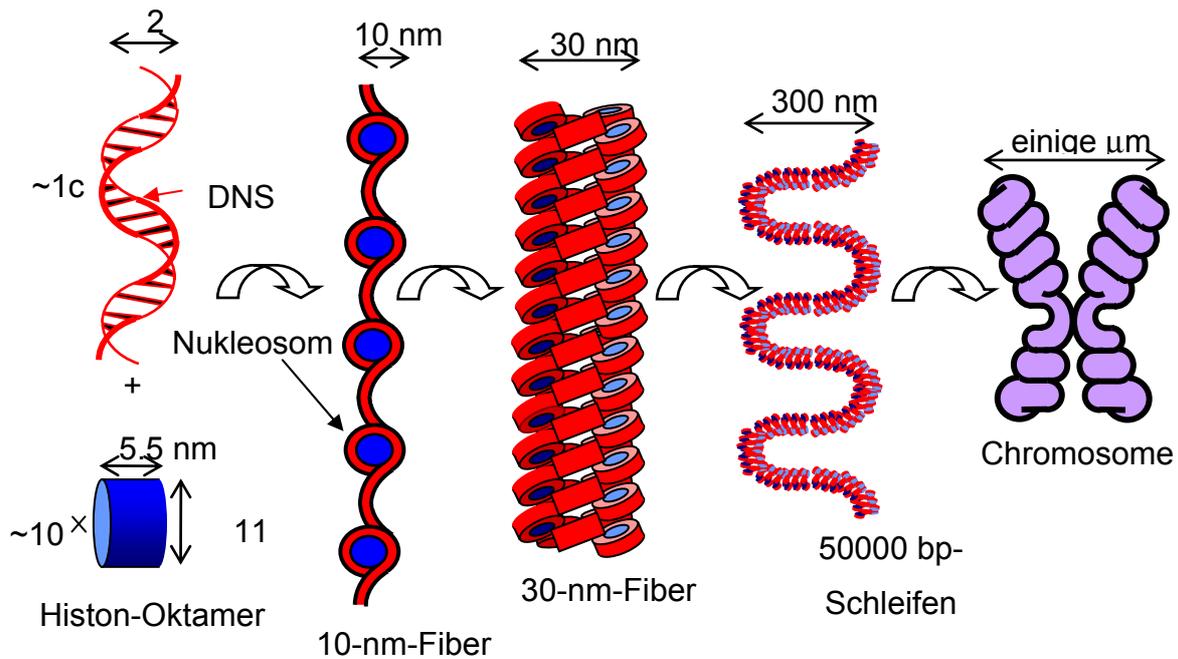


Abb. 1.1. Überblick über die verschiedenen Kompaktierungsebenen [2] des eukaryontischen Chromatins. In der ersten Ebene der Kompaktierung ist die DNS um Nukleosomen gewickelt. Bei niedriger Salzkonzentration bildet sich eine "perlenkettartige" Struktur, die 10-nm-Fiber, welche bei höheren Salzkonzentrationen in die 30-nm-Chromatinfiber kompaktiert. Diese ist in der nächsten Kompaktierungsstufe in Schleifendomänen organisiert, die schließlich zu den Chromosomen gefaltet werden.

basischen Farbstoffen als Chromatin bezeichnet. Basierend auf den funktionellen und strukturellen Eigenschaften unterscheidet man im Zellkern traditionell Bereiche des wenig kompaktierten Euchromatins vom stark kompaktierten Heterochromatin [1]. Während Euchromatin überall im Zellkern zu finden ist und fast alle aktiven und inaktiven Gene beinhaltet, lokalisiert sich Heterochromatin weitgehend am Rand und zeigt kaum Transkriptionsaktivität. Heterochromatin wird in zwei verschiedene Typen unterteilt. Konstitutives Heterochromatin besteht aus DNS-Sequenzen, die in keinem Zelltyp transkribiert werden, wie etwa die Satelliten DNS des Centromers. Fakultatives Heterochromatin umfasst DNS-Sequenzen, die in einigen Zellen zum Heterochromatin gehören und weitgehend transkriptionsinaktiv sind. Die gleichen Sequenzen sind dagegen in anderen Zellen transkriptionsaktiv und zählen zum Euchromatin, z.B. das X-Chromosom bei Säugetieren.

Abb. 1.1 gibt einen Überblick über die Kompaktierungsebenen des Chromatins in Zellen von Eukaryonten [2]. In der ersten Kompaktierungsstufe wird die DNS-Doppelhelix um die zylinderförmigen Histone gewunden. Dabei entsteht ein Chromatinfilament mit einem Durchmesser von ca. 10 nm , ähnlich einer Perlenkette. Bei physiologischer Salzkonzentration kompaktiert dieses Filament zur 40-mal kürzeren 30-nm-Chromatinfiber, deren Durchmesser ca. 30 nm beträgt. Diese Kompaktierungse-

bene ist Gegenstand dieser Arbeit. Die 30-nm-Fiber wird weiter gefaltet zu Fibern von 100 – 300 nm im Durchmesser, die in so genannten Schleifendomänen bzw. Rosetten mit 15000 bis 100000 bp organisiert sind. Die letzte Kompaktierungsstufe ist das Chromosom, von denen die diploiden Zellen des Menschen 46 Stück (2 x 22 Autosome und zwei verschiedene Geschlechts-Chromosome, die Gonosome) besitzen. Ein Chromosom besteht aus $50 \cdot 10^6$ - $250 \cdot 10^6$ Nukleotidpaaren und ist zwischen 3 und 6 μm lang [4]. Ein entsprechend ausgestrecktes DNS-Molekül hat eine ca. 1000-mal größere Länge von 1,7 – 8,5 cm. Entfernt man die Proteine, so brechen die Chromosome schon bei geringster Krafteinwirkung.

1.1 DNS-Struktur und Struktureigenschaften

Die Desoxyribonukleinsäure (DNS) ist ein Polymer, welches aus vier verschiedenen Grundbausteinen zusammengesetzt ist, den Nukleotiden. Ein Nukleotid besteht aus einem Zucker (β -D-2'-Desoxyribose), einem negativ geladenen Phosphorsäurerest und einer stickstoffhaltigen Ringverbindung, welche aufgrund ihrer basischen Reaktion als Base bezeichnet wird. Bei der DNS sind diese Basen die Purin-Ringe Adenin (A) und Guanin (G) sowie die Pyrimidin-Ringe Cytosin (C) und Thymin (T), welche durch ihre Reihenfolge in der DNS die genetische Information kodieren. Die Nukleotide sind durch kovalente Phosphodiesterbindungen zwischen dem 5'-C-Atom eines Zuckers mit dem 3'-C-Atom des nächsten verbunden. Zusammen mit den zwei Sauerstoff- und vier Kohlenstoffatomen bezeichnet man sie aufgrund ihrer strukturellen Funktion als Rückgrat der DNS. Durch van der Waals-Wechselwirkungen zwischen ihren planaren Ringen tragen die Basen zur Stabilisierung der Struktur bei. Die gesamte lineare Polynukleotidkette bildet den DNS-Einzelstrang. Seine Richtung wird entsprechend der Synthetisierung vom 5'-Ende zum 3'-Ende festgelegt. Diese erfolgt, indem ein Nukleosidtriphosphat (Nukleosid = Base + Zucker) an die 3'-Hydroxylgruppe des Zuckers am wachsenden Strang bindet. Die Energie liefert dabei die Abspaltung der beiden terminalen Phosphate [1, 4, 5, 11, 12].

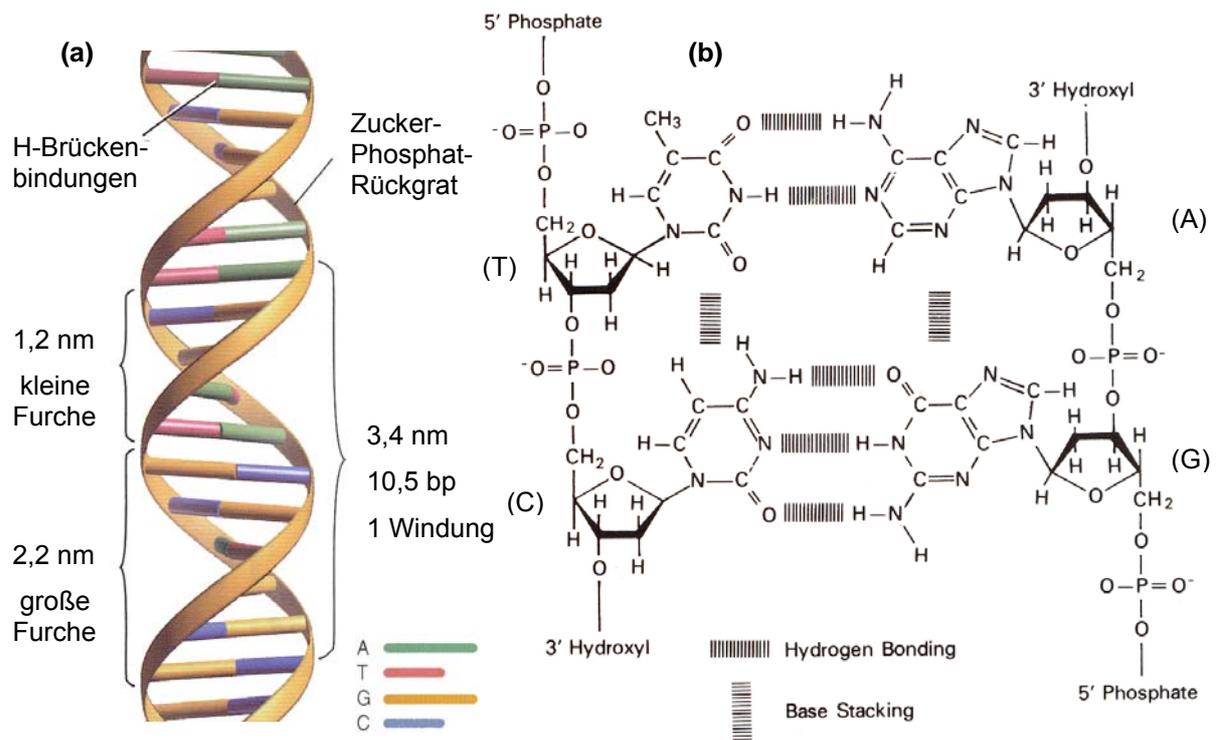


Abb. 1.2. DNS-Doppelstranghelix in der B-Form (a) aus Pollard *et al.* [1] und Visualisierung der chemischen Struktur und der stabilisierenden Interaktionen zwischen zwei Basenpaaren aus Wolffe [5].

Nur in einigen wenigen Viren liegt DNS als Einzelstrang vor. Im Jahr 1953 entwickelten Watson und Crick das Modell der Doppelhelix (Abb. 1.2), welches auf die beobachteten Röntgenbeugungsmuster passte und somit das Rätsel um die DNS-Struktur und deren Funktion löste. Demnach ist ein DNS-Molekül mit einem komplementären DNS-Strang in Form einer rechtshändigen Doppelhelix gepaart. Die beiden Stränge verlaufen in entgegengesetzter Richtung mit dem Zucker-Phosphat-Rückgrat auf der Außenseite und den komplementären Basen im Innern. Als komplementäre Basenpaare kommen nur G-C und A-T vor, wobei diese Kombinationen die größte Anzahl von nutzbaren Wasserstoffbrückenbindungen besitzen. Die Basen sind im Abstand von 0,34 nm übereinander gestapelt und nahezu rechtwinklig zur Achse des Polymers angeordnet. Diese reguläre Struktur ist die übliche Form der DNS und wird als B-DNS bezeichnet (Abb. 1.2). Eine Windung besteht aus 10,5 bp und hat einen Durchmesser von ca. 2 nm. Aufgrund der asymmetrischen Bindung zwischen den Zuckern und den Basen ist die Helix ebenfalls asymmetrisch und besitzt eine große und eine kleine Furche an der Außenseite.

Unter speziellen Laborbedingungen, sind zwei weitere helikale Formen DNS bekannt. Die A-Form ist rechtshändig, besitzt 11 bp pro Windung und misst ca. 2,3 nm im Durchmesser. Sie kommt z.B. bei dehydrierten Proben und hohen Salzkonzentra-

tionen vor. Eine extremere Form, die Z-DNS, besitzt dagegen 12 bp pro Windung und ist linkshändig gewunden [1, 4]. Sie kann bei alternierenden Sequenzen von Pyrimidinen und Purinen auftreten, wobei Methylierung die Z-Form fördert.

1.2 Das Nukleosom

Das Nukleosom ist die sich wiederholende Grundverpackungseinheit des Chromatins. Es konnte erstmals im Jahr 1974 bei niedrigen Ionenstärken durch Elektronenmikroskopie an entfalteten Chromatinfibern visualisiert werden [13-15]. Abbildung 1.5 und 1.7 zeigen eine solche Struktur, bei der die Nukleosomen wie die Perlen einer Kette angeordnet sind. Durch Verdauung mit *Micrococcus-Nucleasen* [16-18] wird die DNS zwischen den Nukleosomen, die so genannte Linker- oder Verbindungs-DNS, abgebaut. Je nach Verdauungsgrad bilden sich dabei zwei Fragmente. An das größere binden 166 bp unverdaute DNS. Es ist instabil und wird als Chromatosom bezeichnet. Das kleinere Fragment ist dagegen stabil und enthält 146 bp unverdaute DNS. Man nennt es den Nukleosom-Core-Partikel (NCP). Die Struktur des NCP ist durch Röntgenstreuexperimente bis zu einer atomaren Auflösung von 2,8 Å [7] und kürzlich sogar von 1,9 Å [6] bekannt (Abb. 1.3). Der Begriff Nukleosom wird häufig synonym mit dem Begriff Chromatosom oder Nukleosom-Core-Partikel verwendet. Dies wird auch im Folgenden so gehandhabt.

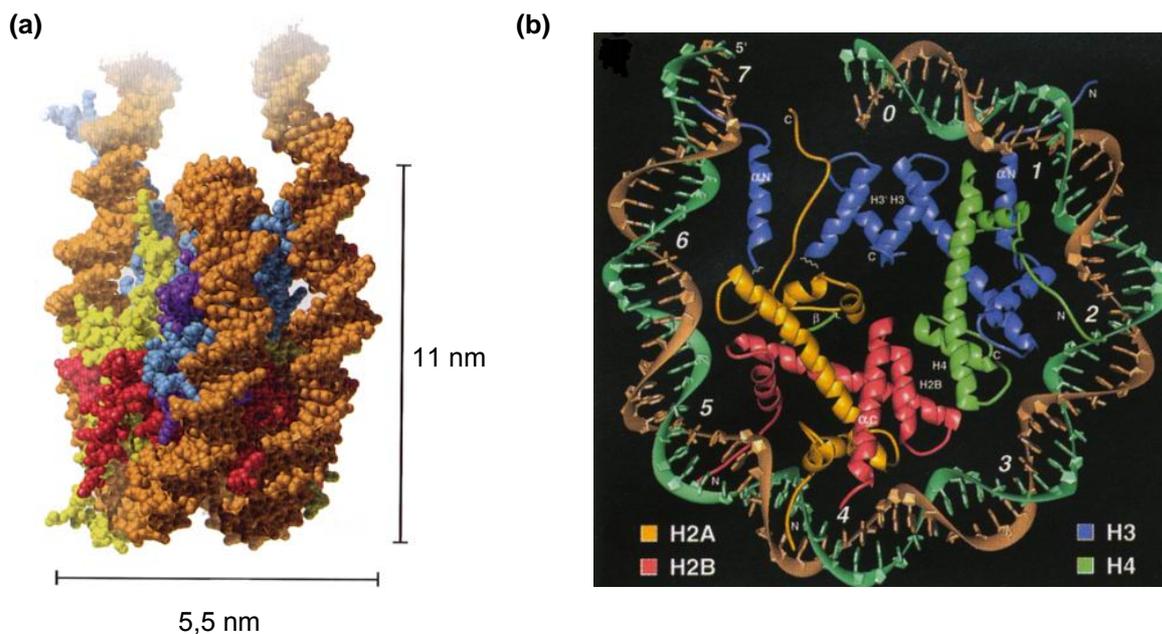


Abb. 1.3. Kristallstruktur des Nukleosom-Core-Partikels in zwei verschiedenen Darstellungen [1, 7]. Die DNS ist um das Histon-Oktamer herum gewunden. (b) zeigt die Sekundärstruktur des Oktamers und verdeutlicht die für das Histon-Oktamer typische „hand-shake“ Faltung der α -Helizes.

1.2.1 Nukleosom-Core-Partikel (NCP)

Der Nukleosom-Core-Partikel (NCP) besteht aus einem Protein Oktamer, welches sich aus je zwei der vier Core-Histone bzw. Nukleosom-Histone H2A, H2B, H3 und H4 zusammensetzt. Diese sind zwischen 102-135 Aminosäuren lang. Insbesondere H3 und H4 gehören zu den am stärksten konservierten aller bekannten Proteine. Das bedeutet, dass die die Aminosäuresequenz während der Evolution nahezu unverändert geblieben ist. Bei physiologischer Salzkonzentration bildet sich aus zwei H3 und zwei H4 Histonen ein H₃₂-H₄₂ Tetramer sowie aus den restlichen Histonen zwei H2A-H2B Heterodimere. Diese paarweise Assoziation hat die charakteristische Form eines „handshake“-Motivs (Abb. 1.3b). Das Oktamer ist nur dann stabil, wenn DNS daran assoziiert [2]. Je nach der betrachteten Kristallstruktur winden sich 146 bp DNS 1,65 mal [7] bzw. 147 bp DNS 1,67 mal [6] in einer linkshändigen Superhelix um das Histon-Oktamer. Allerdings ist die Biegung der DNS nicht uniform: Abschnitte an den Bindungsstellen sind weniger gebogen als Bereiche zwischen den Bindungsstellen [19]. Die so entstandene helikale Torsion der gebundenen DNS ist im Schnitt geringer als bei der Linker-DNS und beträgt 10,2 bp pro Windung. Der NCP hat eine Dyadenachse und die Form eines oblaten Ellipsoids bzw. Zylinders mit dem Radius von 5,5 nm und einer Höhe von 11 nm. Die aufgrund des Phosphatrückgrats negativ geladene DNS dominiert das positiv geladene Histon-Oktamer [20, 21], so dass der NCP eine strukturelle Ladung in der Größenordnung von 150 e⁻ trägt [22]. Die DNS wird durch 14 Bereiche gebunden [6], bei denen die kleine Furche der rechtshändigen DNS in Richtung des Oktamers zeigt. Entscheidend beteiligt sind direkte Wasserstoffbrücken und vermittelnde Wassermoleküle [6] zwischen dem Zucker-Phosphat-Rückgrat und den Haupt- und Seitenketten des Oktamers [7]. Auch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den positiv geladenen Aminosäureenden der α -Helizes und dem Phosphat-Rückgrat der DNS spielen eine wichtige Rolle. Eine zusätzliche Stabilisierung bewirken kationische Arginin-Seitenketten, die sich in die kleine Furche der DNS erstrecken. Insbesondere die Histon-Tails festigen die Bindung der DNS an das NCP, indem ihre positiv geladene Stickstoff-Enden elektrostatisch mit den Phosphatgruppen der DNS wechselwirken [23, 24].

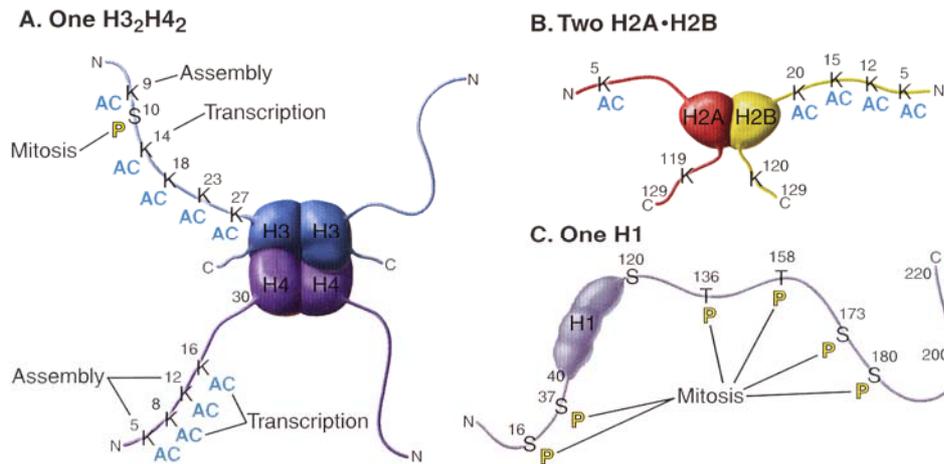


Abb. 1.4. N- und C-terminale Histontails aus Pollard *et al.* [1]. Ihre Modifikation spielt eine wichtige Rolle z.B. in der Assemblierung von Nukleosomen, Transkription und Chromatinkondensation in der Mitose.

1.2.2 Histontails

Die Kristallstrukturen des Nukleosoms zeigen, dass Histone aus einer globulären Domäne von ca. 70 - 100 Aminosäuren und ausgedehnten, sehr flexiblen, terminalen Histontails bzw. Histonschwänzen aufgebaut sind (Abb. 1.4) [1, 11]. Die N-terminalen Tails sind positiv geladen und durch den hohen Anteil der Aminosäuren Lysin und Arginin basisch. Sie weisen Längen im Bereich zwischen 15 Aminosäuren (H2A) und 44 Aminosäuren (H3) auf [25]. Außer bei H4 findet man auch kurze Tails am C-Ende. Die Funktion und Sequenz der Histontails wurde während der Evolution stark konserviert. Sie sind aufgrund zwei essentieller Funktionen von starkem Interesse in der aktuellen Forschung: Regulation der Chromatinstruktur sowie der Chromatinfunktion.

Dabei sind spezifische Modifikationen der Enden für die Initiierung der Chromatinbildung von entscheidender Bedeutung. Sie spielen bei der Regulation der Zugänglichkeit der DNS in der Chromatinfaser bei Transkription, Replikation und DNS-Reparatur eine wichtige Rolle (Abb. 1.4). So bewirkt z.B. die Acetylierung der Lysingruppen durch Histonacetyltransferasen (HAT) eine Reduzierung der Ladung an den Histontails, woraus eine Entfaltung dieser Chromatinbereiche und eine verstärkte Transkription der Gene resultiert [25-29]. Weitere kovalente Modifikationen sind die Methylierung, Phosphorylierung und Ubiquitinierung [30, 31]. Einerseits kann die Methylierung die Genaktivierung, z.B. durch Arginin-Methylierung, fördern, andererseits aber auch das Gegenteil bewirken z.B. durch Lysin-Methylierung. Phosphorylierung bewirkt im Allgemeinen eine geringere Genaktivität. Ubiquitinierung von H2A-H2B regt bestimmte Histon-H3-Methylierungen an. Die Histontails sind in eine Vielzahl

von Interaktionen mit weiteren Proteinen involviert, z.B. Proteine der „high-mobility-group“ (HMG) oder Remodellierungsfaktoren wie SWI/SNF [5]. Die verschiedenen regulativen Einflüsse der spezifischen Histonmodifikationen wird auch als „Histone Code Hypothese“ bezeichnet und ist Gegenstand der aktuellen Forschung.

Experimente zeigen, dass die Histon-Tails eine entscheidende Rolle bei der Kompaktierung des Chromatins spielen. So wurde bei Oligonukleosomen keine kationennahe Faltung beobachtet, wenn Bereiche der N- und C-terminalen Regionen der Histon-Tails mit Trypsin entfernt wurden [32-34]. Detailliertere Folgestudien zeigten, dass besonders die Trypsin-empfindlichen Tails des Tetramers H3₂-H4₂ für die Kompaktierung und die Selbstaggregation verantwortlich sind [35, 36], während die Tails der Heterodimere H2A/H2B nur einen geringen, aber nachweisbaren Beitrag leisten [35]. Die hoch aufgelösten Kristallstrukturen [25, 30] des Nukleosoms zeigen, dass das N-terminale Tail von Histon H4 aus dem Nukleosom herausragt und mit dem Heterodimer H2A/H2B des nächsten Nukleosoms über Wasserstoffbrücken und Salzverbindungen attraktiv wechselwirkt. Diese Vermutung wurde in Experimenten mit kompaktierten Oligonukleosomen [37, 38] bestätigt. Dagegen zeigen Verdauungsexperimente, dass die N-terminale Tails des Histons H3 sowie das C-terminale Tail von Histon H2A maßgeblich an der Bindung der DNS an das Oktamer beteiligt sind [39] [40].

1.2.3 „Tail-Bridging“-Effekt

Bis heute ist ungeklärt, wie die Nukleosom-Nukleosom-Wechselwirkung über Histon-Tails Einfluss auf die Kompaktierung des Chromatins nimmt [41-43]. Dieser Mechanismus ist ein wichtiger Schritt für das strukturelle Verständnis der Chromatinfiber. Durch Experimente mit analytischer Ultrazentrifugation gelang es Dong *et al.* [44] den zweiten Virialkoeffizienten eines NCP bei zwei verschiedenen Salzkonzentrationen zu messen. Der zweite Virialkoeffizient charakterisiert die Paar-Wechselwirkung der NCP's. Dabei wurde eine Abnahme der elektrostatischen Abstoßung bei zunehmendem Salzgehalt beobachtet. In aktuelleren Experimenten zeigten Mangenot *et al.* [41] durch Röntgenstreuung an NCP in verdünnter Lösung, dass die Histon-Tails, welche bei niedriger Salzkonzentration eng an der DNS anliegen, mit steigender Salzkonzentration zunehmen vom Nukleosom nach außen wegstre-

ben. Weiterhin wurde die Paar-Wechselwirkung durch die Bestimmung des zweiten Virialkoeffizienten charakterisiert. Dabei konnte die Konformationsänderung der Histon-Tails mit der Änderung der Wechselwirkung zwischen den NCP's, insbesondere mit dem Auftreten einer attraktiven Interaktion, korreliert werden. Genauere Untersuchungen mit klassischen Osmometrie-Methoden zeigten eine signifikante Verminderung des zweiten Virialkoeffizienten gerade bei Salzkonzentrationen, bei denen die Histon-Tails beginnen sich zu entfalten [42]. Unter Verwendung der Poisson-Boltzmann-Theorie konnte der konventionelle Ansatz des Derjaguin-Landau-Verwy-Overbeek-(DLVO)-Potentials¹ die experimentelle Variation im zweiten Virialkoeffizienten nicht reproduzieren.

Basierend auf ihren Experimenten ersetzten Mangelot *et. al* deshalb den attraktiven Teil des DLVO-Potentials, den van der Waals-Term, durch ein empirisches Potential in Yukawa-Form. Dabei wird die Ausdehnung der Tails als Potentialskalierung verwendet. Dadurch waren sie in der Lage die experimentellen Daten zu reproduzieren und die attraktive Wechselwirkung zwischen den Nukleosomen auf den „Tail-Bridging“-Effekt zurückzuführen [42].

Auch aus theoretischer Sicht ist die Rolle der Histon-Tails noch unklar. So wurden attraktive Wechselwirkungen und ein nicht-monotones Verhalten des zweiten Virialkoeffizienten bei sehr vereinfachten Modellen gefunden, die keine Histon-Tails berücksichtigen. In einem dieser Modelle werden die NCP als positiv geladene Kugeln angenommen, wobei die DNS als eine um diese Kugel gewundene, semiflexible, kationische Kette dargestellt ist [48, 49]. Ein anderes Modell, welches eine punktförmige Repräsentation der NCP's verwendet und die Tails als gegensätzlich geladene flexible Ketten beschreibt, zeigte zwar eine attraktive Wechselwirkung zwischen zwei NCP's, aber ein monotones Verhalten des zweiten Virialkoeffizienten [50]. Im Gegensatz zu diesen beiden älteren Modellen weisen neuere Simulationen sehr wohl auf die Existenz des „Tail-Bridging“-Effekts hin.

¹ Im DLVO Model ist das verwendete Potential die Summe aus den Beiträgen einer attraktiven van der Waals-Wechselwirkung, eines kugelförmigen Volumenausschlusses und einer elektrostatischen Abstoßung, welche aus der linearisierten Poisson-Boltzmann-Gleichung abgeleitet wird. Anwendung findet der DLVO Ansatz typischerweise für verschiedene geladene sphärische Partikel in Lösung wie Kolloide [45], Mizellen [46] oder globuläre Proteine [47].

So konnte ein Modell, welches die NCP's als je zwei negativ geladene Kugeln mit jeweils acht positiv geladenen flexiblen Ketten beschreibt, quantitativ das Entfalten der Tails bei steigender Ionenstärke sowie die attraktive Wechselwirkung zwischen den NCP's reproduzieren [51]. Mit einem Modell, das die Histon-Tails als entsprechende Flächen auf der Kugel modelliert, gelang dies dagegen nicht.

Während die bisher beschriebenen Simulationen nur zwei Nukleosomen modellierten, weisen aktuelle Computersimulationen von Oligonukleosomen ganz deutlich auf die dominierende Rolle der Histon-Tails bei der Kompaktierung hin. So z.B. Molekular-Dynamik-Simulationen in einem dielektrischen Kontinuum mit expliziten mobilen Gegenionen und Salz. Dabei werden die Nukleosomen als negativ geladene Kugeln und die Histon-Tails als flexible geladene Ketten modelliert [52]. Allerdings handelt es sich hierbei um isolierte Nukleosomen, die nicht mit Linker-DNS verbunden sind.

Ein anderer Ansatz mit Linker-DNS wurde kürzlich von Sun *et al.* veröffentlicht [53]. Hier wird ein DiSCO(Discrete Surface Charge Optimization)-Ansatz verwendet, bei der das Nukleosom auf der Basis seiner Kristallstruktur, inklusive der in dieser Struktur vorhandenen Histon-Tails, durch eine irreguläre Fläche repräsentiert wird. Um die elektrostatischen Eigenschaften zu modellieren werden auf dieser Oberfläche gleichmäßig 300 diskrete Ladungen, gemäß der Lösung einer nichtlinearen Poisson-Boltzmann-Gleichung, verteilt. Die Nukleosomen werden anschließend durch sechs Kugeln verbunden und die Fiber durch einen Monte-Carlo-Algorithmus äquilibriert.

Indem die Ladungen der Tails an- und ausgeschaltet wurden, konnte gezeigt werden, dass die Histon-Tails notwendig für die Stabilisierung der Fiber in diesem Modell sind. Dabei dominierten die DNS-Nukleosom- sowie Nukleosom-Nukleosom-Wechselwirkungen. Eine Energieanalyse verdeutlichte, dass bei niedrigen Salzkonzentrationen die elektrostatische Abstoßung zwischen den Linker-DNS-Strängen den größten Beitrag leistet, bei hohen Salzkonzentrationen allerdings die Nukleosom-Nukleosom-Wechselwirkung bestimmend ist. Während in diesen Simulationen die Histon-Tails noch statisch waren, wurden in kürzlich veröffentlichten Simulationen derselben Forschergruppe die Histon-Tails durch flexible Ketten aus Kugeln ersetzt [54]. Die Resultate dieses „Protein bead“-Modells stimmen besser mit experimentellen Ergebnissen bezüglich der Energien und des Sedimentationskoeffizienten überein. Allerdings sind die simulierten Ketten nur 12 Nukleosomen lang und berücksichtigen nicht den Effekt des Linker-Histons.

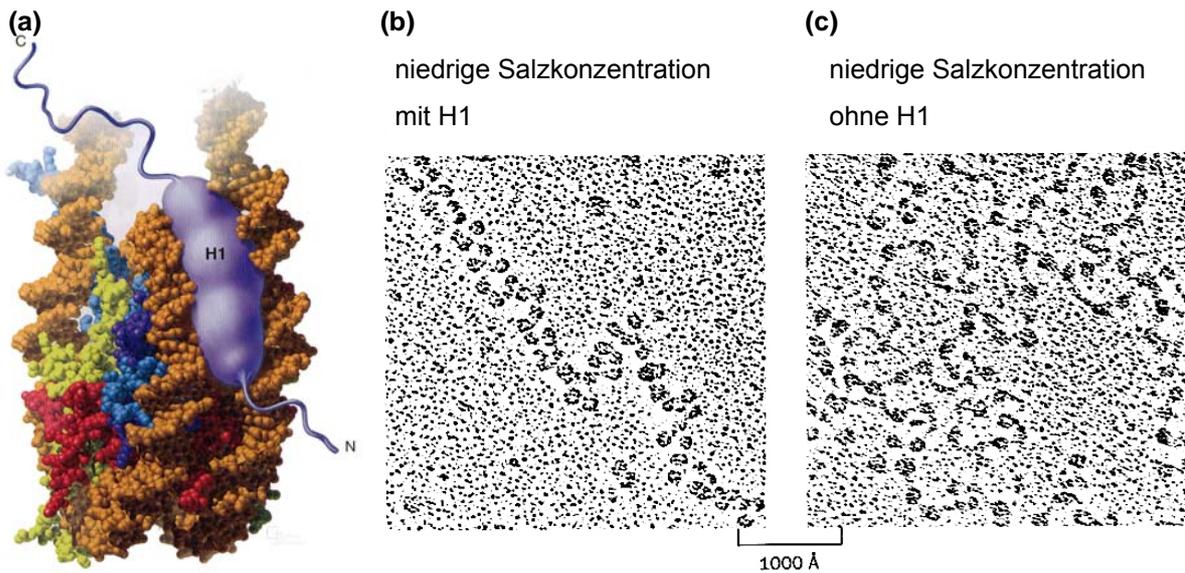


Abb. 1.5. (a) zeigt ein vom Autor zur Kristallstruktur des Nucleosoms hinzugefügtes H1 Histon aus Pollard *et al.* [1]. Das Linker-Histon befindet sich zwischen der eingehenden und ausgehenden Linker-DNS. In (b) und (c) sind elektronenmikroskopische Aufnahmen von Chromatinsträngen bei niedriger Salzkonzentration zu sehen. Bei Anwesenheit von H1 (b) bilden sich kompaktere und regelmäßiger Strukturen, die einer Perlenkette ähneln [4]

1.2.4 Linker-Histon

Genauere Untersuchungen des bei den Verdauungsexperimenten gefundenen Chromatosoms zeigten, dass 20 der 166 Basenpaare an einem weiteren Histontyp, dem Linker-Histon, gebunden sind [16, 17]. Dieses besteht aus einer konservierten, zentralen, ~80 Aminosäuren-langen, globulären Domäne und zwei stark positiv geladenen Enden. Diese Sequenz ist sehr variabel, so dass in Säugetieren mindestens sieben Untertypen bekannt sind. Vögel besitzen dagegen statt H1 das Histon H5 sowie entsprechende Varianten.

Verschiedene Experimente lassen darauf schließen, dass H1 sich auf der Oberfläche des Nucleosoms befindet [55] und die globuläre Domäne zentral symmetrisch zwischen der einlaufenden und auslaufenden DNS liegt (Abb. 1.5) [11]. Dabei werden jeweils mindestens 10 bp der DNS gebunden [56, 57]. Ihre Ladung wird durch H1 neutralisiert, welches mit 58 Elementarladungen stark positiv geladenen ist [58]. Aktuellere Experimente, bei denen chemisches Vernetzen verwendet wurde, haben allerdings eine asymmetrische Position der globulären Domäne von H5 bestimmt. Dabei liegt das Linker-Histon unter der das Nucleosom verlassenden DNS [59, 60].

Die exakte Lage des Linker-Histons ist also immer noch Gegenstand der wissenschaftlichen Diskussion [61].

Abb. 1.5 verdeutlicht die wichtige Rolle des Histon H1 bei der Kompaktierung des Chromatins. So führt die Anwesenheit von H1 zu wesentlich kompakteren und regelmäßigeren Strukturen [9, 62]. Knock-out Experimente in Hefezellen und Elimination des einzigen H1-ähnlichen Proteins in *Xenopus*, lassen allerdings darauf schließen, dass H1 nicht unbedingt für die Kompaktierung oder für das Überleben der Zellen notwendig ist [63, 64]. Neuere Studien mittels Elektronen- und Rasterkraftmikroskopie bekräftigten den Einfluss des Histon H1, welches den Öffnungswinkel der eingehenden und ausgehenden DNS reduziert [65-67].

Experimente mit Hühnererythrozyten [9, 68] zeigen, dass Linker-Histon und gebundene DNS eine stammförmige Struktur bilden, das Stamm-Motiv, bei der die DNS sich erst im Abstand von 8 nm von der Achse des Nukleosoms trennt (Abb. 1.6). In Abwesenheit des Linker-Histons wird kein solches Stamm-Motiv beobachtet. Der Öffnungswinkel ist aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen zwischen der DNS von der Salzkonzentration abhängig [69] und beträgt bei physiologischer Salzkonzentration ca. 45° (vgl. 3.1). Die exakte strukturelle sowie genregulierende Rolle von H1 ist nach wie vor unklar.

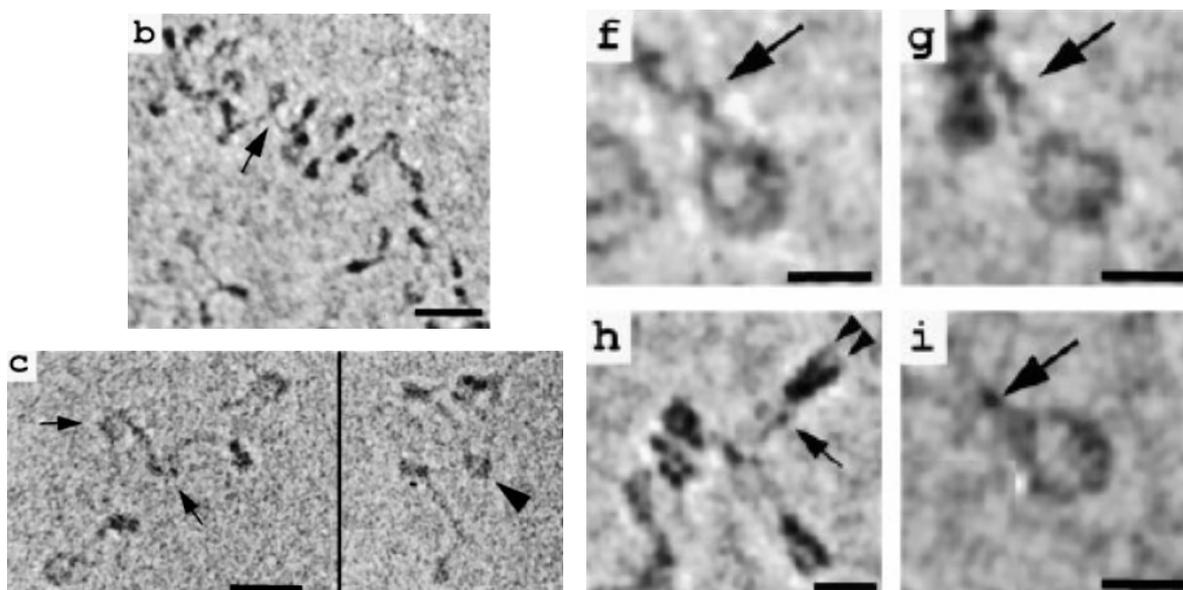


Abb. 1.6. Aufnahmen von Hühnererythrozyten mit (b, f-i) und ohne (c) Linker-Histon in niedrigen Salzkonzentrationen, die mit Cryo-Elektronen-Mikroskopie von Bednar *et al.* [9] erstellt wurden. Die Pfeile in (b,f-i) markieren den Nukleosomen-Stamm, der sich nur bei vorhandenem Linker-Histon bildet. Ansonsten gehen die beiden verbindenden DNS-Stränge sofort auseinander (c).

1.2.5 Linkerlänge und Repeatlänge

Die Nukleosomen bilden die fundamentale Einheit der Chromatinfiber, welche sich in nahezu regelmäßigen DNS-Abständen wiederholt. Die Nukleosom-Repeatlänge, ist für jeden Zelltyp charakteristisch und wird deshalb in der Biologie als grundlegende Einheit verwendet. Sie ist definiert als die mittlere Anzahl der Basenpaare, welche zwei benachbarte Nukleosomen voneinander trennt. Generell können sich Repeatlängen über einen Bereich von 157-240 bp erstrecken, typischerweise liegen sie jedoch im Bereich 190-220 bp (Tabelle 1.1).

Verschiedene Experimente bestimmten die Repeatlänge unterschiedlicher Organismen. Sie lassen vermuten, dass einige Repeatlängen bevorzugt in der Natur vorkommen, während andere gar nicht auftreten. Dabei wurden Di- und Trinukleosome sowie längere Chromatinketten verschiedener Spezies mit Lichtstreuung, Rasterkraftmikroskopie [68], analytischer Ultrazentrifugation [70, 71], Cryo-EM [65] und elastischer Neutronenstreuung [72] untersucht. Widom [73] fasste diese Ergebnisse zusammen und untersuchte die Verteilung der Repeatlängen systematisch. Dadurch konnte er demonstrieren, dass bestimmte Repeatlängen in festen Abständen besonders häufig vorkommen, andere gar nicht. Das bedeutet die Repeatlänge ist quantisiert. Dabei entsprach die Repeatlängenperiode gerade der helikalen Steigung der DNS von 10 bp bzw. Vielfachen davon. Insbesondere legt dies die Vermutung nahe, dass auch die Linkerlängen quantisiert sind, wie es verschiedene Verdauungsexperimente vermuten lassen. So fand man bei der Verdauung von Chromatin mit DNase I + II zwei verschiedene Bandensätze im Gel, die jeweils einen Abstand von 10 bp besaßen und gegeneinander um 5 bp verschoben waren [74-76].

	Zelltyp	Repeatlänge
Tabelle. 1.1. Übersicht über die Repeatlängen einiger bekannter Zelltypen.	COS-7	190
	HeLa	192
	Rattenleber	200
	Hühnererythrozyten	212
	Seeigel-Sperma	220

Ähnliche Banden im Abstand von 10 bp wurden bei der Verdauung von Dinukleosomen eines anderen Organismus gefunden [77]. Ein weiteres Experiment, bei dem die Dinukleosome mit *Mikrococcus* Nuklease erzeugt und die DNS-Enden an den Chromosomen mit Hilfe von Exonuklease II und S1 Nuklease exakt entfernt wurden [75], zeigte ebenfalls bevorzugte Banden im Abstand von 10 bp.

Ein Ziel dieser Arbeit besteht darin, die strukturelle Basis dieser Quantisierung genauer zu untersuchen.

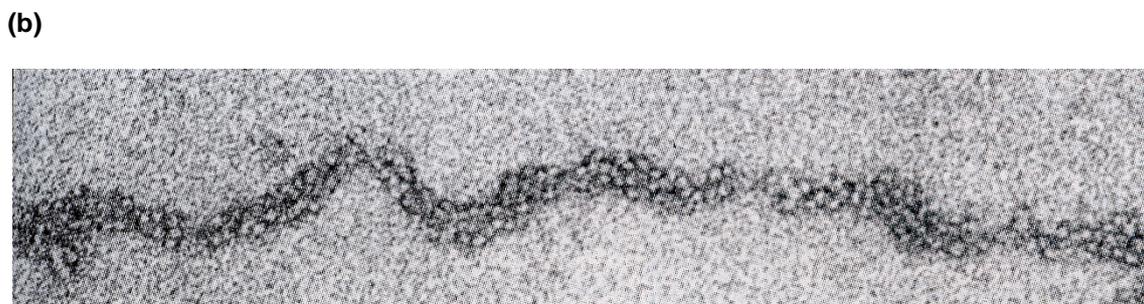
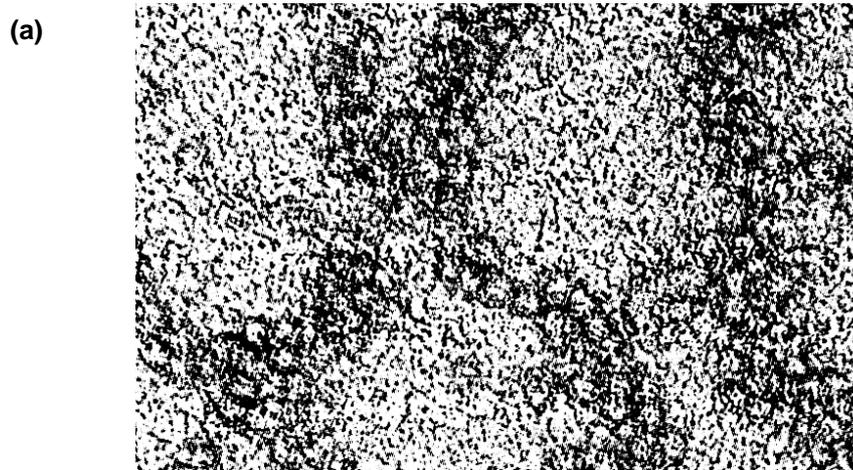


Abb. 1.7. Elektronenmikroskopische Aufnahmen einer Chromatinfiber aus Alberts *et al* [4]. Bei physiologischen Salzkonzentrationen lässt sich die die Struktur der Fiber aufgrund der hohen Kompaktierung nicht eindeutig bestimmen (a), (b). Bei niedrigen Salzkonzentrationen entfaltet sich die 30-nm-Fiber und nimmt die Form einer „Perlschnur“ (c) an. Abbildung (b) und (c) wurden mit der gleichen Vergrößerung aufgenommen.

1.3 Die 30-nm-Chromatinfiber

Die Titration von Chromatin, beginnend bei niedriger monovalenter Salzkonzentration von 10 mM zu physiologischen Salzkonzentrationen von 100 mM oder höher, führt zu einer progressiven Faltung der „Perlenketten“-Struktur des 10-nm-Filaments [13-15, 62] in eine kompakte Fiber mit einem Durchmesser von ca. 30 nm [12, 55, 78]. Diese wird als 30-nm-Chromatinfiber bezeichnet (Abb. 1.7) [79]. Obwohl die Struktur des Nukleosoms durch Röntgenkristallographie bis zur atomaren Auflösung von 1,9 Å [6] bekannt ist, wird die präzise Anordnung der Nukleosomen innerhalb der Chromatinfiber nach wie vor kontrovers diskutiert [11, 12, 55, 80, 81]. Einzig die Lage des Linker-Histons, dessen Anwesenheit die Kompaktierung in die 30-nm-Fiber unterstützt [9, 62], aber dafür nicht zwingend notwendig ist, konnte bisher ermittelt werden: Immunologische Reaktionen [82], bei denen proteolytische Enzyme an der Oberfläche der Fiber angreifen, führten nicht zu einer Zersetzung von H1 oder H5. Folglich müssen sich die Histone geschützt im Inneren der Fiber befinden. Diese Position wird auch von Neutronenkleinwinkelstreuung [83] an verschiedenen Chromatinfibern, die mit normalem bzw. deuteriertem H1 rekonstituiert wurden, bestätigt. Nachdem die Streumuster der beiden Fibern zunächst übereinstimmen, lässt sich ab einem bestimmten Grad der Deuterierung des Lösungsmittels, ausschließlich die Streuung des deuterierten H1 messen. Aus den unterschiedlichen Gyrationradien wurde ermittelt, dass H1 ca. 6 - 6,5 nm von der Fiberachse entfernt ist, während die Distanz des Nukleosoms mit ca. 11,5 nm deutlich größer ist.

Um die gesamte Struktur experimentell zu bestimmen, müssen im Wesentlichen zwei Herausforderungen bewältigt werden [12]. Zum einen handelt es sich bei 30-nm-Chromatinfibern um sehr lange, irreguläre und dicht gepackte Strukturen, die z.B. bei tomographischen EM-Analysen nur wenig Kontrast zeigen. Zum anderen bewirken die ionischen Bedingungen, welche die Faltung der 30-nm-Fiber stabilisieren, gleichzeitig deren Aggregation. Diese kann einsetzen bevor Strukturparameter wie der Sedimentationskoeffizient ihre Titrationsendpunkte erreichen [55, 78].

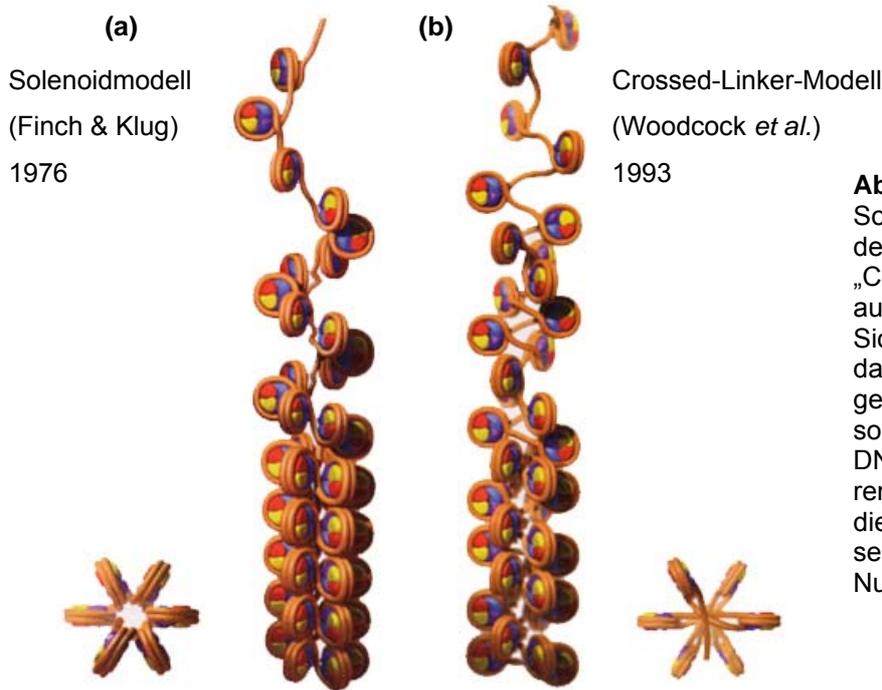


Abb. 1.7. Visualisierung des Solenoid-Modells (a) und des Zickzackmodells bzw. „Crossed-Linker“-Modells (b) aus Pollard *et al.* [1]. Die Sicht von oben verdeutlicht, dass beim Zick-Zack-Modell gegenüber liegende Nukleosomen durch gerade Linker-DNS verbunden sind, während beim Solenoid-Modell die Linker-DNS gebogen sein muss, um benachbarte Nukleosomen zu verbinden.

1.3.1 Modelle der Chromatinfiber

Während der letzten Jahrzehnte konnten mittels Elektronenmikroskopie [62, 79, 84-91], Röntgen- und Neutronenstreuung [83, 92-94], elektrischem und photochemischem Dichroismus [95-97], Sedimentationsanalysen [98-101], Nuklease Verdauungen [16, 102, 103] und Röntgenkristallographie [6-8, 104, 105] Hinweise auf die Struktur der 30nm Fiber gesammelt werden. Die daraus konstruierten Modelle lassen sich in zwei Klassen gliedern, welche nach wie vor kontrovers diskutiert werden [11, 12, 55, 80, 81]: das Solenoidmodell [55, 62, 79, 80] und das Zickzackmodell bzw. „Crossed-Linker“-Modell (Abb. 1.8) [9, 69, 106-110].

Das Solenoidmodell beruht im Wesentlichen auf Daten der Elektronenmikroskopie und der Lichtstreuung. Dabei nimmt die Chromatinfiber eine helikale Struktur aus aufeinander folgenden Nukleosomen an, deren flache Seiten nahezu parallel zur Längsachse der Fiber ausgerichtet sind. Die DNS-Eingangs- und Ausgangspunkte zeigen nach innen zur Achse des Solenoids. Um zwei Nukleosomen zu verbinden, muss die Linker-DNS nach innen gebogen werden, wodurch substanzielle Energiekosten entstehen. Die Zickzackmodelle kommen ohne diesen zusätzlichen Energieaufwand aus, da angenommen wird, dass eine gerade Linker-DNS zwei einander

gegenüber liegende Nukleosomen verbindet. Im dreidimensionalen Raum beschreibt die Linker-DNS einen Zickzackpfad.

Obwohl aktuelle elektronenmikroskopische Untersuchungen neue Hinweise auf das Solenoidmodell gaben [111], unterstützt die Mehrzahl der Experimente die Zickzackmodelle. So wurde mit Hilfe der Cryo-Elektronenmikroskopie [9, 65] bei niedriger Salzkonzentration zickzackförmiges Chromatin beobachtet, welches sich bei physiologischer Salzkonzentration kompaktiert und eine große Ähnlichkeit zu dem Zickzackmodell von Woodcock *et al.* [69] aufweist. Auch Bilder aus der Rasterkraftmikroskopie bestätigen diesen Eindruck [68, 107]. Massenbelegungsdichte, Öffnungswinkel der Linker-DNS und andere strukturelle Parameter, die durch Rasterkraftmikroskopie [68, 107], Neutronenstreuung und Rastertunnelelektronenmikroskopie (STEM) [93] bestimmt wurden, bestätigen die Zickzackmodelle. Daten über die Ausrichtung der Linker-DNS und der Nukleosomen aus photochemischen Dichroismus-Messungen [97] sowie die Verteilung der DNS-Fragmentlänge von Fibroblasten, welche durch ionisierende Strahlung erzeugt wurden [112], sprechen gegen das Solenoidmodell. Neue Ergebnisse aus Elektronenmikroskopie- und Verdauungsexperimenten von Oligonukleosomen weisen deutlich auf eine Zickzackstruktur hin [38]. Insbesondere zeigt die kürzlich veröffentlichte Röntgenkristallstruktur eines kompakten Tetranukleosoms [8] bei einer Auflösung von 9 Å einen Zickzackpfad zwischen den Nukleosomen, der nicht mit der Form eines Solenoidmodells vereinbar ist. Auch die geometrischen Modelle in unserer Arbeitsgruppe, welche auf dem Tetranukleosom basieren, entsprechen dem Crossed-Linker-Modell.

Dennoch ist die interne Struktur der dichten 30-nm-Chromatinfiber aufgrund der oben erwähnten Problematik noch nicht vollständig geklärt. Für das Verständnis der Genregulation und der Epigenetik ist die Struktur der Chromatinfiber sowie ihre Veränderungen bei ihrer Faltung im Interphase- oder Metaphase Chromosom von fundamentaler Bedeutung. Die essenziellen Mechanismen von Kondensation, Dekondensation und Remodellierung des Chromatins involvieren Streckung, Biegung und Torsion der 30-nm-Fiber und sind deshalb von ihrer Flexibilität abhängig. Entsprechende charakteristische Strukturparameter wurden kürzlich mit Hilfe von Mikromanipulations- und Einzelmolekültechniken gemessen. Ein Ziel dieser Arbeit ist es, mit Hilfe von Computersimulationen solche Strukturparameter wie Massenbelegungsdichte, Persistenzlänge, Streckmodul und Sedimentationskoeffizient vorauszusagen und durch den

Vergleich mit den experimentellen Ergebnissen grundlegend zum Verständnis der 30-nm-Fiber beizutragen.

1.3.2 Massenbelegungsdichte und Sedimentationskoeffizient

Neben dem Durchmesser der 30-nm-Chromatinfiber sind die Massenbelegungsdichte und der Sedimentationskoeffizient wichtige strukturelle Parameter, welche die Kompaktierung der Chromatinfiber charakterisieren. Die Massenbelegungsdichte ist das Verhältnis aus der Anzahl der Nukleosomen zur Konturlänge der Fiber. Aus historischen Gründen, die ihren Ursprung in den Streumaxima der ersten Röntgenstreuexperimente der 30-nm-Fiber haben [113, 114], wird sie als Nukleosomen pro 11 nm angegeben, wobei 11 nm als Steigung der Fiber angenommen wird [11]. Neben Neutronen- und Röntgenstreuung lässt sich die Massenbelegungsdichte auch mit Lichtstreuung, analytischer Ultrazentrifugation und Rastertunnelelektronenmikroskopie (STEM) messen [11]. Dabei ergibt sich bei physiologischer Salzkonzentration ein Wert zwischen 5-7 Nukleosomen pro 11 nm und einem Durchmesser von 30 nm [11]. Eine Ausnahme von diesem Konsensus sind STEM Messungen bei 150 mM Na⁺ von 12 Nukleosomen pro 11 nm [86], allerdings sind die verwendeten Hühnerythrozyten bekanntermaßen bei diesen Salzkonzentrationen nicht stabil, so dass Aggregatbildung der Grund für diese hohen Werte sein kann.

Hühnerythrozyten wurden auch von Gerchman und Ramakrishnan [93] in aktuelleren STEM- und Neutronenstreuungsexperimenten bei verschiedenen Salzkonzentrationen verwendet. Dabei zeigte sich ein Anstieg der Massenbelegungsdichte bei steigender Ionenkonzentration, der einen Sättigungswert zwischen 6 und 7 Nukleosomen pro 11 nm bei physiologischen Bedingungen erreicht. Ein Übergang zwischen der 10-nm und 30-nm-Fiber wurde nicht beobachtet. Dagegen ergaben andere Arbeiten, die im Gegensatz zu Gerchman *et al.* keine stabilisierenden Reagenzien wie Spermin oder Spermidin verwendeten, geringere Werte von 4,2 Nukleosomen pro 11 nm bei 70 mM NaCl [115].

Der Sedimentationskoeffizient hängt bei gleich bleibender molekularer Masse im Wesentlichen von der Reibung der betrachteten Oligonukleosomkette ab und ermöglicht somit Rückschlüsse auf deren Kompaktierung. Typischerweise wird der Sedimentationskoeffizient mit Hilfe der analytischen Ultrazentrifugation bestimmt. Hansen

et al. [116] konnten mit dieser Methode zeigen, dass sich bei steigender Salzkonzentration der Sedimentationskoeffizient von 29 S bei 10 mM NaCl auf ca. 35 S bei 100 mM NaCl erhöht. Dabei geht das Chromatin von einer ausgedehnten zu einer kompakteren Form über. Von theoretischer Seite wurden diese Daten kaum behandelt oder reproduziert. Nur die Gruppe Sun *et al.* konnte in kürzlich veröffentlichten Computersimulationen mit Hilfe des DiSCO-Modells (vgl. 1.2.3) und flexiblen Ketten als Histon-Tails eine gute Übereinstimmung mit dem Experiment erzielen [54].

1.3.3 Persistenzlänge und Streckmodul

Die Flexibilität einer Polymerkette kann durch die Biegepersistenzlänge L_p charakterisiert werden, welche als Korrelationslänge der Tangentenvektoren an die Kettenachse definiert ist. Für die 30-nm-Chromatinfiber ist dieser Wert umstritten. Experimente, Simulationen und Theorie weisen auf einen Wert in einen großen Bereich zwischen 30 nm und 260 nm hin. Kleine Werte von $L_p = 30 - 50$ nm wurden in Rasterkraftmikroskopieanalysen (SFM) des End-zu-End-Abstandes bestimmt, bei der sich die Chromatinfiber auf einer Glimmeroberfläche befand [117, 118]. Hierbei muss beachtet werden, dass die mit SFM bestimmte Persistenzlänge stark von den Bindungsbedingungen der Fiber auf dem Glimmer abhängt [119]. Die Verwendung von optischen Pinzetten zur Streckung von Chromatinfibern bei niedrigen Salzkonzentrationen ergaben $L_p = 30$ nm [120], allerdings werden keine Werte für physiologische Salzkonzentrationen angegeben. Geringe Persistenzlängen $L_p = 30 - 50$ nm postulierte man auch aus Rekombinationsfrequenzen in humanen Zellen [121] und Formaldehyd-Vernetzungswahrscheinlichkeiten in Hefe [122].

Andere Gruppen bestimmten steifere Fibern mit einer Persistenzlänge im Bereich von 100 – 200 auf der Basis von Abstandsverteilungen für genetische Markerpaare in humanen Fibroblastkernen [123-125]. Auch aktuellere experimenten in Sprosshefe (*S. cerevisiae*) mit Hilfe von *in situ* Hybridisierung und Videomikroskopie [126] stimmen mit diesen Werten überein. Steifere Fibern im Bereich von $L_p = 200 - 250$ nm werden von Computersimulationen von Mergell *et al.* vorausgesagt [127].

Cui und Bustamante [120], Bennink *et al.* [128], Brower-Toland *et al.* [129] und Leuba *et al.* [130] untersuchten kürzlich die mechanischen Eigenschaften der Chromatinfiber mit Hilfe von Streckexperimenten. Während für Kräfte kleiner als 10 – 20 pN kein

Strukturübergang beobachtet wird, bewirkten Kräfte über 20 pN eine Ablösung der Nukleosomen von der Chromatinkette. Allerdings sind physikalische Größen wie der Streckmodul der Chromatinfaser noch Gegenstand der wissenschaftlichen Diskussion. Durch Streckexperimente mit optischen Pinzetten an einem mit Nukleosomen assemblierten Lambda-Phagen-DNS Extrakt, gelang es Bennink *et al.* [128] ein Streckmodul von 150 pN bei einer Salzkonzentration von 150 mM NaCl zu bestimmen. Computersimulationen weisen auf ein Streckmodul in einem weiten Bereich zwischen 60 – 240 pN hin, wobei dieser von der Salzkonzentration und der Fasergeometrie abhängt [127].

Kapitel 2

Physikalische Grundlagen

Dieses Kapitel gibt einen Überblick über die grundlegenden Konzepte der Polymerphysik und Prinzipien der Monte-Carlo-Methode. Dabei handelt es sich um die theoretischen Grundlagen für die Simulationen und deren Auswertung. Zunächst werden die typischen Modelle für Polymerketten aus der statistischen Physik behandelt. Anschließend wird auf den, in den Simulationen verwendeten, Monte-Carlo-Algorithmus von Metropolis eingegangen.

2.1 Polymerphysik

Die folgenden Ausführungen basieren im Wesentlichen auf den Lehrbüchern von Doi und Edward [131], Grosberg und Khokhlov [132] und Flory [133].

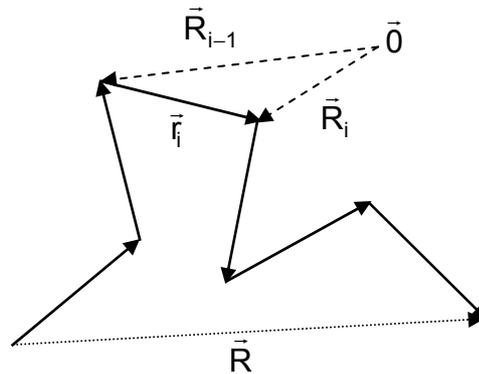
2.1.1 Ideale Zufallskette (freely jointed chain)

Modelle einer Polymerkette erlauben es, fundamentale entropische Eigenschaften von Makromolekülen zu charakterisieren. Das einfachste Modell ist die ideale Zufallskette (freely jointed chain). Sie besteht aus $N+1$ Knoten mit den Ortsvektoren $\{\vec{R}_i\} = (\vec{R}_0, \dots, \vec{R}_N)$ und N starren Segmenten $\{\vec{r}_i\} = (\vec{r}_1, \dots, \vec{r}_N)$ der konstanten Länge b , welche an ihren Verbindungsstellen frei drehbar sind. Es gilt der Zusammenhang:

$$\vec{r}_i = \vec{R}_i - \vec{R}_{i-1}, \quad i = 1 \dots N. \quad (2.1)$$

Die ideale Kette berücksichtigt keine Wechselwirkung zwischen den Segmenten, insbesondere keinen Volumenausschluss. Ihre Konturlänge beträgt $L_0 = N \cdot b$.

Abb. 2.1.
Skizze einer idealen
Zufallskette.



End-zu-End-Abstand

Zur Charakterisierung einer Kette wird, neben der Konturlänge L_0 , der mittlere quadratische End-zu-End-Abstand $\langle \bar{R}^2 \rangle$ verwendet. Es gilt:

$$\bar{R} = \bar{R}_{0N} = \bar{R}_N - \bar{R}_0 = \sum_{i=1}^N \bar{r}_i, \quad (2.2)$$

$$\langle \bar{R}^2 \rangle = \left\langle \left(\sum_{i=1}^N \bar{r}_i \right)^2 \right\rangle = \sum_{i=1}^N \langle \bar{r}_i^2 \rangle + \sum_{1 \leq i < j \leq N} \langle \bar{r}_i \bar{r}_j \rangle, \quad (2.3)$$

wobei der Mittelwert über eine hinreichend große Zahl an Kettenkonformationen gebildet wird.

Dagegen ist der Mittelwert des End-zu-End-Abstands $\langle \bar{R} \rangle$ ungeeignet zur Beschreibung der durchschnittlichen Größe eines Makromoleküls, denn es gilt $\langle \bar{R} \rangle = 0$. Dies folgt aus (2.2), da Mittelung über alle Orientierungen \bar{r}_i einer Zufallskette den Erwartungswert $\langle \bar{r}_i \rangle = 0$ ergibt.

In einer idealen Zufallskette sind die Richtungen der Segmente nicht korreliert, so dass alle Winkel zwischen den Vektoren \bar{r}_i und \bar{r}_j ($i \neq j$) mit der gleichen Wahrscheinlichkeit vorkommen, d.h.:

$$\langle \bar{r}_i \bar{r}_j \rangle = b^2 \langle \cos \vartheta_{ij} \rangle = 0. \quad (2.4)$$

Weiter gilt $\langle \bar{r}_i^2 \rangle = b^2$, so dass für den End-zu-End-Abstand einer idealen Kette aus (2.3) folgt:

$$\langle \bar{R}^2 \rangle = N \cdot b^2. \quad (2.5)$$

Der End-zu-End-Abstand $R = \langle \bar{R}^2 \rangle^{1/2} \sim N^{1/2} b$ einer langen idealen Kette ($N \gg 1$) ist wesentlich kleiner als ihre Konturlänge $L_0 = N \cdot b$. Die Kette ist typischerweise also im thermodynamischen Gleichgewicht nicht gestreckt, sondern hat die Form eines „Zufallsknäuels“.

Eine spezifischere Charakterisierung der mittleren Größe eines Polymers erhält man durch die Wahrscheinlichkeitsverteilung $P_N(\bar{R})$ des End-zu-End-Vektors einer Zufallskette mit N Segmenten. Der End-zu-End-Abstand \bar{R} ist die Summe von N unabhängigen, zufällig orientierten Segmentvektoren \vec{r}_i . Interpretiert man \bar{R} als Zufallsvariable, dann besitzt diese nach dem Zentralen Grenzwertsatz der Wahrscheinlichkeitstheorie für große N eine Gaußverteilung:

$$P_N(\bar{R}) = \left(\frac{3}{2\pi N b^2} \right)^{3/2} \exp\left(-\frac{3\bar{R}^2}{2N b^2} \right). \quad (2.6)$$

Der Faktor $\left(\frac{3}{2\pi N b^2} \right)^{3/2}$ ergibt sich aus der Normierungsbedingung $\int P_N(\bar{R}) d^3 R = 1$.

Aus dieser Verteilung lassen sich alle Momente berechnen [132]:

$$\langle (\bar{R}^2)^n \rangle = \int (\bar{R}^2)^n P_N(\bar{R}) d^3 R = (N b^2)^n \left[\frac{1 \cdot 3 \cdot \dots \cdot (2n+1)}{3^n} \right]. \quad (2.7)$$

Da die Gaußverteilung eine gerade Funktion ist, sind die Mittelwerte der ungeraden Potenzen $\langle (\bar{R}^2)^{2n+1} \rangle$ Null. Für das zweite Moment erhält man übereinstimmend mit (2.5)

$$\langle (\bar{R}^2)^1 \rangle = \int (\bar{R}^2)^1 P_N(\bar{R}) d^3 R = N b^2.$$

Es sei noch bemerkt, dass sich mit Hilfe von (2.7) unmittelbar die relative Fluktuation von \bar{R}^2 bestimmen lassen:

$$\frac{\langle (\bar{R}^2 - \langle \bar{R}^2 \rangle)^2 \rangle}{\langle \bar{R}^2 \rangle^2} = \frac{\langle \bar{R}^4 \rangle - \langle \bar{R}^2 \rangle^2}{\langle \bar{R}^2 \rangle^2} = \frac{2}{3}. \quad (2.8)$$

Damit sind die Fluktuationen von \bar{R}^2 in der Größenordnung des Mittelwerts, d.h. es handelt sich um ein stark fluktuierendes System.

Gyrationsradius

Ein anderer wichtiger Strukturparameter ist der Gyrationsradius s . Bei gleichen Massen der betrachteten Molekülgruppen bzw. Atome wird er durch:

$$s^2 = \frac{\sum_{i=0}^N m_i \bar{s}_i^2}{\sum_{i=0}^N m_i} = \frac{m \sum_{i=0}^N \bar{s}_i^2}{m(N+1)} = \frac{1}{N+1} \sum_{i=0}^N \bar{s}_i^2 \quad (2.9)$$

berechnet. Dabei definieren die \bar{s}_i die Abstandsvektoren der Atome vom Schwerpunkt des Systems.

Das Theorem von Lagrange [133] setzt den Schwerpunkt eines Systems von Massen in Relation zu ihren gegenseitigen Abständen. Es gilt:

$$s^2 = \frac{1}{(N+1)^2} \sum_{i=0}^N \sum_{j=0}^N \bar{R}_{ij}^2, \quad (2.10)$$

$$\text{mit } \bar{R}_{ij} = \bar{R}_j - \bar{R}_i = \sum_{t=i+1}^j \bar{r}_t$$

Für die ideale Zufallskette gilt:

$$\langle \bar{R}_{ij}^2 \rangle = (j-i) \cdot b^2, \quad (2.11)$$

so dass sich der mittlere quadratische Gyrationsradius zu:

$$\langle s^2 \rangle = \frac{1}{(N+1)^2} \sum_{i=0}^N \sum_{j=0}^N \langle \bar{R}_{ij}^2 \rangle = \frac{b^2}{(N+1)^2} \sum_{i=0}^N \sum_{j=0}^N (j-i) \quad (2.12)$$

ergibt. Mit Hilfe von Vollständiger Induktion kann man zeigen:

$$\frac{\langle s^2 \rangle}{Nb^2} = \frac{1}{6} \frac{(N+2)}{(N+1)}. \quad (2.13)$$

Für $n \rightarrow \infty$ erhält man unter Verwendung von (2.5):

$$\lim_{N \rightarrow \infty} \frac{\langle s^2 \rangle}{\langle \bar{R}^2 \rangle} = \frac{1}{6}. \quad (2.14)$$

Das bedeutet, dass der Gyrationradius und der mittlere quadratische End-zu-End-Abstand in einem konstanten Verhältnis zueinander stehen und nur verschiedene Maße für dieselbe Eigenschaft einer Polymerkette sind.

2.1.2 Kuhnlänge L_{Kuhn}

Neben der idealen Zufallskette existieren noch weitere Modelle, wie z.B. das Gaußsche Kettenmodell. Dabei sind die Segmentlängen nicht konstant, sondern besitzen eine Gaußsche Wahrscheinlichkeitsverteilung, deren Erwartungswert gerade der Segmentlänge b entspricht. Ein analoges Modell betrachtet die Polymerkette als eine Verknüpfung von elastischen Federn. Beide Ansätze führen zum bereits bei der idealen Zufallskette beobachteten Skalierungsverhalten des mittleren quadratischen End-zu-End-Abstands $\langle \bar{R}^2 \rangle \sim N$.

Nachteil dieser Modelle ist, dass keine intrinsische Steifigkeit berücksichtigt wird. Deshalb ist es nötig die Steifheit einer Polymerkette zu parametrisieren. Eine solche Parametrisierung ist die Kuhnlänge L_{Kuhn} . Eine reale Kette der Länge L_0 wird dabei von N' hypothetischen Segmenten der Kuhnlänge L_{Kuhn} beschrieben, die analog zur idealen Zufallskette frei drehbar sind. Dabei müssen folgende Bedingungen erfüllt werden:

$$N' L_{\text{Kuhn}} = L_0, \quad (2.15 \text{ (a)})$$

$$N' (L_{\text{Kuhn}})^2 = \langle \bar{R}^2 \rangle. \quad (2.15 \text{ (b)})$$

Experimentell lässt sich die Kuhnlänge durch die Messung des mittleren End-zu-End-Abstands und der Konturlänge aus (2.15) mittels $L_{\text{Kuhn}} = \langle \bar{R}^2 \rangle / L_0$ berechnen, falls $L_0 \gg L_{\text{Kuhn}}$. Ist dagegen die Kuhnlänge eines Polymers bekannt, so erhält man den korrekten End-zu-End-Abstand, indem das Polymer durch eine ideale Zufallskette mit der Kuhnlänge als Segmentlänge approximiert wird.

2.1.3 Wurmartige oder persistente Kette (WLC)

Der Nachteil der Kuhnlänge besteht darin, dass sie nur im Bereich $L_0 \gg L_{\text{Kuhn}}$ realistische Werte für den End-zu-End-Abstand liefert.

Dieses Problem wird durch die wurmartige (wormlike) bzw. persistente Kette behoben, die auch als Porod-Kratky-Modell bezeichnet wird. Hierbei wird das Polymer als ein gerader, relativ steifer Stab behandelt, der aus einem kontinuierlichen, homogenen, isotropen Material besteht.

Biegeelastizität

Sei $\vec{R}(s)$ die Position eines Punkts auf einer Polymerkette bei der Konturlänge s , wobei diese Kette eine konstante maximale Konturlänge L_0 hat. Für die Biegeenergie eines Stabes gilt:

$$U_{\text{Biege}} = \frac{1}{2} D_{\text{Biege}} \int_0^{L_0} ds \left(\frac{\partial \vec{u}}{\partial s} \right)^2, \quad (2.16)$$

wobei $\vec{u}(s)$ der normierte Tangentenvektor an die Kette im Punkt s ist und D_{Biege} der Biegemodul. Im Wärmebad ist die Verteilungsfunktion $\Psi(\vec{u})$ gegeben durch die Boltzmann-Verteilung:

$$\Psi(\vec{u}) \sim \exp\left(-\frac{U_{\text{Biege}}}{k_B T}\right) = \exp\left(-\frac{1}{2} \frac{D_{\text{Biege}}}{k_B T} \int_0^{L_0} ds \left(\frac{\partial \vec{u}}{\partial s} \right)^2\right). \quad (2.17)$$

Für kleine s lässt sich aus dieser Gleichung zeigen [131]:

$$\langle (\vec{u}(s) - \vec{u}(0))^2 \rangle = 2 \frac{k_B T}{D_{\text{Biege}}} s, \quad (2.18)$$

woraus für die Korrelation folgt:

$$\langle \vec{u}(s) \cdot \vec{u}(0) \rangle = \exp\left(-\frac{k_B T}{D_{\text{Biege}}} s\right) = \exp\left(-\frac{s}{L_p}\right), \quad (2.19)$$

$$\text{mit } L_p := \frac{D_{\text{Biege}}}{k_B T}. \quad (2.20)$$

Dies bedeutet, dass die Korrelation der Orientierungen zwischen zwei Punkten einer Fiber exponentiell mit wachsendem Abstand abfällt. Die Korrelationslänge L_p ist ein charakteristischer Parameter für die Biegeflexibilität des entsprechenden Polymers und wird als dessen Persistenzlänge bezeichnet. Dieser Teilabschnitt der Länge L_p des Polymers kann sozusagen als steif betrachtet werden. In analoger Weise lässt sich auch eine Persistenzlänge der Torsion definieren.

Für den End-zu-End-Abstand gilt im kontinuierlichen Fall analog zu (2.2)

$$\bar{\mathbf{R}} = \int_0^{L_0} \bar{\mathbf{u}}(s) ds. \quad (2.21)$$

Damit erhält man analog zu (2.3):

$$\langle \bar{\mathbf{R}}^2 \rangle = \int_0^{L_0} ds \int_0^{L_0} ds' \langle \bar{\mathbf{u}}(s) \bar{\mathbf{u}}(s') \rangle. \quad (2.22)$$

Einsetzen von (2.19) ergibt:

$$\langle \bar{\mathbf{R}}^2 \rangle = 2 \int_0^{L_0} ds \int_0^s ds' \exp\left(-\frac{s-s'}{L_p}\right). \quad (2.23)$$

Nach Integration folgt [133]:

$$\langle \bar{\mathbf{R}}^2 \rangle = 2L_p^2 \left(\frac{L_0}{L_p} - 1 + \exp\left(-\frac{L_0}{L_p}\right) \right) = 2L_p L_0 \left(1 - \frac{L_p}{L_0} \left(1 - \exp\left(-\frac{L_0}{L_p}\right) \right) \right). \quad (2.24)$$

Diese Formel wird auch als Porod-Kratky-Gleichung bezeichnet.

Für die beiden Grenzfälle von (2.24) gilt:

$$(i) \langle \bar{\mathbf{R}}^2 \rangle \rightarrow L_0^2 \quad \text{für } L_p \gg L_0$$

$$(ii) \langle \bar{\mathbf{R}}^2 \rangle \rightarrow 2L_p L_0 \quad \text{für } L_0 \gg L_p$$

Fall (i) zeigt, dass kurze Moleküle nur schwer zu biegen sind und ihr End-zu-End-Abstand praktisch mit ihrer Konturlänge übereinstimmt.

Fall (ii) stimmt mit der idealen bzw. Gaußschen Kette überein, falls als Segmentlänge b im idealen Modell die doppelte Persistenzlänge verwendet wird:

$$\langle \bar{R}^2 \rangle = Nb^2 = \frac{L_0}{(2L_p)} (2L_p)^2 = L_0 (2L_p) = L_0 L_{\text{Kuhn}}. \quad (2.25)$$

Folglich verhält sich eine lange wurmartige Kette wie eine ideale Zufallskette, bei der die Segmentlänge bzw. die Kuhnlänge gerade der doppelten Persistenzlänge entspricht. Anschaulich kann dieser Faktor 2 als Hinweis interpretiert werden, dass sich die Erinnerung an die Segmentorientierung sich in zwei entgegengesetzte Richtungen „ausbreitet“.

2.2 Monte-Carlo-Verfahren

Die nachfolgenden Ausführungen orientieren sich hauptsächlich am Lehrbuch von Binder und Heermann [134].

Unter Monte-Carlo-Verfahren versteht man Methoden, bei denen eine repräsentative Stichprobe eines Ensembles berechnet wird. Dabei werden Prinzipien der Wahrscheinlichkeitsrechnung und der Statistik angewendet, um komplexe Probleme näherungsweise zu lösen. Da die Verwendung von Zufallszahlen ein wesentliches Element dieser Verfahren ist, nennt man sie in Anlehnung an die bekannte Glücksspielmetropole Monte-Carlo-Verfahren.

Eine typische Anwendung von Monte-Carlo-Verfahren ist die Berechnung von Integralen. Deshalb werden sie häufig in der statistischen Physik eingesetzt, um etwa Erwartungswerte von Observablen zu bestimmen. Eine Observable ist in der Physik der formale Name einer Messgröße. Ist $p(\bar{x})$ die Wahrscheinlichkeitsdichte, welche das statistische Gewicht einer Konfiguration \bar{x} im Phasenraum Ω beschreibt, so ist der Mittelwert der Observablen $A(\bar{x})$ definiert als:

$$\langle A(\bar{x}) \rangle = \int_{\Omega} d\bar{x} p(\bar{x}) A(\bar{x}). \quad (2.26)$$

Ist $H(\vec{x})$ die Hamiltonfunktion bzw. der Hamiltonoperator, die den Phasenraum Ω beschreibt, dann ist im kanonischen Ensemble bei thermodynamischem Gleichgewicht das statistische Gewicht durch den normalisierten Boltzmannfaktor

$$p(\vec{x}) = \frac{1}{Z} \exp(H(\vec{x})/k_B T), \quad (2.27)$$

mit der Zustandssumme $Z = \int_{\Omega} d\vec{x} \exp(H(\vec{x})/k_B T)$ gegeben.

In diesem Fall folgt aus (2.26):

$$\langle A(\vec{x}) \rangle = \int_{\Omega} d\vec{x} p(\vec{x}) A(\vec{x}) = \frac{1}{Z} \int_{\Omega} d\vec{x} \exp(H(\vec{x})/k_B T) A(\vec{x}). \quad (2.28)$$

2.2.1 Simple Sampling

Das Gesetz der großen Zahlen besagt nun, dass $\bar{A}(\vec{x})$ als empirisches Mittel berechnet werden kann, indem zufällig eine statistische Probe von N Konformationen $\{\vec{x}_1, \dots, \vec{x}_N\}$ des Phasenraums gemäß der Wahrscheinlichkeitsverteilung $p(\vec{x})$ gezogen wird:

$$\langle A(\vec{x}) \rangle = \frac{1}{Z} \int_{\Omega} d\vec{x} \exp(H(\vec{x})/k_B T) A(\vec{x}) \approx \frac{\sum_{i=1}^N \exp(H(\vec{x}_i)/k_B T) A(\vec{x}_i)}{\sum_{i=1}^N \exp(H(\vec{x}_i)/k_B T)}. \quad (2.29)$$

Das Hauptproblem besteht darin, dass das statistische Gewicht $p(\vec{x})$, insbesondere der Normierungsfaktor Z , unbekannt oder nur sehr schwer zu berechnen ist. Beim *Simple Sampling* werden aus diesem Grund N Konformationen aus dem Phasenraum mit gleicher Wahrscheinlichkeit gezogen und aufsummiert. Bei inhomogen verteilten statistischen Gewichten, welche z.B. bei höher dimensionalen Integralen häufig vorkommen, ist das Verfahren allerdings ineffektiv. Ursache hierfür ist die fortwährende Summation von insignifikanten Beiträgen durch das Ziehen aus den homogen verteilten Konformationen.

2.2.2 Importance Sampling

Um dieses *Simple Sampling* effizienter zu gestalten, ist es sinnvoll die Konformationen, welche zur Summation beitragen, nicht komplett zufällig zu wählen. Es sollten vielmehr diejenigen Konformationen bevorzugt ausgewählt werden, die auch entscheidend zum Mittelwert beitragen.

Seien $\{\bar{x}_j\}$ Konformationen des Phasenraums Ω , die entsprechend einer Wahrscheinlichkeit $P(\bar{x}_j)$ ausgewählt wurden, dann wird Gleichung (2.29) ersetzt durch:

$$\langle A(\bar{x}) \rangle = \frac{\sum_{j=1}^N \exp(H(\bar{x}_j)/k_B T) A(\bar{x}_j) / P(\bar{x}_j)}{\sum_{j=1}^N \exp(H(\bar{x}_j)/k_B T) / P(\bar{x}_j)}. \quad (2.30)$$

Eine nahe liegende Wahl für $P(\bar{x}_j)$ ist $P(\bar{x}_j) \propto \exp(H(\bar{x}_j)/k_B T)$, da sich somit die Boltzmannfaktoren kürzen und (2.30) zu einem einfachen arithmetischen Mittel wird:

$$\langle A(\bar{x}) \rangle = \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N A(\bar{x}_j). \quad (2.31)$$

Das Hauptproblem besteht allerdings darin, ein Verfahren zu finden, welches ein solches *Importance Sampling* in der Praxis realisiert. Metropolis *et al.* [135] gelang es, ein solches Verfahren zu entwickeln. Sie wählten dabei aufeinander folgende Konformationen nicht unabhängig voneinander, sondern entwarfen einen Markov-Prozess¹, bei dem die nachfolgende Konformation \bar{x}_{j+1} aus den vorangegangenen Konformation \bar{x}_j mit einer Übergangswahrscheinlichkeit $W(\bar{x}_j \rightarrow \bar{x}_{j+1})$ konstruiert wurde. Die Übergangswahrscheinlichkeit wurde so gewählt, dass im Limes $N \rightarrow \infty$, die Verteilungsfunktion $P(\bar{x}_j)$, der durch den Markov-Prozess konstruierten Konformationen, gegen die gewünschte Gleichgewichtsverteilung

¹ Ein Markov-Prozess ist eine Markov-Kette in stetiger Zeit. Ein Markov-Kette ist ein spezieller stochastischer Prozess, bei dem die Wahrscheinlichkeit eines Zustands $t+1$ nur von n vorhergehenden Zuständen abhängt. Üblicherweise betrachtet man Markov-Ketten der ersten Ordnung ($n=1$), so dass der zukünftige Zustand nur vom gegenwärtigen Zustand und nicht von den vorherigen Zuständen abhängt.

$$P_{\text{eq}}(\bar{x}_j) = \frac{1}{Z} \exp(H(\bar{x}_j)/k_B T) \quad (2.32)$$

konvergiert.

Für diesen stochastischen Prozess lässt sich eine Kontinuitätsgleichung für die Wahrscheinlichkeitsdichten, eine so genannte Mastergleichung, angeben:

$$\frac{\partial P(\bar{x}_j, t)}{\partial t} = \sum_{\bar{x}_{j'}} [W(\bar{x}_{j'} \rightarrow \bar{x}_j) P(\bar{x}_{j'}, t) - W(\bar{x}_j \rightarrow \bar{x}_{j'}) P(\bar{x}_j, t)]. \quad (2.33)$$

Die zeitliche Änderung der Wahrscheinlichkeitsdichte ist die Bilanz der „zufließenden“ Wahrscheinlichkeitsströme aus allen $\bar{x}_{j'}$ in den Zustand \bar{x}_j und der „abfließenden“ Wahrscheinlichkeitsströme vom Zustand \bar{x}_j in alle $\bar{x}_{j'}$.

Im Gleichgewicht verschwindet die rechte Seite der Gleichung. Die Übergangswahrscheinlichkeiten werden nun derart gewählt, dass sie die strengere Bedingung des detaillierten Gleichgewichts erfüllen. Dies bedeutet, dass nicht nur die Summe in (2.33) Null ergibt, sondern jeder einzelne Summand.

Im detaillierten Gleichgewicht wird somit für alle \bar{x}_j und $\bar{x}_{j'}$:

$$W(\bar{x}_{j'} \rightarrow \bar{x}_j) P_{\text{eq}}(\bar{x}_{j'}, t) = W(\bar{x}_j \rightarrow \bar{x}_{j'}) P_{\text{eq}}(\bar{x}_j, t) \quad (2.34)$$

gefordert. Daraus folgt, dass das Verhältnis der Übergangswahrscheinlichkeiten einer Bewegung $\bar{x}_j \rightarrow \bar{x}_{j'}$ und der inversen Bewegung $\bar{x}_{j'} \rightarrow \bar{x}_j$ nur von der Energieänderung $\Delta H = H(\bar{x}_{j'}) - H(\bar{x}_j)$ abhängt:

$$\frac{W(\bar{x}_j \rightarrow \bar{x}_{j'})}{W(\bar{x}_{j'} \rightarrow \bar{x}_j)} = \frac{P_{\text{eq}}(\bar{x}_{j'}, t)}{P_{\text{eq}}(\bar{x}_j, t)} = \exp(-\Delta H/k_B T). \quad (2.35)$$

Hier ist der entscheidende Vorteil, dass sich die Zustandssumme Z herauskürzt und nicht mehr berechnet werden muss.

Der kanonische Vorschlag von Metropolis *et al.* [135] lautet:

$$W(\bar{x}_j \rightarrow \bar{x}_{j'}) = \begin{cases} \exp(-\Delta H/k_B T), & \text{falls } \Delta H > 0 \\ 1, & \text{sonst} \end{cases}. \quad (2.36)$$

Es lässt sich zeigen, dass diese Wahl der Wahrscheinlichkeiten das detaillierte Gleichgewicht erfüllt.

Wird die Funktion W so konstruiert, dass jeder Zustand von jedem anderen Zustand nach endlich vielen Übergängen erreichbar ist (Ergodizität), dann ist die Gleichgewichtsdichte eindeutig. Damit konvergiert das Metropolisverfahren gegen das charakteristische Gleichgewicht $P_{\text{eq}}(\bar{x}_j)$, so dass gilt:

$$\langle A(\bar{x}) \rangle = \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N A(\bar{x}_j), \quad (2.37)$$

wobei die \bar{x}_j nach dem Metropolis-Algorithmus erzeugt werden.

Der Metropolis-Algorithmus lässt sich wie folgt formulieren:

Zunächst wird ein erlaubter Startzustand \bar{x}_0 erzeugt.

Nach dem Zufallsprinzip wird ein neuer Zustand ausgewählt (Monte-Carlo-Schritt).

Die Energie des neuen Zustands wird mit der Energie des alten Zustands verglichen. Ist die Energie des neuen Zustands kleiner, d.h. $\Delta H \leq 0$, so wird der neue Zustand akzeptiert. Gilt $\Delta H > 0$, so wird eine Zufallszahl ξ aus dem Intervall $[0,1]$ generiert. Falls $\xi \leq \exp(-\Delta H/k_B T)$, so wird die neu erzeugte Konformation akzeptiert. Ansonsten wird sie verworfen und stattdessen die alte Konformation verwendet. Damit ergibt sich eine Akzeptanzwahrscheinlichkeit für neu generierte Zustände entsprechend der Metropolisfunktion (2.36).

Die Schritte 2. und 3. werden solange wiederholt, bis eine ausreichende Anzahl von Zuständen erzeugt wurde. Anschließend erfolgt die Berechnung des Mittelwerts der Observablen nach (2.27).

Bei dem Algorithmus ist darauf zu achten, dass die physikalischen Parameter unmittelbar aufeinander folgender Konformationen im Allgemeinen stark korrelieren. Zur Auswertung sollten deshalb nur Konformationen verwendet werden, die mindestens um die Korrelationslänge auseinander liegen und somit als unabhängig angesehen werden können. Weiterhin besitzen Konformationen, welche unmittelbar nach der willkürlichen Ausgangskonformation erzeugt wurden, noch nicht die kanonische Ver-

teilung $P_{\text{eq}}(\bar{x}_j)$, sondern „erinnern“ sich an die Startkonformation. Folglich muss zunächst eine bestimmte Anzahl von Konformationen erzeugt werden, die zur Relaxierung bzw. Äquilibration des Systems dienen. Diese werden nicht in der Analyse verwendet.

Die Monte-Carlo-Schritte sind so zu wählen, dass alle Konformationen mit gleicher Wahrscheinlichkeit vorgeschlagen werden. Dadurch wird vermieden, dass ein weiterer Faktor in die Übergangswahrscheinlichkeit eingeführt wird. Die Generierung des Zustandes \bar{x}_{j+1} aus Zustand \bar{x}_j ist folglich genauso wahrscheinlich wie der umgekehrte Vorgang. Damit der Algorithmus gegen das charakteristische Gleichgewicht $P_{\text{eq}}(\bar{x}_j)$ konvergiert, muss die Wahrscheinlichkeit, jede Konformation nach einer endlichen Anzahl von Monte-Carlo-Schritten zu generieren, größer als Null sein, d.h. der Algorithmus muss ergodisch sein.

Kapitel 3

Modellierung

Bereits bei der Molekulardynamischen Simulation eines einzelnen Nukleosoms, welches aus ca. 20000 Atomen besteht, erreichen heutige Computer ihre Grenzen. Eine Chromatinfiber, die aus mehreren Nukleosomen in Lösung besteht, liegt zurzeit jenseits der Anwendbarkeit dieser Methode. Die Herausforderung besteht darin, das komplexe atomare System der Fiber auf seine wesentlichen Elemente zu reduzieren. Dabei wird auf atomare Details verzichtet, um aus diesem einfacheren System durch Brownsche-Dynamik oder Monte-Carlo-Simulation sinnvolle Aussagen zu gewinnen (coarse graining). Interatomare Wechselwirkungen werden dabei durch effektive Potentiale ersetzt bzw. zusammengefasst.

Grundlage meiner Simulationen ist das von Gero Wedemann im Rahmen seiner Doktorarbeit implementierte Modell der Chromatinfiber (GW-Modell) [3]. Die Abschnitte 3.1-3.5 geben einen ausführlichen Überblick über dessen geometrische Beschreibung und die verwendeten Potentiale.

- Allerdings ist das GW-Modell weder in der Lage die Streckung noch die salzabhängige Kompaktierung der Chromatinfiber zu beschreiben. Deshalb erweitere ich das Modell in drei wesentlichen Punkten, die in Abschnitt 3.6 - 3.8 dargestellt werden:
- Modellierung einer externen Streckkraft¹,
- Entwicklung und Implementierung einer neuen Nukleosom-Nukleosom-Wechselwirkung zur Simulation der salzabhängigen Kompaktierung,
- Möglichkeit zur Variation der Anknüpfungspunkte der Linker-DNS

¹ Der Programmcode wurde von Maiwen Caudron (EMBL, Meyerhofstrasse 1, Postfach 102209, D-69117 Heidelberg) im Rahmen eines Praktikums erstellt und von mir überarbeitet bzw. verbessert.

3.1 Geometrisches Modell

Das Modell approximiert die Chromatinfiber durch eine flexible Polymerkette. Die Form der Nukleosomen wird durch steife ellipsoidförmige Scheiben beschrieben, wobei entsprechend der Kristallstruktur [6, 7] ein Durchmesser von 11 nm und eine Höhe von 5,5 nm angenommen wird (Abb. 3.1). Die Nukleosomenscheiben sind durch zwei zylinderförmige Segmente verbunden, die der Linker-DNS entsprechen, wie sie in der Kristallstruktur des Tetranukleosoms [8] beobachtet wurde. Histon H1 bzw. H5 wird durch einen Nukleosomen-Stamm repräsentiert, der den Abstand zwischen Nukleosom-Segment und dem Schwerpunkt des Nukleosom-Zylinders erhöht [9].

Die Geometrie des Modells entspricht dem "Zwei-Winkel-Modell" von Woodcock *et al.* [69] und van Holde und Zlatanova [68, 107]. Dabei ist die globale Struktur der Fiber durch die folgenden lokalen Parameter festgelegt: der DNS-Linkerlänge l , dem Öffnungswinkel α der Linker-DNS-Segmente und dem Torsionswinkel β zwischen aufeinander folgenden Nukleosomen (Abb. 3.2). Entsprechend der Kristallstruktur des Nukleosoms [6, 7] wird der Abstand der Anknüpfungspunkte der ein- und ausgehenden Linker-DNS-Segmente auf $d = 3,1$ nm festgesetzt. Dies erfolgt parallel zur superhelikalen Achse des Nukleosoms. Experimentelle Werte aus der Cryo-Elektronenmikroskopie für den Öffnungswinkel α liegen zwischen 25° - 65° [69] und zeigen eine starke Abhängigkeit von der Salzkonzentration. Mit der gleichen Methode bestimmten Bednar *et. al* [65] Öffnungswinkel von $56^\circ \pm 19^\circ$ bei 5 mM NaCl und

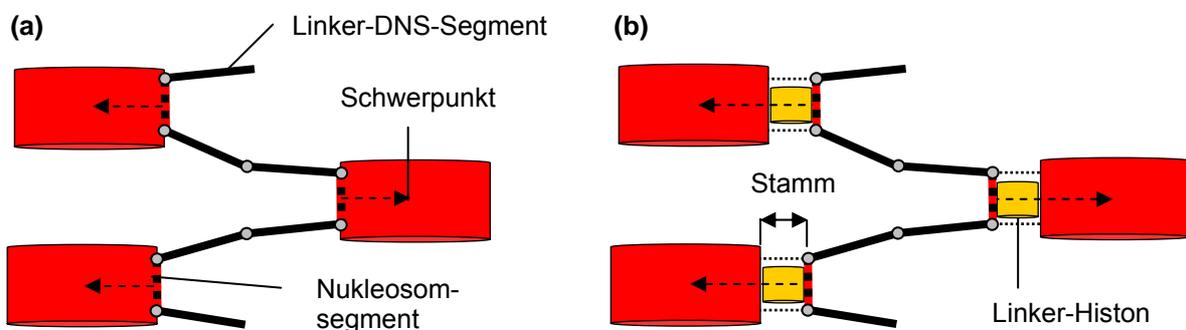


Abb. 3.1. Die Chromatinfiber wird durch eine flexible Polymerkette beschrieben, welche aus zwei Arten von Segmenten besteht, den Linker-DNS-Segmenten und den Nukleosom-Segmenten. Bei einem vorhandenen Stamm-Motiv wird die Distanz zwischen Nukleosom-Segment und Schwerpunkt des Nukleosom-Zylinders erhöht.

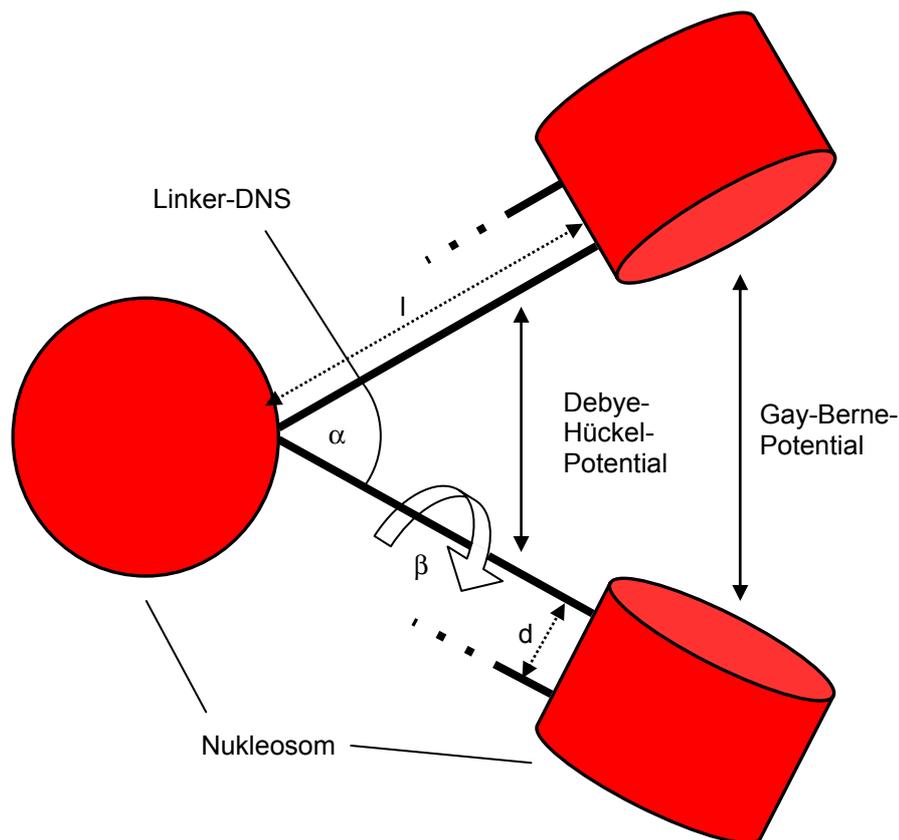


Abb. 3.2. Visualisierung der Geometrie basierend auf dem „Zwei-Winkel-Modell“ von Woodcock *et al.*. Eingehende und ausgehende Linker-DNS der Länge l bilden den Öffnungswinkel α und sind eine Distanz d entlang der Nukleosomachse versetzt. Aufeinanderfolgende Nukleosomen sind um den Torsionswinkel β gegeneinander verdreht. Die Wechselwirkung zwischen den Linker-DNS-Segmenten wird durch die Debye-Hückel-Approximation beschrieben, während die Nukleosomen über das Gay-Berne-Potential interagieren.

$39^\circ \pm 11^\circ$ bei 20 mM NaCl Salzlösung. Mit Hilfe der Elektronen-Cryotomographie und anschließender 3D-Rekonstruktion erhielt das gleiche Autorenteam Werte von ca. 85° bei 5 mM NaCl und $35^\circ \pm 9^\circ$ bei 80 mM NaCl [9], wobei Diskrepanzen zu den früheren Ergebnissen nicht diskutiert wurden. Aus der Kristallstruktur des Tetranukleosoms [8] lässt sich ein Öffnungswinkel im Bereich von $45^\circ - 65^\circ$ Grad bestimmen. Für die meisten Simulationen wurde der Öffnungswinkel derart initialisiert, dass sich für die Gleichgewichtsstrukturen ein Wert im mittleren Bereich um 45° für 100 mM NaCl ergab.

Die Länge der Linker-DNS und der Torsionswinkel sind durch die helikale Steigung der DNS, welche 10,5 bp [8] beträgt, direkt miteinander gekoppelt. Aus technischen Gründen und zur genaueren Analyse ihrer Abhängigkeiten, sind beide Parameter in den Simulationen unabhängig voneinander wählbar.

3.2 Diskretisierung

Die Chromatinfiber wird durch eine Polymerkette (Abb. 3.3) approximiert. Die geometrische Lage der einzelnen Segmente wird durch Ortsvektoren \vec{r}_i festgelegt und ihre Orientierung im Raum durch drei orthogonale Einheitsvektoren $(\vec{f}_i, \vec{v}_i, \vec{u}_i)$ mit $\vec{v}_i := \vec{u}_i \times \vec{f}_i$ beschrieben. Der Segmentvektor \vec{b}_i des i-ten Segments ist definiert als $b_i = |\vec{r}_{i+1} - \vec{r}_i|$, \vec{u}_i ist der normierte Segmentvektor $\frac{\vec{b}_i}{|\vec{b}_i|}$, wobei \vec{f}_i senkrecht auf \vec{u}_i steht.

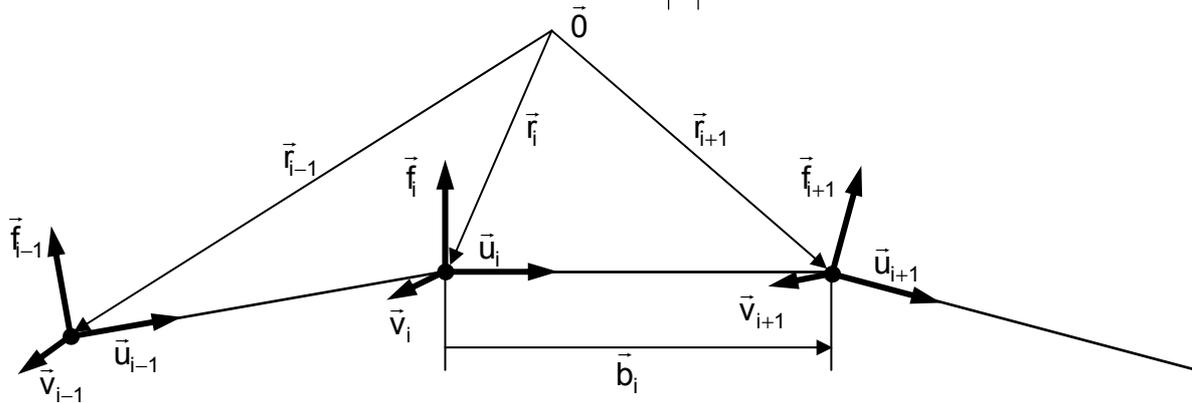


Abb. 3.3. Kettengeometrie und lokale Koordinatensysteme $(\vec{f}_i, \vec{v}_i, \vec{u}_i)$, welche die relative Orientierung der Segmente definieren.

Die Winkel α_i , β_i und γ_i sind die Eulerwinkel der Transformation des lokalen Koordinatensystems $(\vec{f}_i, \vec{v}_i, \vec{u}_i)$ in das Koordinatensystem $(\vec{f}_{i+1}, \vec{v}_{i+1}, \vec{u}_{i+1})$. Definiert α_i die erste Eulerrotation um den normierte Segmentvektor \vec{u}_i , dann beschreibt die Summe $\alpha_i + \gamma_i$ den Torsionswinkel zwischen Segment i und $i+1$ und β_i den Biegewinkel zwischen diesen Segmenten (Fig. 3.4).

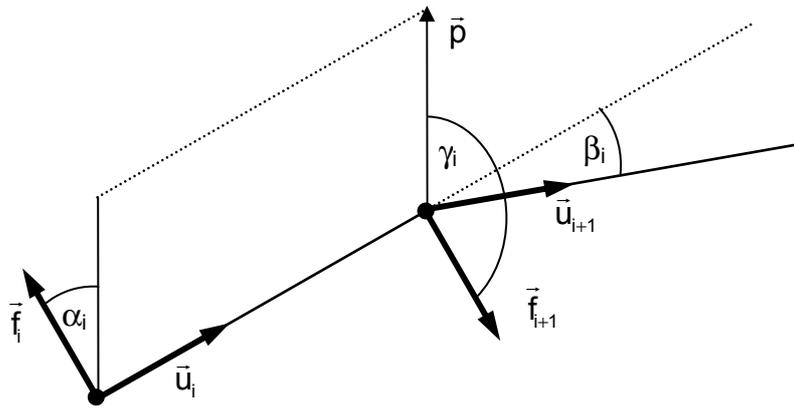


Abb. 3.4. Definition des Torsionswinkels $\tau_i = \alpha_i + \gamma_i$. Der Vektor \vec{p} steht senkrecht auf den Segmentvektoren \vec{u}_i und \vec{u}_{i+1} .

Für die Lage aufeinander folgender Segmente im thermischen Gleichgewicht gibt es zwei Möglichkeiten: Entweder sie bilden eine gerade Linie oder sie besitzen eine intrinsische Krümmung mit einem Winkel $\theta_i \neq 0^\circ$ zwischen den Segmenten. Diese wird durch den Biegevektor \vec{B}_i definiert, der für das i-te Segment die Biegung des i+1-ten Segments im thermischen Gleichgewicht beschreibt (Abb. 3.5). Er ist im lokalen Koordinatensystem des i-ten Segments definiert und besitzt die Polarkoordinaten (θ_i, ϕ_i) :

$$\vec{B}_i := \vec{f}_i \sin \theta_i \sin \phi_i + \vec{v}_i \sin \theta_i \cos \phi_i + \vec{u}_i \cos \theta_i \tag{3.1}$$

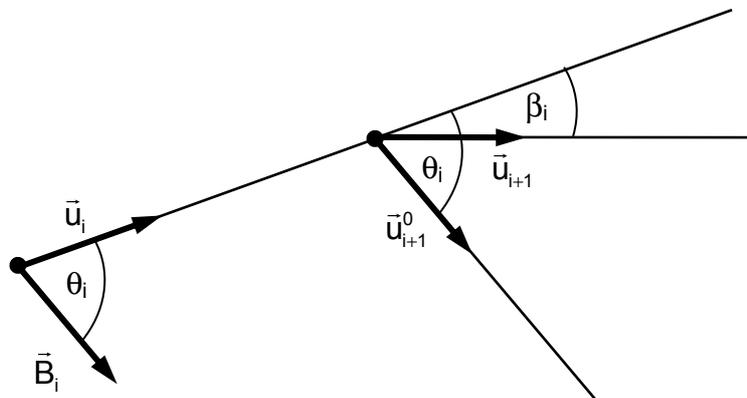


Abb. 3.5. Definition des Biegevektors, welcher die Biegung des i+1-ten Segments für das i-te Segment im thermodynamischen Gleichgewicht beschreibt. \vec{u}_{i+1}^0 ist der Segmentvektor im Gleichgewicht.

Bilden aufeinander folgende Segmente im thermischen Gleichgewicht eine Linie, so gilt für die Polarwinkel $\theta_i = 0^\circ$ und $\phi_i = 0^\circ$. Folglich stimmt der Biegevektor \vec{B}_i mit dem Segmentvektor \vec{u}_i überein, d.h. \vec{B}_i und \vec{u}_{i+1} sind kollinear.

3.2.1 Diskretisierung der DNS

Die Doppelhelix der Linker-DNS wird durch Verbindungssegmente zwischen den Nukleosom-Segmenten repräsentiert. Dabei wird die Segmentlänge so gewählt, dass sie deutlich kleiner als die Persistenzlänge der DNS von 50 nm ist. Die einzelnen Segmente beschreiben somit einen Teil der Linker-DNS, der als geradlinig angenommen werden kann.

3.2.2 Diskretisierung der Nukleosomen

Die Lage und Orientierung der Nukleosomen sind durch den allgemeinen Ortsvektor des Nukleosom-Kettensegments sowie dessen lokalem Koordinatensystem eindeutig definiert (Abb. 3.6). Der normierte Segmentvektor \vec{u}_i gibt die Richtung der superhelikalen Achse des i -ten Nukleosoms an. Der Vektor \vec{v}_i des lokalen Koordinatensystems weist in die Richtung des Schwerpunkts. Mit dem Versatz d der Anknüpfungspunkte der Linker-DNS entlang der superhelikalen Achse und dem Radius R_{Nuk} ergibt sich der Schwerpunkt \vec{S}_i des Nukleosoms zu:

$$\vec{S}_i = \vec{r}_i + \frac{d}{2} \vec{u}_i + R_{\text{Nuk}} \vec{v}_i. \quad (3.2)$$

Aus Experimenten [9, 68, 81, 136] ist bekannt, dass ein Teil der Linker-DNS zusammen mit dem Linker-Histon H1 bzw. H5 eine Einheit bildet, den Nukleosomenstamm. Um diesen in das Modell zu integrieren, lässt sich der Abstand zwischen

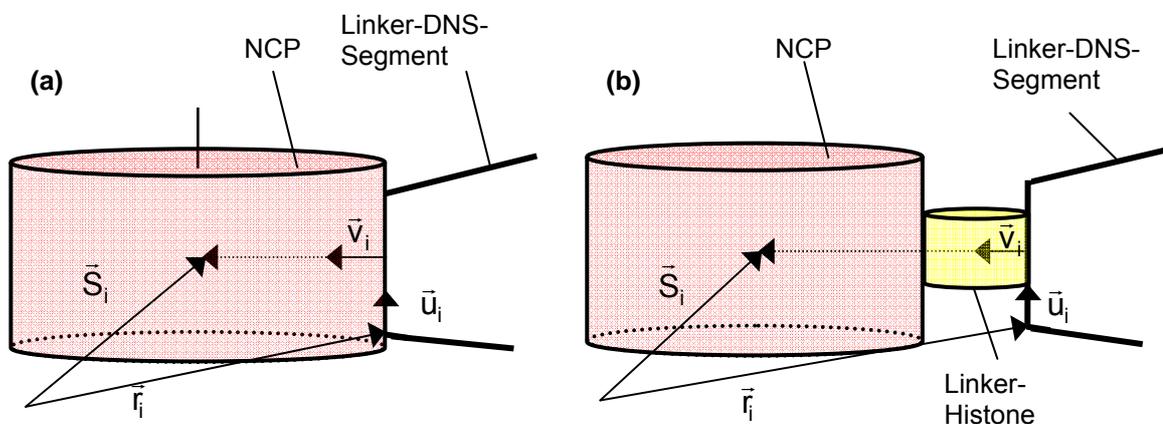


Abb. 3.6. Veranschaulichung der Geometrie des Nukleosoms sowie der Berechnung des Schwerpunkts.

dem Schwerpunkt des Nukleosoms und dem Nukleosom-Segment von 5,5 nm auf 8 nm erhöhen (Abb. 3.7). Bei der Berechnung des Schwerpunkts (3.2) muss in diesem Fall R_{Nuk} durch $R_{\text{Eff}} = R_{\text{Nuk}} + 2,5 \text{ nm}$ ersetzt werden. Über die Wechselwirkung zwischen Linker-Histonen mit Linker-DNS und Nukleosomen ist bis zum heutigen Zeitpunkt kaum etwas bekannt, so dass diese nicht im Modell berücksichtigt wird.

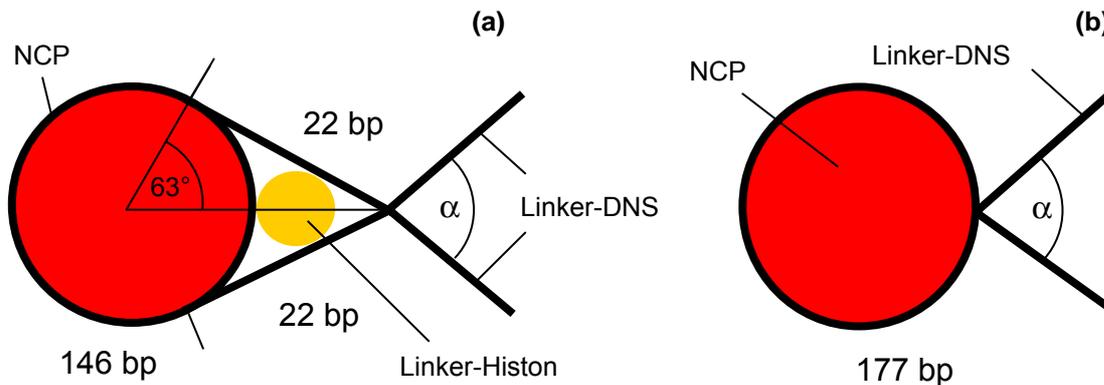


Abb. 3.7. Berechnung der gebundenen DNS für Simulationen mit (a) und ohne (b) Stamm. Bei Simulationen mit Stamm ergibt sich die gebundene DNS als Summe der 146 am NCP gebundenen Basenpaare und der vom Linker Histon gebundenen DNS von $2 \times 22 \text{ bp}$. Der Winkel von 63° berechnet sich unter Berücksichtigung der Windungszahl aus $(2-1,65) \cdot 360^\circ/2 = 63^\circ$. Bei Simulationen ohne Stamm wird im Modell von zwei ganzen Windungen der DNS um das NCP ausgegangen, so dass 177 bp am NCP gebunden sind.

3.2.3 Linkerlänge und Repeatlänge

Die Repeatlänge setzt sich zusammen aus der Länge der am Nukleosom gebundenen DNS und der Länge der Linker-DNS zum nächsten Nukleosom. Aufgrund der Röntgen-Kristallstrukturen von Nukleosomen [6, 7] ist bekannt, dass 146 bp DNS in 1,65 Windungen um das NCP gewunden sind. Einem Nukleosom ohne Stamm entsprechen im Modell folglich zwei volle Windungen DNS mit der Gesamtlänge von 177 bp (Abb. 3.7). Aus Restriktionsexperimenten ist bekannt, dass Linker-Histon H1 bzw. H5 mindestens 10 bp auf beiden Seiten bindet [16, 18]. Nimmt man eine gerade Verbindung vom Austrittspunkt der Linker-DNS am Nukleosom zum ca. 8 nm weit entfernten Endpunkt des Stamms an [9], ergibt sich für die Linker-DNS zwischen Nukleosom und Nukleos-Stamm aus dem Kosinussatz eine Länge von 22 bp. Insgesamt beträgt die am Chromosom gebundene DNS also $146 \text{ bp} + 2 \times 22 \text{ bp} = 190 \text{ bp}$. Für Chromatin aus Rattenleberzellen (Repeatlänge 200 bp) ergibt sich somit im Modell eine freie Linkerlänge von 10 bp, falls ein Stamm vorhanden ist, andernfalls 23 bp. Bei Zellen mit kurzen Repeatlängen, z.B. Cos-7-Zellen (Tabelle 1.1), ist die

Präsenz eines Stamms unwahrscheinlich, da dies zu Linkerlängen von 0 bp führen würde. Bei mittleren und langen Repeatlängen ist typischerweise ein Stamm vorhanden, denn das Linker-Histon besitzt eine stabilisierende Wirkung und führt zu einer höheren Kompaktierung.

Neuere Kristallstrukturen [6, 8] zeigen, dass auch Nukleosomen existieren, die 147 bp DNS in 1,67 Windungen um das NCP aufweisen. Um die Vergleichbarkeit mit älteren Daten zu gewährleisten wird in dieser Arbeit von 146 bp und 1,65 Windungen ausgegangen. Nur bei dem Projekt zur Äquilibration der geometrischen Kristallstruktur (vgl. 5.3) werden zusätzlich die aktuelleren Werte der Tetranukleosom-Kristallstruktur [8] von 147 bp und 1,67 Windungen verwendet

3.3 Monte-Carlo-Schritte

Die für die Simulationen gewählten Monte-Carlo-Schritte sollen in möglichst kurzer Zeit möglichst viele unkorrelierte Konformationen generieren. Deshalb werden zwei unterschiedliche MC-Schritte verwendet, die sich bereits in anderen Projekten als effizient erwiesen hatten [137]: ein Pivot- und ein Rotations-Schritt.

Bei dem Rotations-Schritt (Abb. 3.8a) wird zunächst eine beliebige Achse durch einen Endpunkt eines Kettensegments gewählt. Anschließend wird der kürzere Teil der Kette um einen zufällig, aus einem Intervall $[-\delta, +\delta]$, gewählten Winkel um diese Achse gedreht. Bereits für Gittermodelle wurde die Effektivität dieses Schritts gezeigt [138] und später auf kontinuierliche Systeme verallgemeinert [139]. Dabei erwies sich ein Wert für δ als günstig, bei dem die Akzeptanzrate im Bereich von 30 % liegt.

Bei dem Pivot-Schritt (Abb. 3.8b) wird eine Rotationsachse durch den Anfangspunkt eines beliebigen Segments und den Endpunkt eines anderen Segments gelegt. Danach erfolgt eine Rotation der verbindenden Segmente um diese Achse mit einem zufällig aus dem Intervall $[-\phi, +\phi]$ gewählten Winkel. Falls das erste oder letzte Segment der Kette ausgewählt wird, erfolgt eine zufällige Drehung des jeweiligen Segments um eine beliebige Achse, die durch das Ende des ersten Segments bzw. den Anfang des letzten Segments geht [140]. Seinen Ursprung hat dieser Pivot-Schritt in der Verdier-Stockmeyer-Methode für Gitterpolymere [141] und wurde von Baumgärt-

ner und Binder auf Polymersysteme erweitert [142]. Es wurde gezeigt, dass eine günstige Wahl von ϕ einer Akzeptanzrate im Bereich von 50 % entspricht.

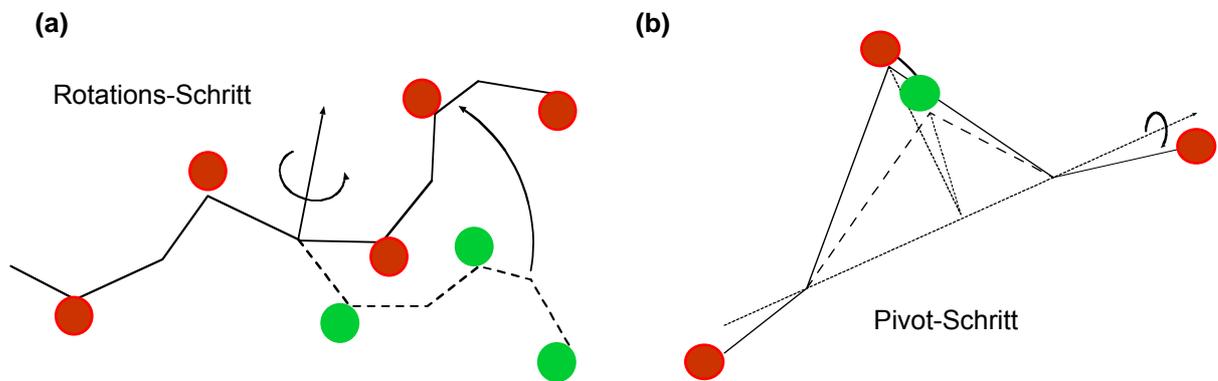


Abb. 3.8. Skizze eines Pivot- und eines Rotations-Schritts [3].

3.4 Elastische und elektrostatische Wechselwirkungen

3.4.1 Elastische Wechselwirkungen

Die elastischen Wechselwirkungen zwischen den Linker-DNS-Segmenten sowie zwischen Linker-DNS- und Nukleosom-Segment werden als harmonisch angenommen. Die Stärke der Wechselwirkung hängt von dem Gleichgewichtswert der Segmentlänge b_i^0 und dem entsprechenden Parameter α_Y^X ab, wobei X für den Typ der Wechselwirkung und Y für die beteiligten Segmente steht. Die Eulerwinkel α_i , β_i und γ_i sowie der Segmentvektor \vec{b}_i und der Biegevektor \vec{B}_i sind wie in Abschnitt 3.2 definiert.

Für die Streckenergie des i-ten Segments gilt

$$E_i^{\text{Streck}} = \frac{\alpha_Y^{\text{Streck}}}{b_i^0} \cdot (b_i - b_i^0)^2. \quad (3.2)$$

Dabei ist Y die Linker-DNS/Linker-DNS bzw. Nukleosom/Linker-DNS und b_i^0 der Gleichgewichtswert der Segmentlänge.

Die Biegeenergie ohne intrinsische Krümmung wird beschrieben durch

$$E_i^{\text{Biege}} = \frac{\alpha_Y^{\text{Biege}}}{b_i^0} \cdot \beta_i^2. \quad (3.3)$$

Die Biegeenergie mit intrinsischer Krümmung wird festgelegt als

$$E_i^{\text{Biege}} = \frac{\alpha_Y^{\text{Biege}}}{b_i^0} \cdot \theta_i^2, \quad (3.4)$$

mit $\cos \theta_i = \vec{B}_i \cdot \vec{u}_{i+1}$.

Die Torsionsenergie wird berechnet durch

$$E_i^{\text{Torsion}} = \frac{\alpha_Y^{\text{Torsion}}}{b_i^0} \cdot (\alpha_i + \gamma_i - \tau_i)^2, \quad (3.5)$$

mit τ_i : intrinsischer Torsionswinkel.

3.4.2 Elektrostatische Wechselwirkung der DNS

Aufgrund der negativen Ladung der Phosphatgruppen im Doppelstrang der Linker-DNS stoßen sich diese elektrostatisch ab. Befindet sich die Fiber in einer wässrigen Salzlösung, so muss berücksichtigt werden, dass sich Kationen an die Linker-DNS anlagern und durch Abschirmung die Abstoßung schwächen. Diese Wechselwirkung wird durch die Poisson-Boltzmann-Gleichung beschrieben, welche sich nur für einige Spezialfälle, die hier nicht anwendbar sind, analytisch lösen lässt. Eine numerische Lösung ist aufgrund ihrer Komplexität bisher nicht möglich [143]. Für kleine elektrostatische Potentiale $\varphi \ll k_B T/e$, wobei e die Elementarladung bezeichnet, erhält man durch Linearisierung der Poisson-Boltzmann-Gleichung die Debye-Hückel-Näherung. Diese ist numerisch lösbar und wird deshalb in den Simulationen verwendet. Der im folgenden verwendete Ansatz basiert auf der Arbeit von Konstantin Klenin [144] und hat sich bereits in Simulationen von superhelikaler DNS und kleineren Chromatin-Modellen bewährt [145-147].

Gemäß der Debye-Hückel-Näherung gilt für das Potential einer Ladung q im Abstand \vec{r} [148]:

$$\Phi = \frac{q}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r} \cdot \frac{e^{-\kappa|\vec{r}|}}{|\vec{r}|}. \quad (3.6)$$

ε_0 bezeichnet die elektrische Feldkonstante und ε die Dielektrizitätskonstante des Lösungsmittels. κ ist die inverse Debyelänge mit $\kappa^2 = \frac{2e^2 N_A I}{k_B T \varepsilon_0 \varepsilon_r}$. Dabei bezeichnet I die Ionenstärke des Lösungsmittels, e die Elementarladung, N_A die Avogadrozahl und ε_r die Dielektrizitätskonstante von Wasser.

Zur Bestimmung der elektrostatischen Energie zwischen zwei gleichgeladenen Liniensegmenten i und j mit den Längen b_i und b_j wird Gleichung (3.6) entlang der beiden Liniensegmente integriert:

$$E_{ij}^{\text{Estat}} = \alpha^{\text{Estat}} k_B T \int_0^{b_i} d\lambda_i \int_0^{b_j} d\lambda_j \frac{e^{-\kappa|\vec{r}_{ij}|}}{|\vec{r}_{ij}|}, \quad \text{mit } \alpha^{\text{Estat}} = \frac{v^*}{4\pi \varepsilon_0 \varepsilon_r}. \quad (3.7)$$

Dabei parametrisieren λ_i und λ_j das i -te bzw. j -te Segment und v^* die renormalisierte effektive Ladungsdichte. Der Vektor \vec{r}_{ij} gibt den Abstand zwischen dem Punkt auf Segment i mit dem Parameter λ_i und dem Punkt auf Segment j mit dem Parameter λ_j an.

$$\vec{r}_{ij}(\lambda_i, \lambda_j, \rho_{ij}, \gamma_{ij}, \gamma_{ji}, \sigma_{ij}) = \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ b_0 \rho_{ij} \end{pmatrix} + \lambda_i \begin{pmatrix} \sqrt{1 - \gamma_{ji}^2} \\ 0 \\ -\gamma_{ji} \end{pmatrix} + \lambda_j \begin{pmatrix} \frac{\sqrt{1 - \gamma_{ij}^2} \sigma_{ij}}{\sqrt{1 - \gamma_{ij}^2} \sqrt{1 - \sigma_{ij}^2}} \\ \gamma_{ij} \end{pmatrix}. \quad (3.8)$$

Er hängt explizit von vier weiteren dimensionslosen Parametern (ρ_{ij} , γ_{ij} , γ_{ji} , σ_{ij}) ab, welche die relative Orientierung der beiden Segmente im Raum beschreiben.

Letztere können aus den Ortsvektoren \vec{r}_i, \vec{r}_j und den normierten Richtungsvektoren \vec{u}_i, \vec{u}_j der Segmente gewonnen werden:

ρ_{ij} beschreibt den Abstand der Mittelpunkte zwischen Segment i und j :

$$\rho_{ij} = |\vec{\rho}_{ij}| \quad \text{mit} \quad \vec{\rho}_{ij} = \frac{1}{b_0} (\vec{r}_j^* - \vec{r}_i^*), \quad (3.9)$$

wobei \vec{r}_i^* und \vec{r}_j^* die Mittelpunkte des i -ten und j -ten Segments definieren:

$$\vec{r}_i^* = \vec{r}_i + \frac{1}{2} b_i \vec{u}_i. \quad (3.10.)$$

γ_{ij} und γ_{ji} sind die Winkel zwischen dem Verbindungsvektor der Mittelpunkte $\vec{\rho}_{ij}$ und dem i-ten bzw. j-ten Segment:

$$\gamma_{ij} = \vec{u}_i \frac{\vec{\rho}_{ij}}{|\rho_{ij}|}, \quad \gamma_{ji} = -\vec{u}_j \frac{\vec{\rho}_{ij}}{|\rho_{ij}|}. \quad (3.11)$$

σ_{ij} beschreibt den Torsionswinkel der Segmente i und j:

$$\sigma_{ij} = \frac{(\vec{u}_i \times \vec{\rho}_{ij}) \cdot (\vec{u}_j \times \vec{\rho}_{ij})}{|(\vec{u}_i \times \vec{\rho}_{ij})| |(\vec{u}_j \times \vec{\rho}_{ij})|}. \quad (3.12)$$

Um die fixierte Schicht der angelagerten Gegenionen an die Phosphatgruppen der DNS korrekt zu behandeln [149], muss die lineare Ladungsdichte v der DNS renormiert werden. Dieser Ansatz führt zu einer reduzierten effektiven Ladungsdichte v^+ für NaCl Konzentrationen zwischen 1 und 500 mM:

$$v^+ = 0,73 v_{\text{DNS}}, \quad \text{mit } v_{\text{DNS}} = -2 e / \Delta. \quad (3.13)$$

Δ entspricht dem Abstand zwischen zwei benachbarten Basenpaaren und beträgt 0.34 nm.

Nun muss die renormalisierte effektive Ladungsdichte v^* (3.7) bestimmt werden. Hierzu wird die bekannte Lösung der Debye-Hückel-Gleichung für eine gerade Linie mit der Ladung v^* mit die Lösung der Poisson-Boltzmann-Gleichung für Zylinder mit dem Radius der DNS und der reduzierten Ladungsdichte v^+ verglichen. v^* wird derart gewählt, dass die beiden Lösungen in der Region $\varphi \ll k_B T/e$ übereinstimmen [144].

Das Integral der Debye-Hückel-Näherung (3.7) zur Berechnung der elektrostatischen Energie muss für jedes Paar von DNS-Segmenten ausgewertet werden. Dies ist sehr zeitintensiv. Um die Rechenzeit zu reduzieren, wird vor dem Start der Simulation für eine große Anzahl der möglichen Segmentorientierungen eine Energietabelle vorausgerechnet. Diese Tabelle besteht aus einem vierdimensionalen Feld für die Parameter ρ , γ_1 , γ_2 , σ sowie der entsprechenden Energie $E(\rho, \gamma_1, \gamma_2, \sigma)$. Die Schrittweite der Parameter erhöht sich jeweils um einen festen Wert. Die Anzahl der Schritte wird für den jeweiligen Parameter so gewählt, dass der gegenseitige Abstand der

Segmente die Debye-Länge nicht überschreitet. Der Wertebereich von $\arccos \gamma_1$, $\arccos \gamma_2$ und $\arccos \sigma$ umfasst das Intervall $[-1, 1]$. Der minimale Abstand der Mittelpunktsegmente ρ_{Min} wird so gewählt, dass eine derartige Konformation aufgrund ihrer hohen elektrostatischen Energie ($E_{\text{Min}}^{\text{Estat}} > 10 k_B T$) während der Simulation praktisch nicht auftritt. ρ_{Max} wird derart festgelegt, dass Energien für größere Abstände als ρ_{Max} gegenüber den anderen in der Simulation auftretenden Energien vernachlässigt werden können ($E_{\text{Max}}^{\text{Estat}} < 0,01 k_B T$).

Während der Simulation werden die entsprechenden Werte für die elektrostatische Energie aus der vorher berechneten Tabelle entnommen und gegebenenfalls linear interpoliert.

3.4.3 Parametrisierung der Wechselwirkung

Tabelle 5.1 gibt einen Überblick über die verwendeten Parameter, welche im Wesentlichen auf experimentellen Ergebnissen beruhen [150, 151]. Der Biegemodul D_{Biege} ist die Energie, die benötigt wird, um ein Segment mit Einheitslänge eines Polymers um 1 rad zu biegen. Er ergibt sich aus dem Wert der Persistenzlänge der Biegung über den Zusammenhang $L_{p,\text{Biege}} = D_{\text{Biege}} / (k_B T)$. Für B-DNS wurde die Persistenzlänge $L_{p,\text{Biege}}$ in einer Vielzahl von Experimenten bestimmt [152], wobei sich typischerweise ein Wert von $L_{p,\text{Biege}} = 45\text{-}50$ nm [153] für mittlere Ionenstärken (10-100 mM NaCl / 0,1-10 μM Mg^{2+}) ergibt. Ein analoger Zusammenhang besteht zwischen der Persistenzlänge der Torsion und dem Torsionsmodul. Dieser gibt die Energie an, die benötigt wird, um ein Segment mit Einheitslänge um 1 rad zu drehen. Experimentelle Werte konvergieren gegen eine Persistenzlänge der Torsion $L_{p,\text{Torsion}} = 65$ nm, der auch in den Simulationen angenommen wird. Basierend auf den Messungen mit Laserpinzetten [154] nehmen wir für den Streckmodul der DNS einen Wert von 1100 pN an.

Bei der Berechnung des elektrostatischen Potentials wird typischer Weise ein Wert von 2,4 nm als Helixdurchmesser verwendet [144, 145, 155, 156], der auch in Experimenten, z.B. durch Lichtstreuung [146] oder Röntgenstreuung [147], bestätigt wurde.

Da keine experimentellen Werte für den Streckmodul und den Torsionsmodul von Nukleosomen bekannt sind, werden die Nukleosom-Segmente vereinfacht als steif angesehen und entsprechend hohe Werte für diese Parameter gewählt. Für den Torsionsmodul des Nukleosoms wird der fünffache Wert der DNS verwendet. Der Wert für die Streckelastizität des Nukleosoms entspricht dem Wert für die DNS. Analog zu Torsionsexperimenten [157, 158] ist im Modell die DNS an den Enden der Fiber fest eingespannt.

3.5 Nukleosomen-Wechselwirkung: Gay-Berne-Potential

Bis zum heutigen Zeitpunkt ist keine exakte theoretische Beschreibung der Wechselwirkung zwischen den Nukleosomen bekannt. Hauptproblem ist die große Anzahl positiver und negativer Ladungen im Nukleosom, die in komplexer Weise miteinander wechselwirken. Insbesondere besitzen Nukleosomen bewegliche positiv geladene Histon-Tails, welche bei physiologischer Salzkonzentration aus dem Histonkern herausragen [6] und die Kompaktierung der Chromatinfiber stark beeinflussen [42]. Da keine realistischen Potentiale aus der Theorie bekannt sind, verwenden die Simulationen phänomenologische Potentiale, die sowohl einen abstoßenden als auch einen anziehenden Beitrag zum Potential beinhalten. Durch einen Satz von variablen Parametern werden diese auf Basis experimenteller Ergebnisse kalibriert.

3.5.1 Gay-Berne-Potential

Ein Nukleosom hat eine Höhe von 5,5 nm und einen Durchmesser von 11 nm, so dass seine Form näherungsweise einem oblaten Ellipsoiden bzw. symmetrischen Zylinder entspricht. Um den Einfluss der Geometrie auf die Wechselwirkung zwischen den zylinderförmigen Nukleosomen zu berücksichtigen, wird in den Simulationen das Gay-Berne-Potential verwendet. Dabei handelt es sich um ein anisotropes Potential, welches die wechselwirkenden Teilchen als Ellipsoide beschreibt und sich bereits in einer Vielzahl von Simulationen zur Untersuchung von Flüssigkristallen bewährt hat.

Als Basis für das Gay-Berne-Potential dient das klassische Lennard-Jones-Potential, welches die Energie in Abhängigkeit des Abstands $|\vec{r}_{ij}|$ zweier Teilchen i und j beschreibt [159]:

$$E_{ij}^{LJ} = 4 \varepsilon \left[\left(\frac{\sigma}{|\vec{r}_{ij}|} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{|\vec{r}_{ij}|} \right)^6 \right]. \quad (3.14)$$

Dabei gibt ε die Tiefe des Potentials und σ den Nulldurchgang an. Im Falle eines Ellipsoids hängen sowohl die Potentialtiefe ε als auch die Potentialbreite σ von der Orientierung der Teilchen und dem Abstandsvektor \vec{r}_{ij} der Mittelpunkte ab. Um analytische Ausdrücke für ε und σ zu erhalten, verwendeten Berne und Pechukas [160] das Gaußsche Überlappungsmodell, bei dem sie die Überlappung zweier Rotations-Ellipsoide berechneten. Um bei Computersimulationen realistische Werte zu erhalten, wurde das Berne-Pechukas-Potential von Gay und Berne [161] nochmals modifiziert:

$$E_{ij}^{GB} = 4 \varepsilon(\vec{a}_i, \vec{a}_j) \left[\left(\frac{1}{|\vec{r}_{ij}| - \sigma + 1} \right)^{12} - \left(\frac{1}{|\vec{r}_{ij}| - \sigma + 1} \right)^6 \right], \quad (3.15)$$

$$\varepsilon(\vec{a}_i, \vec{a}_j) = \varepsilon_0 \varepsilon_1(\vec{a}_i, \vec{a}_j), \quad (3.16)$$

$$\varepsilon_1(\vec{a}_i, \vec{a}_j) = [1 - \chi^2 \cdot (\vec{a}_i \cdot \vec{a}_j)]^{-1/2}. \quad (3.17)$$

Dabei sind \vec{a}_i und \vec{a}_j die normierten Richtungsvektoren der beiden Hauptsymmetrieachsen des Rotations-Ellipsoids und χ parametrisiert die Anisotropie der abstoßenden Kraft. Indem das Potential verschoben statt skaliert wird, ist die Potentialbreite nun unabhängig von der Orientierung der Teilchen.

Da die Potentialtiefe in (3.15) nur von der Orientierung, nicht aber vom Abstand zwischen den Teilchen abhängt, ergibt sich für die laterale und longitudinale Orientierung die gleiche Potentialtiefe. Die Einführung eines zusätzlichen Terms ε_2 (vgl. 3.18) in die Potentialtiefe ε , welcher neben den Richtungsvektoren auch vom Abstandsvektor abhängt, korrigierte dieses unrealistische Verhalten. Weitere geringfügige Modifikationen, z.B. die Dimensionslosigkeit [162, 163], führen zu der in dieser Arbeit verwendeten Form:

$$E_{ij}^{\text{GB}}(\bar{\mathbf{a}}_i, \bar{\mathbf{a}}_j, \bar{\mathbf{r}}_{ij}^0) = 4 \varepsilon(\bar{\mathbf{a}}_i, \bar{\mathbf{a}}_j, \bar{\mathbf{r}}_{ij}^0) \left[\left(\frac{\sigma_0}{|\bar{\mathbf{r}}_{ij}^0| - \sigma(\bar{\mathbf{a}}_i, \bar{\mathbf{a}}_j, \bar{\mathbf{r}}_{ij}^0) + \sigma_0} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_0}{|\bar{\mathbf{r}}_{ij}^0| - \sigma(\bar{\mathbf{a}}_i, \bar{\mathbf{a}}_j, \bar{\mathbf{r}}_{ij}^0) + \sigma_0} \right)^6 \right] \quad (3.18)$$

$\bar{\mathbf{r}}_{ij}^0$ ist dabei der normierte Richtungsvektor des Abstands $\bar{\mathbf{r}}_{ij}$ der Mittelpunkte der Teilchen i und j . $\bar{\mathbf{a}}_i$ und $\bar{\mathbf{a}}_j$ sind die normierten Richtungsvektoren der beiden Hauptsymmetrieachsen des Rotations-Ellipsoids und σ_0 definiert den Nulldurchgang des Potentials bei lateraler Orientierung ($\bar{\mathbf{a}}_i \cdot \bar{\mathbf{r}}_{ij}^0 = \bar{\mathbf{a}}_j \cdot \bar{\mathbf{r}}_{ij}^0 = 0$).

In erster Näherung stimmt der Parameter σ mit dem Berührungspunkt der beiden Ellipsoide überein. Er gibt an, für welchen Abstand das Potential verschwindet und ist definiert als:

$$\sigma(\bar{\mathbf{a}}_i, \bar{\mathbf{a}}_j, \bar{\mathbf{r}}_{ij}^0) = \sigma_0 \left\{ 1 - \frac{\chi}{2} \left[\frac{(\bar{\mathbf{a}}_i \cdot \bar{\mathbf{r}}_{ij}^0 + \bar{\mathbf{a}}_j \cdot \bar{\mathbf{r}}_{ij}^0)^2}{1 + \chi \cdot (\bar{\mathbf{a}}_i \cdot \bar{\mathbf{a}}_j)} + \frac{(\bar{\mathbf{a}}_i \cdot \bar{\mathbf{r}}_{ij}^0 - \bar{\mathbf{a}}_j \cdot \bar{\mathbf{r}}_{ij}^0)^2}{1 - \chi \cdot (\bar{\mathbf{a}}_i \cdot \bar{\mathbf{a}}_j)} \right] \right\}^{-1/2}, \quad (3.19)$$

mit $\chi = \frac{\kappa^2 - 1}{\kappa^2 + 1}$ und $\kappa = \frac{\sigma_{\text{long}}}{\sigma_{\text{lat}}}$. Parameter χ kontrolliert die Anisotropie der abstoßenden

Kraft. Der Parameter σ_{long} ist die Länge des Teilchens entlang der Hauptsymmetrieachse des Rotations-Ellipsoids und σ_{lat} der Durchmesser des Teilchens. Der Parameter κ ist demnach ein Maß für das Verhältnis der Länge zur Breite des Teilchens. Für stabförmige Teilchen bzw. prolate Ellipsoide gilt $\kappa > 0$, für scheibenförmige Teilchen bzw. oblate Ellipsoide, wie im Fall der Nukleosomen, gilt $\kappa < 0$.

Für die Stärke der Wechselwirkung gilt:

$$\varepsilon(\bar{\mathbf{a}}_i, \bar{\mathbf{a}}_j, \bar{\mathbf{r}}_{ij}^0) = \varepsilon_0 \varepsilon_1^\nu(\bar{\mathbf{a}}_i, \bar{\mathbf{a}}_j) \varepsilon_2^\mu(\bar{\mathbf{a}}_i, \bar{\mathbf{a}}_j, \bar{\mathbf{r}}_{ij}^0), \quad (3.20)$$

$$\varepsilon_1(\bar{\mathbf{a}}_i, \bar{\mathbf{a}}_j) = [1 - \chi^2 \cdot (\bar{\mathbf{a}}_i \cdot \bar{\mathbf{a}}_j)]^{1/2}, \quad (3.21)$$

$$\varepsilon_2(\bar{\mathbf{a}}_i, \bar{\mathbf{a}}_j, \bar{\mathbf{r}}_{ij}^0) = 1 - \frac{\chi'}{2} \left[\frac{(\bar{\mathbf{a}}_i \cdot \bar{\mathbf{r}}_{ij}^0 + \bar{\mathbf{a}}_j \cdot \bar{\mathbf{r}}_{ij}^0)^2}{1 + \chi' \cdot (\bar{\mathbf{a}}_i \cdot \bar{\mathbf{a}}_j)} + \frac{(\bar{\mathbf{a}}_i \cdot \bar{\mathbf{r}}_{ij}^0 - \bar{\mathbf{a}}_j \cdot \bar{\mathbf{r}}_{ij}^0)^2}{1 - \chi' \cdot (\bar{\mathbf{a}}_i \cdot \bar{\mathbf{a}}_j)} \right]. \quad (3.22)$$

Dabei ist $\chi' = \frac{\kappa'^{1/\mu} - 1}{\kappa'^{1/\mu} + 1}$ und $\kappa' = \frac{\varepsilon_{\text{lat}}}{\varepsilon_{\text{long}}}$, wobei ε_{lat} das Minimum des Potentials für ein lateral platziertes Paar von Nukleosomen ($\vec{a}_i \cdot \vec{r}_{ij}^o = \vec{a}_j \cdot \vec{r}_{ij}^o = 0$) und $\varepsilon_{\text{long}}$ das Minimum des Potentials für longitudinal ausgerichtete Nukleosomen ($\vec{a}_i \cdot \vec{r}_{ij}^o = \vec{a}_j \cdot \vec{r}_{ij}^o = 1$) ist. Die Anisotropie der attraktiven Kräfte wird sowohl von χ als auch von χ' festgelegt. Der Term $\varepsilon_1(\vec{a}_i, \vec{a}_j)$, welcher den Parameter χ beinhaltet, charakterisiert den Unterschied der Potentialtiefe in Abhängigkeit von der relativen Ausrichtung der Teilchen.

Der zusätzliche Term $\varepsilon_2(\vec{a}_i, \vec{a}_j, \vec{r}_{ij}^o)$ realisiert die bereits erwähnte Abhängigkeit der Potentialtiefe vom Abstand der beiden Teilchen. Stimmt die relative Orientierung zweier Teilchen überein, z.B. ($\vec{a}_i \cdot \vec{a}_j = 1$), so kann das Potential in Abhängigkeit vom Abstandsvektor und dem Anisotropieparameter χ' verschiedene Werte annehmen.

Die Exponenten μ und ν werden entsprechend dem verwendeten Molekül bzw. Modell angepasst. Basierend auf dem Vergleich mit dem Potential eines stabförmigen Teilchens, welches aus vier Lennard-Jones-Zentren bestand, schlugen Gay und Berne [161] die Werte $\mu = 2$ und $\nu = 1$ vor. Diese Werte haben sich bereits in einer Vielzahl von Simulationen von Flüssigkristallen bewährt und werden auch in dieser Arbeit verwendet. Andere Möglichkeiten, z.B. für den Fall von oblaten Ellipsoiden, werden z.B. bei Luckhurst *et. al.* [164] diskutiert. Schließlich sei noch bemerkt, dass man für die Wahl der Anisotropieparameter $\kappa = 1$ und $\kappa' = 1$ wieder das bekannte Lennard-Jones-Potential (3.14) mit $\sigma = \sigma_0$ und $\varepsilon = \varepsilon_0$ erhält.

3.5.2 Parametrisierung des Gay-Berne-Potentials

Die Parameter des Gay-Berne-Potentials werden aus den Eigenschaften von Flüssigkristallen und deren numerischer Simulation gewonnen. Leforestier und Livolante beobachteten mittels Polarisierungs- und Gefrierbruchelektronenmikroskopie [165] sowie Röntgenbeugungsanalyse [166], dass NCP's in Abhängigkeit von der monovalenten Salzkonzentration scheinbenförmige (diskotische) flüssige Kristallstrukturen bilden. Insbesondere befinden sie sich bei hohen Salzkonzentrationen (> 50 mM) in kolumnarer hexagonaler Phase, bei der sich die NCP's in Säulen übereinander anordnen und diese Säulen selbst eine sechseckige Anordnung bilden (Abb. 3.9). Aus

den Abständen der einzelnen NCP's innerhalb einer Säule ($7,16 \pm 0,65$) nm sowie dem Säulenabstand ($11,55 \pm 1$) nm [165] lassen sich σ_0 und die Anisotropie χ schätzen. Hierzu wird angenommen, dass die gemessenen Abstände den Minima des Gay-Berne-Potentials (3.18) für longitudinale und laterale Orientierung entsprechen:

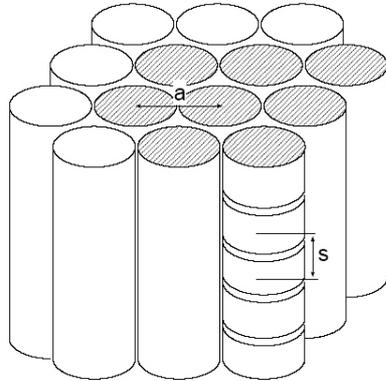


Abb. 3.9. Schematische Darstellung der kolumnalen hexagonalen Phase von Nukleosomen. Aus den Abständen s und a für die longitudinale und laterale Orientierung lassen sich Parameter für das Gay-Berne-Potential abschätzen.

Das Minimum von (3.18) liegt beim Abstand $r_{\text{Min}} = (\sqrt[6]{2} - 1)\sigma_0 + \sigma(\bar{a}_i, \bar{a}_j, \bar{r}_{ij}^0)$, so dass sich mit (3.19) für den lateralen bzw. longitudinalen Fall

$$r_{\text{Min}}^{\text{lat}} = \sqrt[6]{2} \sigma_0, \quad (3.23)$$

$$r_{\text{Min}}^{\text{long}} = \sigma_0 \left[\sqrt[6]{2} - 1 + \left(1 - 2 \frac{\chi}{1 + \chi} \right)^{-1/2} \right] \quad (3.24)$$

ergibt.

Setzt man den experimentellen Wert $r_{\text{Min}}^{\text{lat}} = 11,55$ nm in Gleichung (3.23) ein, so erhält man $\sigma_0 = 10,3$ nm. Verwendet man diesen sowie den experimentellen Wert $r_{\text{Min}}^{\text{Long}} = 7,16$ nm in Gleichung (3.24), dann folgt für den Wert der Anisotropie

$\chi = -0,506$ mit $\kappa = 0,573$.

Um die Anisotropie der Potentialtiefe χ' abzuschätzen, wird ein zu Gay und Berne analoger Ansatz gewählt. Hierzu wird die scheibenförmige Struktur zweier Nukleosomen durch jeweils 6 Lennard-Jones-Kugeln vom Radius 5,5 nm angenähert und das Verhältnis κ' der minimalen Potentialtiefen bei lateraler und longitudinaler Orientierung gebildet. Dabei erhält man $\kappa' = \frac{\epsilon_{\text{lat}}}{\epsilon_{\text{long}}} = \frac{1}{5}$ und entsprechend $\chi' = -0,383$, wobei

sich der Einfluss der radialen Anordnung der Kugeln vernachlässigen lässt. Dieser

Wert spiegelt die stärkere longitudinale Anziehung der Nukleosomen wider. Der inverse Wert ($\kappa' = 5$) wird häufig in Studien bezüglich prolater Gay-Berne-Teilchen angewendet.

Um die absolute Potentialtiefe zu bestimmen, werden Ergebnisse aus den Molekulardynamik Simulationen von 256 Gay-Berne-Teilchen von Emerson *et. al* [167] verwendet. Dabei zeigte sich unter anderem, dass scheibenförmige Ellipsoide einer skalierten Dichte von $\rho^* = \frac{N\sigma_0^3}{V} = 2,5$ bei einer skalierten Temperatur $T^* = \frac{k_B T}{\varepsilon_0} = 4$ einen

Phasenübergang von der kolumnaren hexagonalen Phase in die nematischen Phase vollziehen. Die in dieser Arbeit verwendeten Parameter ($\nu = 1, \mu = 2, \kappa' = 1/5, \kappa = 0,345$) stimmen mit den Parametern von Emerson *et al.* [167] überein. Aus diesem Grund ist eine ähnliche Potentialtiefe von $\varepsilon_0 = \frac{k_B T}{T^*} = \frac{1}{4} k_B T$ zu erwarten. Abbildung

3.10 zeigt den typischen Verlauf der in diesen Simulationen verwendeten Gay-Berne-Potentials für die beiden Extremfälle der longitudinalen und lateralen Orientierung der Nukleosomen. Es ist deutlich zu erkennen, dass der Verlauf des Potentials im Gegensatz zum Lennard-Jones-Potential von der Orientierung der Nukleosomen abhängt.

Aufgrund der Tendenz zur Aggregation konnten bisher keine Flüssigkristalle aus Nukleosomen beobachtet werden, die auch das Linker-Histon H1 enthalten.

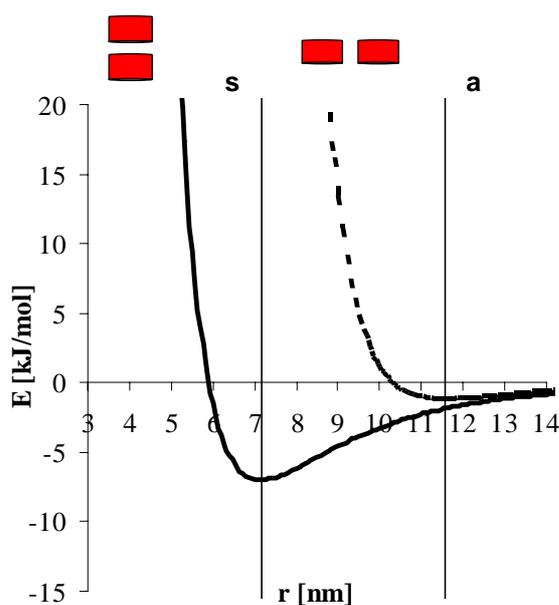


Abb. 3.10 Verlauf des Gay-Berne-Potentials mit Parametern, wie sie in unseren Simulationen verwendet werden. Es sind die beiden Spezialfälle der lateralen und longitudinalen Orientierung zweier Nukleosomen dargestellt. Die Positionen der Minima a und s entsprechen den Abständen in der kolumnaren hexagonalen Phase der Nukleosomen. Es wird deutlich, dass der Potentialverlauf von der Orientierung der ellipsoidförmigen Nukleosomen abhängt.

— longitudinale Orientierung
 - - - laterale Orientierung

3.6 Streckpotential

Nachdem in den Abschnitten 3.1 - 3.5 das Modell von Wedemann beschrieben wurde, behandeln die folgenden Abschnitte die von mir hinzugefügten Erweiterungen. Um die Streckung von Chromatinfibern zu simulieren, wird eine konstante Kraft in Richtung der x-Achse in das Modell integriert. Dies erfolgt durch die Addition einer Streckenergie zur Gesamtenergie der einzelnen Fibern während der MC-Schritte. Diese ist proportional zur x-Komponente des gegenseitigen Abstands des ersten und des letzten Nukleosoms der Fiber:

$$E_{\text{Streck}} = -M \left| \vec{r}_{1,x} - \vec{r}_{N,x} \right|, \quad (3.25)$$

wobei M der Kraftmodul und $\vec{r}_{i,x}$ die x-Komponente des Ortsvektors des i-ten Nukleosoms ist.

3.7 Nukleosomen-Wechselwirkung: Tails-Potential

3.7.1 Tails-Potential

Simulationen, welche die Nukleosom-Nukleosom-Wechselwirkung durch das Gay-Berne-Potential [127, 168, 169] beschreiben, führen bei physiologischen Salzkonzentrationen zu realistischen Ergebnissen. Um allerdings die Kompaktierung und Entfaltung der Chromatinfiber realistisch simulieren zu können, muss auch die Nukleosom-Nukleosom-Wechselwirkung eine Abhängigkeit von der Salzkonzentration beinhalten. Hierzu entwickelte und implementierte ich auf der Basis eines Potentials von Mangenot *et al.* [42] ein neues Potential, das die salzabhängige Extension der Histon-Tails mit dem Gay-Berne-Potential verbindet.

Experimente zeigen, dass die Konformationen der Histon-Tails, welche stark von der Salzkonzentration abhängen, einen erheblichen Einfluss auf die Faltung der Fiber besitzen [34, 170-172]. Das Tails-Potential, wie es von Mangenot *et al.* [42] zur Interpretation ihrer osmotischen Experimente und ihrer elektropherischen Mobilitätsmessungen vorgeschlagen wurde, hat den Vorteil, dass es die Ausdehnung der Histon-Tails explizit integriert. Es besteht gemäß dem Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek-(DLVO)-Ansatz aus drei kugelsymmetrischen Teilen, die sich aus der att-

raktiven van der Waals-Wechselwirkung, dem Volumenausschluss und der elektrostatischen Abstoßung zusammensetzen:

$$E_{\text{Tails}} = E_{\text{Harte-Kugel}} + E_{\text{Elek}} + E_{\text{Attr}} . \quad (3.26)$$

Um die oblate Ellipsoidenform der Nukleosomen zu berücksichtigen, wird das Potential von mir modifiziert. Hierfür ersetze ich die Harte-Kugelvolumen-Abstoßung durch den abstoßenden Teil des Gay-Berne-Potentials, so dass gilt:

$$E_{\text{Tails}} = E_{\text{GBrep}} + E_{\text{Elek}} + E_{\text{Attr}} . \quad (3.27)$$

Die abstoßende Energie E_{GBrep} verhindert nicht nur, dass sich die NCP's überlappen, sondern macht das Tails-Potential E_{Tails} auch von der Orientierung der Nukleosomen abhängig.

Für das repulsive Gay-Berne-Potential gilt:

$$E_{ij}^{\text{GB}}(\bar{\mathbf{a}}_i, \bar{\mathbf{a}}_j, \bar{r}_{ij}^0) = \begin{cases} 4 \varepsilon(\bar{\mathbf{a}}_i, \bar{\mathbf{a}}_j, \bar{r}_{ij}^0) \left[\left(\frac{\sigma_0}{|\bar{r}_{ij}| - \sigma(\bar{\mathbf{a}}_i, \bar{\mathbf{a}}_j, \bar{r}_{ij}^0) + \sigma_0} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_0}{|\bar{r}_{ij}| - \sigma(\bar{\mathbf{a}}_i, \bar{\mathbf{a}}_j, \bar{r}_{ij}^0) + \sigma_0} \right)^6 \right] \\ \quad + \varepsilon(\bar{\mathbf{a}}_i, \bar{\mathbf{a}}_j, \bar{r}_{ij}^0) , & \text{für } |\bar{r}| \leq r_{\text{Min}} = (\sqrt[6]{2} - 1)\sigma_0 + \sigma(\bar{\mathbf{a}}_i, \bar{\mathbf{a}}_j, \bar{r}_{ij}^0) \\ 0 , & \text{sonst} \end{cases} . \quad (3.28)$$

Dieses modifizierte Gay-Berne-Potential ist in Richtung der positiven y-Achse um die maximale Potentialtiefe des Gay-Berne-Potentials aus (3.18) verschoben. Dadurch bleibt das Potential differenzierbar und kann auch in Simulationen mit Brownscher Dynamik verwendet werden.

Die Energie E_{Elek} beschreibt die elektrostatische Abstoßung der NCP's. Analog zu Mangelot *et al.* wird der klassische DLVO-Ansatz verwendet, bei dem sich die elektrostatische Energie als Lösung der linearisierten Poisson-Boltzmann-Gleichung ergibt zu

$$E_{\text{Elek}} = k_B T Z_{\text{Str}}^2 l_{\text{Bj}} \frac{\exp[-\kappa(|\bar{r}| - 2a)]}{|\bar{r}|(1 + \kappa a)^2} , \quad (E_{\text{Elek}} \ll k_B T) \quad (3.29)$$

mit Bjerrum's Länge $l_{Bj} = \frac{e^2}{4\pi\epsilon\epsilon_0 kT}$, κ^{-1} der Debyelänge und a der Radius des Nukleosoms. Aufgrund der hohen strukturellen Ladung Z_{Str} eines Nukleosoms, sammeln sich in seiner Umgebung eine Vielzahl von Ionen an. Um diesen Effekt angemessen zu berücksichtigen, wird die strukturelle Ladung Z_{Str} renormalisiert und durch eine geringere effektive Ladung Z_{Eff} ersetzt [42].

Die attraktive Wechselwirkung E_{Attr} ist ein empirisches Potential, welches die Ausdehnungslänge der Histon-Tails D als Skalierung verwendet [42]. Als Basis dient eine vereinfachte Yukawa-Form:

$$E_{Attr} = -k_B T \Omega \frac{2a}{r} \exp\left[-\frac{r-2a}{D}\right], \quad (3.30)$$

wobei a der Nukleosom-Radius und Ω die Potentialtiefe ist.

Die Ausdehnung der Histon-Tails D lässt sich aus der maximalen Ausdehnung der NCP abschätzen [42], welche in vorangegangenen Röntgen-Streuexperimenten [41] in Abhängigkeit von der Salzkonzentration gemessen wurden. Aus theoretischen Betrachtungen einer geladenen Kette, welche an einer entgegengesetzt geladenen Oberfläche befestigt ist [173], ergibt sich ein linearer Anstieg der Histon-Tail-Ausdehnung von 0 nm bis maximal 2 nm mit steigender Salzkonzentration [42]. Aufgrund der Daten aus den Streuexperimenten [41, 42] für ein NCP mit 145 gebundenen Basen wird in den Simulationen angenommen, dass die Ausdehnung der Histon-Tails bei einer Salzkonzentration von 10 mM beginnt und bei 100 mM die maximale Ausdehnung von $D = 2$ nm erreicht wird. Allerdings hängt die kritische Salzkonzentration, bei der die Ausdehnung startet bzw. endet, empfindlich von der an das Nukleosom gebundenen DNS-Länge ab. Ein Anstieg der gebundenen DNS um 20 bp führt zu einer kritischen Salzkonzentration, die um einen Faktor drei erhöht sind [42].

Die Potentialtiefe Ω wird der Formel:

$$\Omega = (2900 \pm 500) C_s^{-1,27 \pm 0,04}, \quad (3.31)$$

mit C_s der Salzkonzentration in mM, entnommen, welche Manganot *et. al* durch Kurvenanpassung an die Daten des experimentell bestimmten zweiten Virialkoeffizienten erhielten [42].

3.7.2 Parametrisierung des Tails-Potentials

Die Parametrisierung des Tails-Potentials erfolgt analog zum Gay-Berne-Potential auf Basis der Flüssigkristallstrukturen von Leforestier und Livolante [165],[166]. Die Parameter sind in Tabelle 3.1 dargestellt. Sie wurden derart gewählt, dass die Positionen der Minima des Potentials, bei einer Salzkonzentration von 100 mM, mit den Abstandsmessungen aus den Flüssigkristallen übereinstimmen. Bei longitudinalen bzw. lateralen Abstand zweier NCP's, befinden sie sich im Bereich von $(7,16 \pm 0,65)$ nm bzw. $(11,55 \pm 1)$ nm. Die Wahl der Parameter für die Potentialtiefe erfolgte so, dass das Maximum aus lateraler und longitudinaler Orientierung im Bereich von $(3 \pm 0,5)$ $k_B T$ liegt. Dieser ergibt sich aus Chromatin-Streckexperimenten mit optischen Pinzetten von Cui *et al.* [120] sowie entsprechenden Simulationen von Katritch *et al.* [174].

Tabelle 3.1. Übersicht über die Parameter des Tail-Potentials

Parameter	Wert
B_{GBrep}	0,9
B_{Tails}	5
A_{GBrep}	1
A_{Erep}	1,5
A_{Tails}	1,5
A_{Ges}	2,5
$C_{cut-off}$	6
$D_{eff,Erep}$	1,66
$D_{eff,Tails}$	1,7
Gay-Berne Parameter für den abstoßenden Teil der Wechselwirkung	$\sigma_0 = 10.3$ nm, $\chi = -0.506$, $\epsilon_0 = 3,43$ kJ/mol, $\chi' = -0.383$

Da die Nullstelle des E_{GBrep} durch die Verschiebung entlang der positiven y-Achse bei höheren Abständen liegt als beim ursprünglichen E_{GB} , verschiebt der zusätzliche Parameter B_{GBrep} das Potential entlang der negativen x-Achse. Weiterhin verläuft das ursprüngliche E_{GB} am Minimum flacher als an seiner Nullstelle. Um die Steigung von

E_{GBrep} entsprechend anzupassen, wird das Potential mit dem Parameter A_{GBrep} skaliert.

Die Behandlung der Nukleosomen als oblate Ellipsoide hat ebenfalls Einfluss auf die Teilenergien E_{Elek} und E_{Attr} . Diese Wechselwirkungen, welche die Nukleosomen als Kugeln behandeln, stimmen nur für die laterale Ausrichtung der Nukleosomen mit dem Ansatz als oblate Ellipsoiden überein. In diesem Fall nimmt der minimale Abstand der Nukleosom-Schwerpunkte den Werte $R=r-2a$ an.

Um den zylinderförmigen Charakter zu berücksichtigen, wird ein geringerer effektiver Nukleosom-Durchmesser verwendet, der sich in den Faktoren $D_{\text{eff,Erep}}$ und $D_{\text{eff,Tails}}$ ausdrückt. Gleichzeitig werden die Potentiale durch die beiden Parameter B_{GBrep} und $B_{\text{Erep-Tails}}$ in Richtung der negativen x-Achse verschoben, wodurch die attraktive Wechselwirkung bei longitudinaler Orientierung erhöht wird.

Für kleine Abstände zeigte sich, dass E_{Attr} stark ansteigt und sogar die Summe aus Harte-Volumen-Abstoßung und elektrostatischer Abstoßung kompensiert. Aus diesem Grund wurde für Abstände kleiner als $C_{\text{cut-off}}$ der Wert der empirischen attraktiven Wechselwirkung konstant gesetzt. A_{GBrep} , A_{Erep} und A_{Tails} skalieren die Potentialtiefe der einzelnen Teilenergien und A_{Ges} die gesamte Energiesumme E_{Tails} :

$$E_{\text{Tails}} = A_{\text{Ges}} \cdot \left\{ \begin{aligned} & A_{\text{GBrep}} \cdot E_{\text{GBrep}}(r - B_{\text{GBrep}}) \\ & + A_{\text{Erep}} \cdot E_{\text{Elek}}(r - B_{\text{Erep-Tails}}) \\ & + A_{\text{Tails}} \cdot E_{\text{Attr}}(r - B_{\text{Erep-Tails}}) \end{aligned} \right\}. \quad (3.32)$$

Abbildung 3.11 visualisiert das Tails-Potential E_{Tails} und seine Teilpotentiale E_{GBrep} , E_{Elek} und E_{Attr} für die beiden Sonderfälle, dass zwei Nukleosomen lateral bzw. longitudinal zueinander orientiert sind. Während E_{Elek} und E_{Attr} eine Kugelsymmetrie aufweisen, wird durch den modifizierten Gay-Berne-Teil E_{GBrep} die ellipsoide Form und damit die Orientierung berücksichtigt.

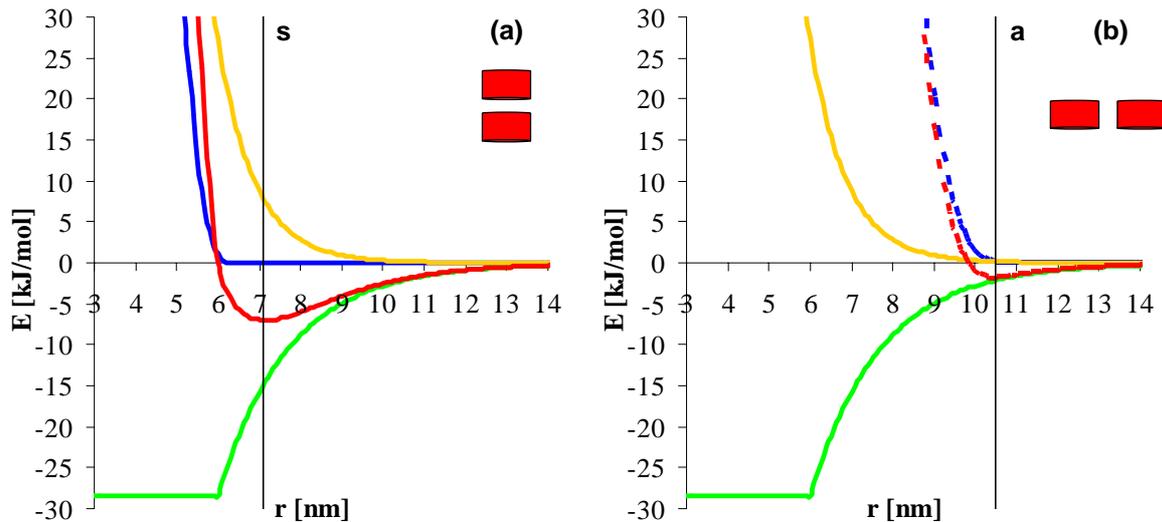


Abb. 3.11. Verlauf der Gesamtenergie des Tails-Potentials E_{Tails} sowie dessen Energiebestandteile E_{Elek} , E_{Attr} und E_{GBrep} für die beiden Spezialfälle einer longitudinalen (a) und lateralen Orientierung (b) der Nukleosomen. Während in beiden Fällen der Verlauf von E_{Elek} und E_{Attr} gleich ist, hängt E_{GBrep} und damit die Gesamtenergie E_{Tails} von der Orientierung der Nukleosomen ab. Abstände s und a entsprechen den Abständen in der kolumnalen hexagonalen Phase der Nukleosom-Flüssigkristalle.

— E_{Elek} — E_{Attr} — E_{GBrep} — E_{Tails}

3.8 Erweitertes geometrisches Modell

Eine wichtige Erweiterung des Modells ist die Möglichkeit, die Anknüpfungspunkte der Linker-DNS am Nukleosom variieren zu können. Dadurch ist es möglich die Anknüpfungspunkte im Modell entsprechend den verschiedenen Kristallstrukturen [6, 7] zu wählen. Bisher musste in den Simulationen ohne Stamm immer davon ausgegangen werden, dass zwei volle Windungen DNS am Nukleosom gebunden sind. Um Ergebnisse unserer Kooperationspartner Jürgen Sühnel und Stephan Diekmann (vgl. 5.3) zu interpretieren, war es notwendig, den Einfluss des Anknüpfungswinkels der Linker-DNS in das Modell zu integrieren.

Aus diesem Grund führte ich den Parameters δ in das Modell ein, der den Anknüpfungswinkel der Linker-DNS am Nukleosom beschreibt (Abb.3.12). Er liegt in der Ebene, auf der die superhelikale Achse des Nukleosoms senkrecht steht, so dass die Anknüpfungspunkte der Linker-DNS in symmetrischer Weise definiert sind.

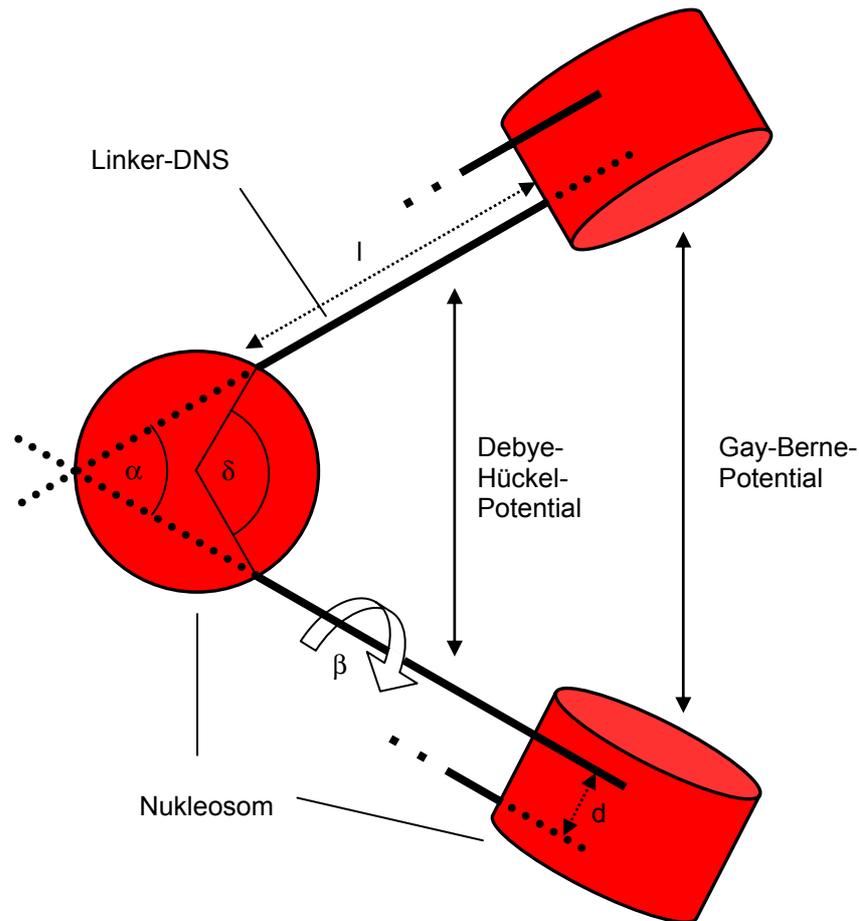


Abb. 3.12. Visualisierung der Geometrie des erweiterten Modells. Analog zu dem in 3.1 beschriebenen Modell, bilden Linker-DNS der Länge l den Öffnungswinkel α und sind eine Distanz d entlang der Nukleosomachse versetzt. Aufeinanderfolgende Nukleosomen sind um den Torsionswinkel β gegeneinander verdreht. Im erweiterten Modell definiert der Winkel δ die Anknüpfungspunkte der Linker-DNS. Für $\delta = 0^\circ$ ergibt sich das ursprüngliche Modell wie es in Abb. 3.1 dargestellt ist.

Die Größe des Anknüpfungswinkels δ ist durch die Anzahl der am Nukleosom gebundenen Basenpaare vorgegeben. Basierend auf der Kristallstruktur [8] sind z.B. 147 bp 1,67-mal um ein einzelnes Nukleosom gewunden. Demnach ergibt sich ein Anknüpfungswinkel von $\delta = 360 - (360 * 0.67) = 118,8^\circ$, unter der Annahme, dass die Linker-DNS das Nukleosom symmetrisch verlässt. Wird $\delta = 0^\circ$ gewählt, so ergeben sich die Anknüpfungspunkte des unveränderten Modells. Dabei sind ein- und ausgehende Linker-DNS im Abstand von 3,1 nm parallel zu superhelikalen Achse des Nukleosoms übereinander positioniert.

Alle übrigen Parameter entsprechen dem in 3.1 beschriebenen Modell.

Die Einführung des Anknüpfungswinkels δ hat wichtige Konsequenzen für die Diskretisierung der Nukleosomen. Im ursprünglichen Modell stimmen die superhelikale Achse des Nukleosoms und der Segmentvektor \bar{u}_i überein. Im erweiterten Modell gilt dies nur für den Spezialfall $\delta = 0^\circ$ (Abb. 3.13). Dies erfordert, dass der Schwerpunkt und die superhelikale Achse eines Nukleosoms nicht im globalen, sondern bezüglich des lokalen Koordinatensystems des jeweiligen Nukleosoms, definiert sind. Bei einer Bewegung des Nukleosom-Segments durch einen Monte-Carlo-Schritt bleiben somit die lokalen Koordinaten des Schwerpunkts und der Achse unverändert.

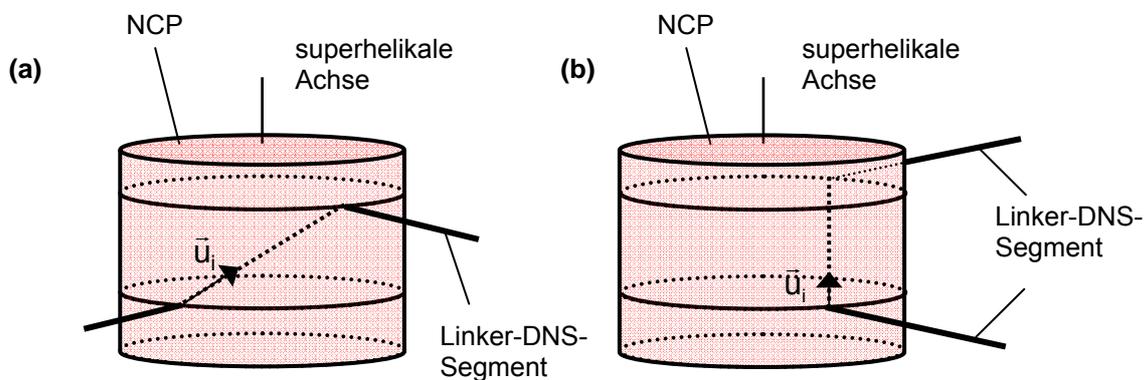


Abb. 3.13. Veranschaulichung der Lage des Nukleosom-Segments bei Anknüpfungswinkel $\delta \neq 0$. Der Abstand zwischen Nukleosom-Segment und Schwerpunkt des Nukleosoms hängt von δ ab und beträgt $R_{\text{Nuk}} \cdot \cos(\delta/2)$, falls kein Stamm vorhanden ist.

Kapitel 4

Methoden

4.1 Das Simulationsprotokoll

4.1.1 Startkonformation und Relaxierung

Die simulierten Chromatinketten werden durch den Metropolis-Monte-Carlo-Algorithmus (Abschnitt 2.2.2) generiert. Hierzu verwenden wir die in Abschnitt 3.3 beschriebenen Monte-Carlo-Schritte. Die Ketten bestehen üblicherweise aus 100 Nukleosomen, wobei diese Zahl gegebenenfalls variiert werden kann. Für die Startkonformation wird analog zu früheren Simulationen [168] der Öffnungswinkel $\alpha_{init} = 26^\circ$ gewählt. Dieser Wert konvergiert im Laufe der Simulationen gegen den effektiven Öffnungswinkel α_{eff} (Abb. 4.1) im Bereich der experimentellen Werte von $35^\circ - 45^\circ$ (vgl. 3.1).

Um Unabhängigkeit von der Startkonformation zu gewährleisten, werden zwei verschiedene Durchgänge simuliert, die jeweils von zwei energetisch völlig unterschiedlichen Startkonformationen ausgehen. Im ersten Simulationsdurchgang wird eine kompakte Fiber verwendet, so dass die Summe der elastischen Energien Null ergibt (Abb. 4.2a).

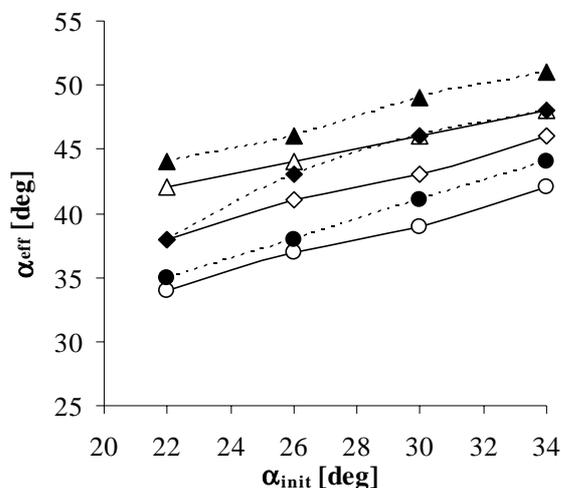
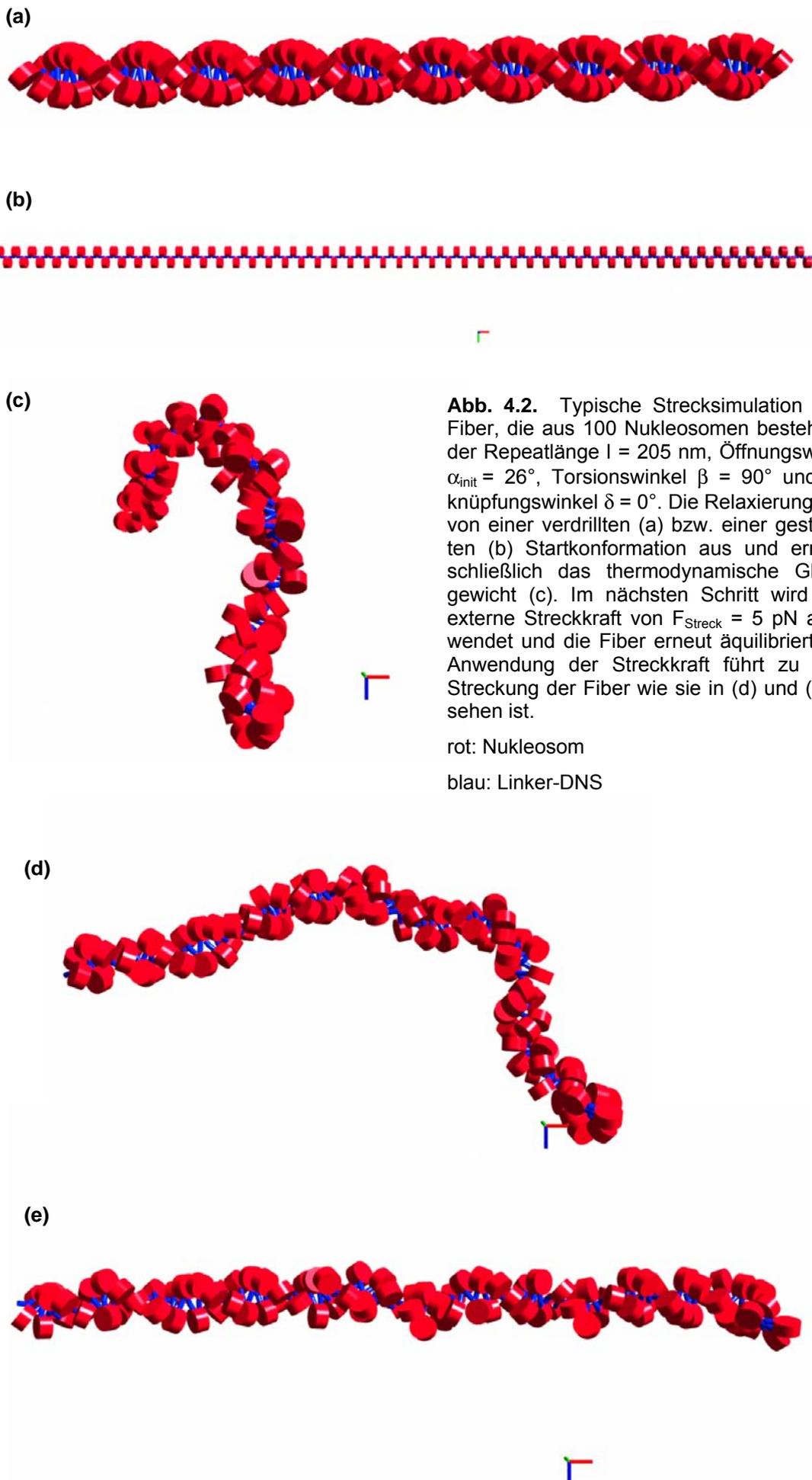


Abb. 4.1. Mittlerer effektiver Öffnungswinkel α_{eff} als Funktion des Start-Öffnungswinkels α_{init} .

Während der Relaxierung konvergiert α_{init} gegen α_{eff} aufgrund der elektrostatischen Abstoßung der Linker-DNS und thermischen Fluktuationen. Für $\alpha_{init} = 26^\circ$ liegt α_{eff} im Bereich der experimentellen Werte zwischen $35^\circ - 45^\circ$.



In einem zweiten Durchgang wird eine gestreckte Startkonformation gewählt, bei der die Linker-DNS und die Verbindungslinien der Anknüpfungspunkte der DNS am Nukleosom auf einer Geraden liegen (Abb. 4.2b). Die Nukleosomen sind parallel zu dieser orientiert. Dabei wird die Torsion zwischen den Segmenten derart gewählt, dass sich aufeinander folgende Nukleosomen gegenüber liegen.

Um sicherzustellen, dass sich das System im thermodynamischen Gleichgewicht befindet, wird es in beiden Durchgängen zunächst relaxiert (Abb. 4.2c). Hierfür werden solange Konformationen generiert, bis sich die charakteristischen Parameter der Fiber, wie z.B. Energie, Persistenzlänge, Durchmesser, Massenbelegungsdichte und Konturlänge, in einem Plateau befinden. In der Literatur wird das 20fache der Korrelationslänge als gute Abschätzung für die Anzahl der Relaxierungsschritte angegeben [137, 175]. Setzt man eine großzügige Korrelationslänge N_{Korr} von 5000 MC-Schritten an (vgl. 4.1.2), so ist die in den Simulationen verwendete Anzahl von $5 \cdot 10^5$ MC-Schritten zur Relaxierung deutlich höher. Die zur Relaxierung generierten Konformationen werden nicht für die endgültige Auswertung verwendet.

Im Falle einer Strecksimulation „schaltete“ ich nun das Streckpotential ein und initiierte eine nochmalige Relaxierung (Abb. 4.2d,e).

Schließlich werden weitere $3 \cdot 10^6$ MC-Schritte für die spätere Auswertung durchgeführt.

Ein Intel Dual-Xeon Prozessor (3,0 GHz) benötigt für eine typische Simulation ca. 4 Tage.

4.1.2 Korrelation der simulierten Daten

Der Erwartungswert einer Observablen wird mittels einer Metropolis-Monte-Carlo-Simulation von N Konformationen nach Abschnitt 2.2.2 durch

$$\langle A(\bar{x}) \rangle = \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N A(\bar{x}_j), \quad (4.1)$$

abgeschätzt, wobei die \bar{x}_j nach dem Metropolis-Algorithmus erzeugt werden.

Ein Schätzwert für den Fehler einer Observablen ist:

$$\langle \delta A \rangle = \sqrt{\frac{\langle A^2 \rangle - \langle A \rangle^2}{N}} . \quad (4.2)$$

Allerdings sind die Konformationen eines Metropolis-Algorithmus, die innerhalb eines Monte-Carlo-Schritts generiert werden, nicht unabhängig. Die Observablen folgen einer exponentiell abfallenden Autokorrelationsfunktion:

$$G(j) = \frac{\langle A(k) A(k+j) \rangle}{\langle A^2 \rangle} \approx \exp(-t/N_{\text{Relax}}), \quad (4.3)$$

mit der Relaxationskonstante N_{Relax} . Die Indizes k und j nummerieren die berechneten Konformation.

Dies bedeutet, dass zwei Konformationen als unabhängig betrachtet werden können, wenn sie mindestens N_{Relax} MC-Schritte auseinander liegen. In der Literatur findet sich häufig eine etwas gröbere Abschätzung, bei der zwei Konformationen als unabhängig betrachtet werden, wenn sie $N_{\text{Korr}} = 2 N_{\text{Relax}}$ Schritte auseinander liegen [134, 137, 159]. Damit ergibt sich für die Abschätzung des Fehlers:

$$\langle \delta A \rangle = \sqrt{\frac{\langle A^2 \rangle - \langle A \rangle^2}{N / N_{\text{Korr}}}} , \quad (4.4)$$

mit der Korrelationslänge $N_{\text{Korr}} = 2 N_{\text{Relax}}$.

Um die Statistik der durchgeführten Simulationen zu überprüfen, berechnete ich die Autokorrelationsfunktion der Energie, des End-zu-End-Abstandes und der Massenbelegungsdichte für alle Simulationsdurchgänge. N_{Relax} lässt sich bestimmen, indem die Funktion $\exp(-t/N_{\text{Relax}})$ nach der Methode der kleinsten Quadrate an die berechnete Autokorrelationsfunktion $G(j)$ angepasst wird. Alternativ lässt sich N_{Relax} auch durch die Formel

$$N_{\text{Relax,iter}} = \frac{1}{2} + \sum_{j=1}^N G(j) \quad (4.5)$$

berechnen, wobei sich zeigen lässt, dass $N_{\text{Relax}} \approx N_{\text{Relax,iter}}$, falls $G(j) \sim \exp(-t/N_{\text{Relax}})$ und $N_{\text{Relax}} \gg 1$ [175].

Für die maximalen Korrelationslängen ergibt sich im Fall der Gesamtenergie $N_{\text{Korr}} \approx 3600$ MC Schritte, für den End-zu-End-Abstand $N_{\text{Korr}} \approx 3200$ MC Schritte und für die Massenbelegungsichte $N_{\text{Korr}} \approx 2600$ MC Schritte. Die zur Analyse durchgeführten $3 \cdot 10^6$ MC-Schritte entsprechen demnach mindestens 600 statistisch unabhängigen Konformationen.

4.2 Analyse

Die Algorithmen zur Bestimmung der Massenbelegungsichte, des Durchmessers der Fiber sowie der Neigung der Nukleosomen wurde gegenüber dem Programm von Gero Wedemann überarbeitet, aber nicht grundlegend verändert. Dagegen wurde der Kode zur Bestimmung der Konturlänge optimiert. Es werden nur noch die Nukleosomen zur Bestimmung der Kontur verwendet, und die hierfür irrelevanten DNS-Segmente vernachlässigt. Dadurch wird der Algorithmus unabhängig von der Anzahl der DNS-Segmente zwischen den Nukleosomen und bedeutend schneller.

Die Algorithmen zur Bestimmung des Sedimentationskoeffizienten, der Persistenzlänge der Biegung und des Streckmoduls wurden von mir neu hinzugefügt. Weiterhin implementierte ich ein Programm zur Visualisierung der Konformationen einer Trajektorie auf der Basis von Open-GL. Damit ist es möglich, bequem durch die Trajektorien zu spulen und die einzelnen Konformationen in Echtzeit zu drehen, zu verschieben oder zu vergrößern. Im ursprünglichen Programm musste jede einzelne Konformation sowie deren Rotation oder Vergrößerung einzeln gerendert werden, wodurch ein enormer Zeitaufwand entstand.

4.2.1 Konturlänge

Um die Konturlänge L_0 einer 30-nm-Chromatinfiber zu bestimmen, muss zunächst die Achse bzw. das Rückgrat der Fiber definiert werden, entlang der die Konturlänge gemessen wird. Hierzu berechnet der verwendete Algorithmus nacheinander die Schwerpunkte

$$\bar{c}_i = \frac{1}{N_c} \sum_{j=i}^{i+N_c-1} \bar{R}_j, \quad i = 1 \dots N - N_c + 1 \quad (4.6)$$

von N_c Nukleosomen, wobei \bar{R}_j den Schwerpunkt des j -ten Nukleosoms angibt (Abb. 4.3). N_c heißt Nukleosomfensterlänge. Verbindet man die einzelnen Schwerpunkte \bar{C}_k , so erhält man eine Kette, deren Segmente die Kontur der Fiber beschreiben.

Die Konturlänge ergibt sich zu

$$L_0 = \sum_{i=1}^{N-N_c} |\bar{C}_{i+1} - \bar{C}_i| \quad (4.7)$$

und wird von der Fensterlänge N_c beeinflusst. Eine große Fensterlänge N_c tendiert dazu, die Biegefluktuationen im Bereich von i und $i + N_c$ „auszumitteln“, so dass die Konturlänge L_0 unterschätzt wird. Zu kleine Werte von N_c führen dazu, dass die Fiberachse dem helikalen Pfad der Linker-DNS folgt, wodurch die Konturlänge überschätzt wird.

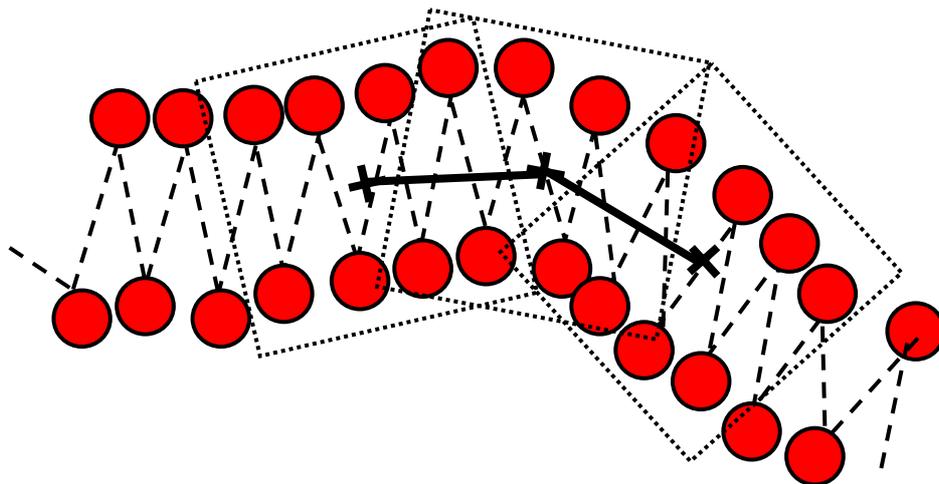


Abb. 4.3. Schematische Skizze zur Berechnung der Kontur bzw. des Rückgrats einer Fiber. Der Algorithmus berechnet sukzessiv die Schwerpunkte \bar{C}_k einer gegebenen Fensterlänge N_c von Nukleosomen. Deren Verbindungslinie definiert die Kontur der Fiber.

Um diesen systematischen Fehler zu minimieren, habe ich Simulationen mit verschiedenen Fensterlängen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass sich beim Auftragen der Persistenzlänge, Streckmoduls bzw. Konturlänge gegen die Fensterlänge ein Plateau zwischen 10 und 20 Nukleosomen ergab (Abb. 4.4). Aus diesem Grund wählte ich eine Fensterlänge von 14 Nukleosomen, um für die Analyse der Daten ein nahezu konstantes Verhalten der Parameter in diesem Bereich zu gewährleisten.

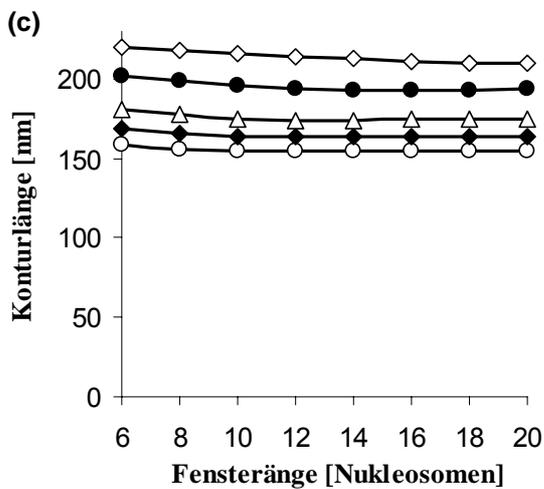
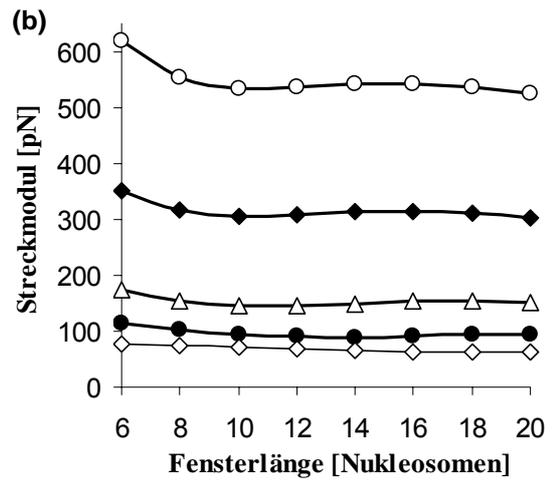
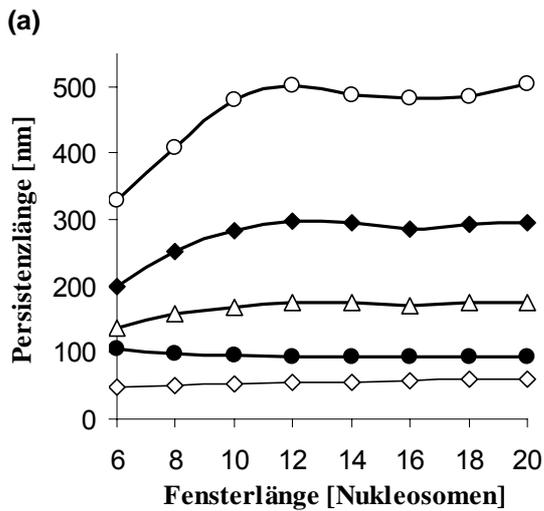
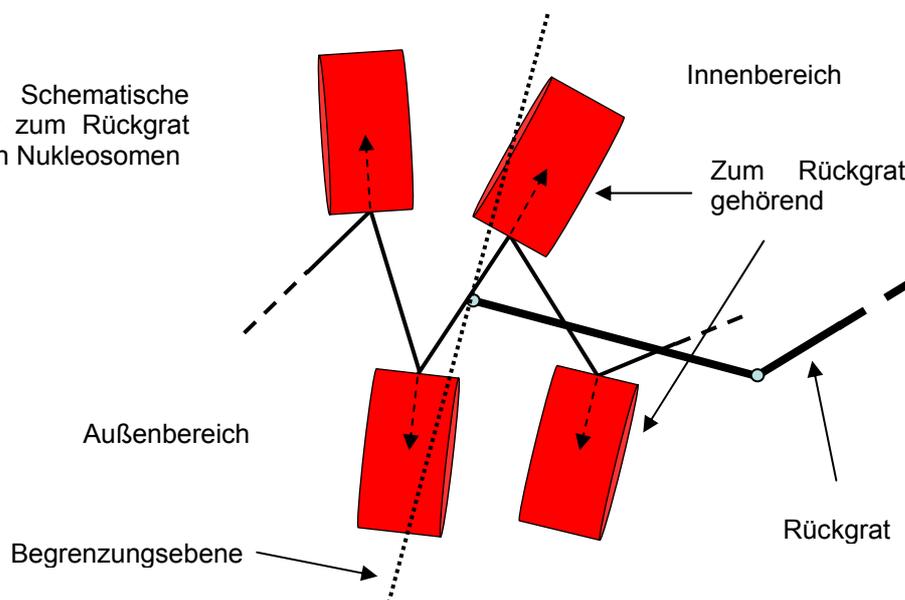


Abb. 4.4. Persistenzlänge (a), Streckmodul (b) und Konturlänge (c) als Funktion der Nukleosom-Fensterlänge für verschiedene Repeatlängen l und Torsionswinkel $\beta = 110^\circ$, kein Stamm. Alle Funktionen weisen ein Plateau auf, welches bei einer Fensterlänge von 10 Nukleosomen beginnt. Die Wahl einer Fenstergröße von 14 Nukleosomen für die Berechnung der Konturlänge gewährleistet ein nahezu konstantes Verhalten in dieser Region.

- ◇: Repeatlänge $l = 192$ bp;
- : $l = 182$ bp
- ◆: $l = 185$ bp;
- △: $l = 187$ bp;
- : $l = 190$ bp;

Abb. 4.5. Schematische Skizze der zum Rückgrat gehörenden Nukleosomen



4.2.2 Massenbelegungsdichte

Die Massenbelegungsdichte μ ist das Verhältnis aus der zum Rückgrat gehörenden effektiven Anzahl der Nukleosomen N_{Eff} und der Konturlänge L_0 . Die effektive Anzahl der Nukleosomen besteht aus denjenigen, die zwischen den Enden der Kontursegmentkette liegen. Betrachtet man an den jeweiligen Enden das erste bzw. letzte Segment als Normalenvektor einer Ebene, so wird das Rückgrat durch diese Ebenen begrenzt. Nukleosomen, die sich außerhalb der durch diese Begrenzungsebenen definierten Halbräume befinden, gehören nicht mehr zum Rückgrat und zählen somit nicht zur effektiven Nukleosom-Anzahl (Abb. 4.5).

4.2.3 Durchmesser der Fiber

Um den Durchmesser der Fiber zu bestimmen, wird zunächst der mittlere und maximale Abstand zwischen den zum Rückgrat gehörenden Nukleosomen und dem Rückgrat bestimmt. Hierfür wird der minimale Abstand jedes Nukleosoms zum nächstliegenden Kontursegment berechnet und anschließend arithmetisch gemittelt. Da die Nukleosomen nahezu senkrecht zur Fiberachse orientiert sind, erhält man den mittleren bzw. maximalen Fiberdurchmesser, indem der Nukleosom-Radius zu dem mittleren bzw. maximalen Abstand addiert und das Ergebnis verdoppelt wird.

4.2.4 Neigung der Nukleosomen und der DNS zur Fiberachse

Für jedes zum Rückgrat gehörende Nukleosom wird der Winkel zum nächstgelegenen Segment des Rückgrats berechnet. Anschließend erhält man den mittleren Neigungswinkel der Nukleosomen aus dem arithmetischen Mittel der berechneten Winkel. Analog ergibt sich der mittlere Winkel der Linker-DNS, indem zunächst der Winkel zum nächstgelegenen Konturkettensegment bestimmt und anschließend entsprechend gemittelt wird.

4.2.5 Sedimentationskoeffizient

Ein weiter charakteristischer Strukturparameter ist der Sedimentationskoeffizient, welcher experimentell typischerweise mittels analytischer Ultrazentrifugation bestimmt wird. Besitzen zwei Strukturen die gleiche Molmasse, so hängt der Sedimentationskoeffizient unmittelbar von der hydrodynamischen Reibung ab. Um die Vergleichbarkeit mit anderen Simulationen zu gewährleisten, verwende ich zwei Methoden die bereits bei Simulationen mit dem DiSCO-Modell gut übereinstimmen. Die Abweichung betrug weniger als 0.6 S.

Die eine Methode verwendet eine Näherungsformel, die auf dem Ansatz von Kirkwood beruht [176]. Danach lässt sich der Reibungskoeffizient eines aus N gleichgroßen Einheiten zusammengesetzten Objektes aus den jeweiligen Reibungskoeffizienten der Untereinheiten berechnen. Die Kirkwood-Methode wurde bereits in verschiedenen Studien von Oligonukleosomketten zur Bestimmung des Sedimentationskoeffizienten angewendet [34], [116]. Dabei berechnet sich der Sedimentationskoeffizient $S_N = S_{20^\circ\text{C},\text{Wasser}}$, für eine aus N Nukleosomen bestehende Kette mit dem hydrodynamischen Radius R_1 , durch die Kirkwood-Näherung:

$$S_N = S_1 \left(1 + \frac{R_1}{N} \sum_{i,j} \frac{1}{R_{ij}} \right), \quad (4.8)$$

wobei R_{ij} den Abstand zwischen zwei Nukleosomen angibt und S_1 den Sedimentationskoeffizient $S_{20^\circ\text{C},\text{Wasser}}$ eines Mononukleosoms bei Standardbedingungen repräsentiert. Es ist zu beachten, dass dieser Ansatz den Einfluss der Linker-DNS vernachlässigt und die Nukleosomen nicht als Zylinder, sondern als Kugeln angenommen werden. Als Kugelradius verwende ich analog zu den Experimenten [34] und anderen Simulationen [53] $R_1 = 5,5$ nm sowie $S_1 = 11,1$ Svedberg ($1 \text{ S} = 10^{-13} \text{ s}$).

Ein Nachteil der Kirkwood-Formel ist, dass sie nur eine grobe Näherung für die tatsächlichen hydrodynamischen Wechselwirkungen darstellt. Insbesondere liefert sie bei sehr asymmetrischen Objekten ungenaue Ergebnisse. Eine exaktere Bestimmung des Sedimentationskoeffizienten ermöglicht das Programm HYDRO [177]. Es basiert auf der von Bloomfield *et al.* modifizierten Kirkwood-Näherung mit der prinzipiell der Reibungskoeffizient eines beliebigen Objektes bestimmt werden kann [178]. Dabei wird das Objekt durch eine hinreichend große Anzahl von identischen Kugeln

approximiert. Für die Chromatinfiber bedeutet das, dass die Untereinheiten Einheiten nicht mehr identisch sein müssen. Allerdings verlangt HYDRO, dass sie die Form einer Kugel aufweisen. Deshalb verwende ich, neben kugelförmigen Nukleosomen, auch die Linker-DNS-Segmente in Form von Kugeln, für die ich analog zu Sun *et al.* [53] einen Radius von 1,5 nm annehme.

4.2.6 Persistenzlänge der Biegung

Die Persistenzlänge L_p der Biegung ist definiert als die Distanz, über welche die Richtung einer Polymerkette erhalten bleibt: Die Korrelation zwischen den Orientierungen von zwei Polymersegmenten fällt exponentiell mit der Korrelationslänge L_p als Funktion der Konturlänge s ab, welche die beiden Segmente voneinander trennt [132].

Da die thermischen Fluktuationen eines Systems unmittelbar mit seiner Steifigkeit verknüpft sind, lässt sich die Persistenzlänge L_p der Chromatinfiber aus diesen Fluktuationen bestimmen. In dieser Arbeit verwende ich zwei verschiedene Ansätze. Zum einen gehe ich von der lokalen Richtungsänderung der Fiberachse aus, welche durch die Tangenten an den Konturverlauf beschrieben wird und zum anderen von dem mittleren quadratischen End-zu-End-Abstand der Fiber.

Methode A1: Fluktuation der Tangentenwinkel

Der Abfall der Korrelation zwischen den Orientierungen von zwei Fibersegmenten ist durch Gleichung (2.19) aus Abschnitt 2.1.3 gegeben:

$$\langle \cos(\Theta(s)) \rangle = \langle \vec{t}_i \cdot \vec{t}_j \rangle = \exp\left(-\frac{s}{L_p}\right), \quad (4.9)$$

wobei s die Konturlänge ist, die zwei Segmente von einander trennt. Da die Kontur der Fiber die Schwerpunkte \vec{c}_k als Verbindungspunkte zwischen den Kettensegmenten enthält, lassen sich die Tangenten \vec{t}_k der Fiberachse approximieren durch:

$$\vec{t}_i = \frac{\vec{c}_i - \vec{c}_{i+1}}{|\vec{c}_i - \vec{c}_{i+1}|}, \quad i = 1, \dots, N-1. \quad (4.10)$$

Passt man einen exponentiellen Zerfall an die Autokorrelationsfunktion $\langle \vec{t}_i \cdot \vec{t}_j \rangle$ an, erhält man die Korrelationslänge, welche per Definition der Persistenzlänge L_p entspricht.

Eine genauere Bestimmung der Tangentenvektoren erreicht man, indem eine interpolierende Raumkurve durch die Schwerpunkte \vec{c}_k legt. Hierzu verwende ich interpolierende kubische Splines entsprechend dem Algorithmus aus Numerical Recipes [179], der neben der interpolierten Raumkurve auch deren Ableitungen und damit die gesuchten Tangentenvektoren liefert.

Im Programm von Gero Wedemann wurde ein relativ ungenauer Algorithmus zur Bestimmung der Persistenzlänge verwendet, bei dem lediglich die Fluktuation der Winkel zwischen der ersten und letzten Tangente bestimmt wurde.

Methode A2: mittlerer quadratischer End-zu-End-Abstand

Der mittlere quadratische End-zu-End-Abstand einer flexiblen, nicht dehnbaren, wurmartigen Kette (inextensible Worm Like Chain) hängt von seiner Konturlänge L_0 und seiner Persistenzlänge L_p ab. Dies wird durch die Porod-Kratky-Gleichung beschrieben (2.24):

$$\langle R^2 \rangle_{\text{inext}} = 2 L_p^2 \left(\frac{L_0}{L_p} - 1 + \exp\left(-\frac{L_0}{L_p}\right) \right). \quad (4.11)$$

Gleichung (4.11) beschreibt die entropische Elastizität der wurmartigen Kette, welche aus einer reduzierten Entropie der gestreckten Kette folgt. Werden die entropischen und die enthalpischen Komponenten als unabhängig betrachtet, so erhält man durch die Addition des Terms $L_0 \cdot \frac{k_B T}{\varepsilon}$, mit ε als Streckmodul der Fiber, eine ähnliche Relation wie (4.11) für die dehnbare wurmartige Kette (extensible Worm Like Chain):

$$\langle R^2 \rangle_{\text{ext}} = 2 L_p^2 \left(\frac{L_0}{L_p} - 1 + \exp\left(-\frac{L_0}{L_p}\right) \right) + L_0 \cdot \frac{k_B T}{\varepsilon}. \quad (4.12)$$

Aus den Beziehungen (4.11) und (4.12) lässt sich die Persistenzlänge L_p mittels, der aus den Simulationen bestimmten, Konturlänge L_0 und dem mittleren quadratischen Abstand $\langle R^2 \rangle$ berechnen.

In Experimenten und Simulationen wird üblicherweise das WLC-Modell als Basis für die Auswertung verwendet [127], [128]. Allerdings, existieren noch andere Kettenmodelle, wie etwa die diskrete persistente Kette [180], welche Eigenschaften sowohl von der idealen Zufallskette als auch vom WLC beinhaltet oder die semiflexible harmonische Kette [181] mit dehnbaren Verbindungen. Allerdings sind solche Modelle bei einem hohen oder niedrigen Streck-Regime von größerem Interesse. Eine Kette mit selbstermeidung wird z.B. im Flory-Modell [133] beschrieben. Danach ist der mittlere quadratische End-zu-End-Abstand nicht proportional zu N , sondern zu einer Potenz von N : $\langle \bar{R}^2 \rangle \sim N^{2\nu}$, wobei im dreidimensionalen Fall $\nu \approx 3/5$ gilt. Im Gegensatz zum WLC berücksichtigt das Flory-Modell nicht die Korrelation aufeinander folgender Segmente, da es auf einer Irrfahrt mit Selbstvermeidung beruht. Für kurze Segmentlängen ist es demzufolge ungeeignet.

4.2.7 Streckmodul

Die Strecksteifigkeit einer Fiber ist gegeben durch den Streckmodul $\varepsilon := Y \cdot A$, wobei Y der Young-Modul des Materials und A die Querschnittsfläche ist. Ich verwende zwei verschiedene Methoden, um den Streckmodul ε zu bestimmen.

Methode B1: Anpassung des Hooke'schen Gesetzes

Die Länge einer Polymerkette wie der Chromatinfiber hängt von den Biegewinkeln aufeinander folgender Segmente ab. Betrachtet man jeden dieser Winkel als eine Zufallsvariable, so lässt sich der Zentrale Grenzwertsatz für große Zahlen anwenden. Er impliziert, dass für eine hinreichend große Anzahl an Zufallsexperimenten, die Verteilung der Summe dieser Zufallsvariablen gegen eine Normalverteilung konvergiert. Daraus folgt, dass es sich für niedrige Ordnungen um harmonische Potentiale handelt.

Für Polymerketten lässt sich das Hooke'sche Gesetz schreiben als:

$$E_{\text{Str}} = \frac{1}{2} \frac{Y \cdot A}{L_0} (L - L_0)^2 = \frac{1}{2} \frac{\varepsilon}{L_0} (L - L_0)^2 = \frac{1}{2} D (L - L_0)^2, \quad (4.13)$$

wobei ε der Streckmodul und $D := \frac{\varepsilon}{L_0}$ die Kraftkonstante ist.

Die Konturlänge L_0 , bei der keine Streckkraft vorhanden ist, kann unmittelbar aus den Simulationen bestimmt werden. Die Kraftkonstante D erhält man, indem eine Parabel an die Energie-Extensions-Kurve angepasst wird. Schliesslich lässt sich der Streckmodul ε aus $\varepsilon = D \cdot L_0$ berechnen.

Methode B2: Äquipartitionstheorem

Ein anderes Verfahren den Streckmodul ε zu bestimmen, basiert auf dem Äquipartitionstheorem. Dieses besagt, dass im Mittel auf jeden Freiheitsgrad eine thermische Energie von $\frac{1}{2} k_B T$ entfällt. Zusammen mit dem Hooke'schen Gesetz erhält man:

$$\langle E_{\text{Str}} \rangle = \frac{1}{2} k_B T = \frac{1}{2} D \langle (L - L_0)^2 \rangle. \quad (4.14)$$

Da $L_0 := \langle L \rangle$, gilt

$$\langle (L - L_0)^2 \rangle = \langle (L - \langle L \rangle)^2 \rangle = \langle L^2 \rangle - \langle L \rangle^2 = \langle L^2 \rangle - L_0^2, \quad (4.15)$$

so dass sich die Kraftkonstante D aus folgender Formel berechnen lässt:

$$D = \frac{k_B T}{\langle L^2 \rangle - L_0^2}. \quad (4.16)$$

Wie zuvor erhält man den Streckmodul ε aus $\varepsilon = D \cdot L_0$.

Einen Wert für den Streckmodul erhält man auch aus dem Ansatz einer extensible WLC durch das Anpassen von Gleichung (4.12) an den mittleren quadratischen End-zu-End-Abstand der Fibern. Allerdings stellte sich dabei heraus, dass diese Methode nicht sensitiv genug ist, um den Streckmodul abzuschätzen. Anpassungen mit ähnlichem χ^2 , bei denen die Persistenzlänge bis auf wenige Prozent übereinstimmten, variierten im Streckmodul über drei Größenordnungen.

4.3 Aufbau des Simulationsprogramms

Das Simulationsprogramm ist in der objektorientierten Programmiersprache C++ geschrieben. Dieser Ansatz ist im Vergleich zu einer C-Implementierung nicht nur übersichtlicher, sondern auch einfacher zu erweitern. Im folgenden Abschnitt gebe ich einen Überblick über den grundlegenden Aufbau des verwendeten Programms. Dieses lässt sich im Wesentlichen in fünf Bereiche gliedern: Datenstruktur, Simulationskontrolle, Monte Carlo Schritte, Energieberechnung und Hilfsbibliotheken. Eine detaillierte Dokumentation des Programms und dessen Struktur, ist in der Doktorarbeit von G. Wedemann zu finden [3]. Meine Modifikationen des Programms wurden so implementiert, dass die grundlegende Struktur des ursprünglichen Programms nicht verändert wurde.

Die Basis-Objekte im Programm zur Modellierung der Chromatinfiber sind die Nukleosomen- und DNS-Segmente. In einer objektorientierten Programmiersprache fasst ein Objekt verschiedene Datenelemente (Attribute) und die, auf diese anwendbaren, Operationen (Methoden) zusammen. Die Attribute und Methoden eines Objekts werden als Eigenschaften bezeichnet. Nukleosom- und DNS-Segmente haben Attribute wie z.B. Ortsvektor des Segments, lokales Koordinatensystem, Typ und Identifikationsnummer des Segments sowie vorher berechnete Größen, wie den Massenschwerpunkt. Auch eine Kopie der Werte, für den Fall einer Ablehnung nach einem Monte-Carlo-Schritt, ist als Eigenschaft enthalten. Weiterhin besitzen sie Methoden zur Verwaltung ihrer Attribute, z.B. Ein- und Ausleseroutinen.

Die Eigenschaften der Nukleosom- und DNS-Segmente werden von der übergeordneten Klasse *Bead* abgeleitet. Im Rahmen einer objektorientierten Programmiersprache ist eine Klasse eine statische Beschreibung gleichartiger Objekte, die deren Attribute und Methoden umfasst. Eine Klasse ist sozusagen die Anleitung zur Erzeugung eines Objekts während der Laufzeit (Instanzierung). Durch das Prinzip der Ableitung (Vererbung) ist es möglich, den Code für die übereinstimmenden Eigenschaften der Nukleosom-Segment und DNS-Segment nur einmal zu implementieren. Die Basisklasse *Beads* ist in einer doppelt verketteten Liste organisiert. Weiterhin ist es möglich Seitenketten einzufügen, allerdings wird dies im Rahmen dieser Arbeit nicht verwendet. Der Zugriff auf die Liste mit Seitenketten (Branched Linked List) erfolgt durch entsprechende Iteratoren

Der Ablauf des Programms wird von einer übergeordneten Klasse koordiniert, dem *Controller*. Hiervon abgeleitet sind die Klassen *SimController* und *AnaController*, die den Ablauf der Simulations- und Analyseprogramme organisieren. In den Auswertungsprogrammen wird eine von *SimController* abgeleitete Klasse verwendet. Dadurch stehen die wichtigsten Methoden wie z.B. das Einlesen der Daten bereits zur Verfügung, so dass lediglich der Analyse-Algorithmus zu programmieren ist.

Der Metropolis-Algorithmus ist als Basisklasse implementiert, von der sowohl eine Klasse für den Pivot-Schritt als auch den Rotations-Schritt abgeleitet ist. Dadurch unterscheiden sich die abgeleiteten Klassen nur in der Methode zur Berechnung der neuen Koordinaten. Grundsätzlich sind Objekteigenschaften nur den Objekten der eigenen Klasse oder abgeleiteten Klassen vorbehalten (Datenkapselung). Durch Schnittstellenmethoden können Objekte verschiedener Klassen jedoch miteinander interagieren und Nachrichten austauschen. Die Klasse der Rotations-Monte-Carlo-Schritte verwendet z.B. eine entsprechende Methode des Nukleosom-Segment-Objekts, um dessen Koordinaten zu verändern.

Die Energieberechnung wird entsprechend des Wechselwirkungstyps in verschiedene Klassen aufgeteilt. In diesen Energieklassen wird ein Iterator verwendet, um alle Interaktionen bzw. Paar-Interaktionen lokal zu berechnen und aufzusummieren. Diese lokale Energieauswertung wird in einer entsprechenden lokalen Energieklasse durchgeführt.

Allgemeine Funktionen und Objekte, die in anderen Projekten verwendet werden können, wie z.B. die Vektor-Klasse oder die Matrix-Klasse, sind in einer Hilfsbibliothek zusammengefasst. Darin befinden sich auch Fileformat-Routinen und verwendete globale Konstanten.

Das Profiling-Werkzeug *gprof* des gnu-Compilers *gcc* zeigt, dass ca. 92 % der Ausführungszeit auf die Berechnung der elektrostatischen und Nukleosom-Nukleosom-Energie entfällt. Um die Rechenzeit zu reduzieren, wurden diese Programmteile unter der Verwendung von *POSIX-Threads* parallelisiert. Hierzu werden die Segmente in gleichgroße Blöcke aufgeteilt. Für jeden Block wird ein *Thread* erzeugt, indem die Energien zwischen den einzelnen Segmenten innerhalb und zwischen den jeweiligen Blöcken berechnet werden. Der *Thread*-Ansatz ist speziell für Shared-Memory-Architekturen geeignet, bei denen die verschiedenen Prozessoren gleichberechtigt

auf einen gemeinsamen Datenspeicher zugreifen können. Ein entsprechendes Rechnernetz steht im DKFZ zur Verfügung und wird für die Simulationen in dieser Arbeit eingesetzt.

Die Beschleunigung eines parallelisierten Programms ergibt sich aus dem Quotient aus der Laufzeit T_1 für ein Prozessor und der Laufzeit T_N bei N verwendeten Prozessoren. Theoretisch lässt sie sich durch das Amdahl-Gesetz berechnen:

$$T_N = T_1 \left(1 - v + \frac{v}{N} \right), \quad (4.15)$$

wobei N die Anzahl der Prozessoren und v Laufzeit der parallelisierten Programmteile ist. Im Fall einer Simulationen von 100 Nukleosomen mit einem Dual-Xeon-Prozessor (2,8 GHz) ergibt sich eine Beschleunigung von 1,8 die sehr gut mit der theoretischen Beschleunigung übereinstimmt.

Kapitel 5

Ergebnisse und Diskussion

5.1 In silicio Streckung von Chromatin

Um die Abhängigkeit der globalen Steifigkeit der Chromatinfiber von der verwendeten Geometrie der Kette zu untersuchen, variierte ich die Länge der Linker-DNS l , den Torsionswinkel aufeinander folgender Nukleosomen β und den Öffnungswinkel α . Bereits in früheren Simulationen zeigte sich, dass diese Parameter Einfluss auf die Massenbelegungsichte der Fiber nehmen [168]. Die Wahl des Torsionswinkels β im Bereich zwischen 90° und 130° stimmt mit experimentellen Massenbelegungsichten im Bereich von 6 Nukleosomen / 11nm überein [9, 93]. Motiviert durch die natürlichen Nukleosomen-Abstände in Hefe- und HeLa-Zellen, konzentrierte ich mich zunächst auf Repeatlängen zwischen 195 - 205 bp [11]. Dies entspricht Linker-DNS im Bereich von 5 - 15 bp. Da die Anknüpfung der Linker-DNS an das Nukleosom mit der kleinen Furche in Richtung der ersten nukleosomalen Bindungsstelle erfolgt, ist der Torsionswinkel β eine periodische Funktion der Linkerlänge [7, 182]: Eine helikale Windung der doppelsträngigen DNS entspricht 10,5 bp [6]. Zur genaueren Analyse der Parameterabhängigkeiten wurde der Torsionswinkel β zunächst unabhängig von der Repeatlänge variiert.

Eine Zusammenfassung der Initialisierungsparameter zeigt Tabelle 5.1. Abbildung 4.2 in Kapitel 4 veranschaulicht den Ablauf einer typischen Simulation: Ausgehend von einer gedrehten oder gestreckten Startkonformation (Abb. 4.2a,b), wird das System zunächst äquilibriert. Danach wird eine Streckkraft auf die relaxierte Konformation angewendet (Abb. 4.2c) und anschließend erneut äquilibriert, wodurch die gestreckten Gleichgewichtsstrukturen erzeugt werden (Abb. 4.2d,e).

Tabelle. 5.1. Übersicht der in der Simulation verwendeten Parameter.

Parameter	Wert
Streckmodul DNS	1104 pN
Biegemodul DNS	$2.06 \cdot 10^{-19}$ J nm
Torsionsmodul DNS	$2.67 \cdot 10^{-19}$ J nm
Elektrostatistischer Radius DNS	1.2 nm
Streckmodul Nukleosom	1104 pN
Torsionsmodul Nukleosom	$1.30 \cdot 10^{-19}$ J nm
Temperatur	20 °C
Salzkonzentration	0.1 M NaCl
Nukleosom-Durchmesser	11 nm
Nukleosom-Höhe	5.5 nm
Gay-Berne-Parameter für die internukleosomale Wechselwirkung	$\sigma_0 = 10.3$ nm, $\chi = -0.506$, $\chi' = -0.383$

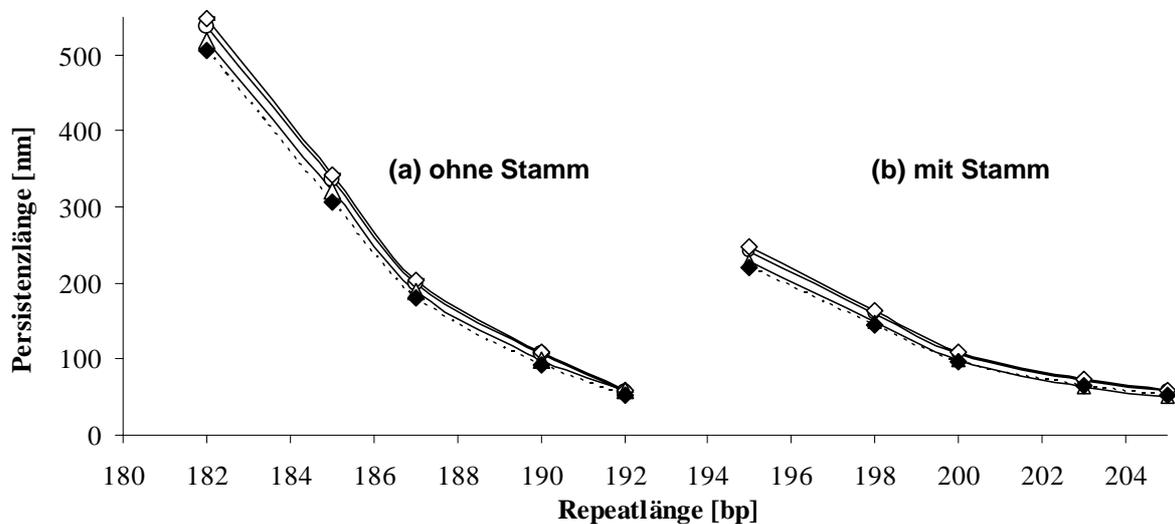


Abb. 5.1.1. Persistenzlänge L_p bestimmt mit Hilfe der Fluktuation der Tangentenwinkel (A1, offene Symbole, durchgezogene Linien) und aus den Fluktuationen des mittleren quadratischen End-zu-End-Abstands (A2, geschlossene Symbole, gestrichelte Linien) als Funktion verschiedener Linkerlängen l und Torsionswinkel β ohne (a) und mit (b) Stamm. Alle Methoden lassen die gleiche generelle Tendenz erkennen: Mit steigender Linkerlänge bzw. fallendem Torsionswinkel nimmt die Persistenzlänge ab und die Fiber lässt sich einfacher biegen. Die Werte der extensible WLC (A2, Gl. (4.10)) weichen gegenüber den Werten aus den anderen Methoden um weniger als 10 % ab.

○: A2, inextensible WLC durch numerische Lösung von (4.11);

◇: A2, inextensible WLC durch Anpassung von (4.11);

△: A2, extensible WLC durch Anpassung von (4.12);

●: A1, Anpassung des exponentiellen Zerfalls von (4.9)

5.1.1 Biegesteifigkeit der Fiber: Die Persistenzlänge L_p

Ich bestimmte die Persistenzlänge L_p der Biegung für verschiedene Repeatlängen und Torsionswinkel β bei einem Öffnungswinkel $\alpha_{\text{init}} = 26^\circ$ durch die Fluktuation der Tangentenwinkel (A1) sowie aus dem mittleren quadratischen End-zu-End-Abstand (A2). Abbildungen 5.1.1a und 5.1.1b vergleichen die Ergebnisse dieser beiden Analysemethoden für Simulationen mit und ohne Stamm.

Die Methode, welche auf der Fluktuation der Tangentenwinkel basiert, führt systematisch zu etwas niedrigeren Werten für die Persistenzlänge L_p . Anhand einer typischen Kurvenanpassung an die Daten (Abb. 5.1.2) wird deutlich, dass die angepasste Kurve systematisch kleinere Korrelationslängen als die Datenkurve aufweist. Für kurze Konturlängen sind die Segmente zu lang, um den exponentiellen Zerfall durch die

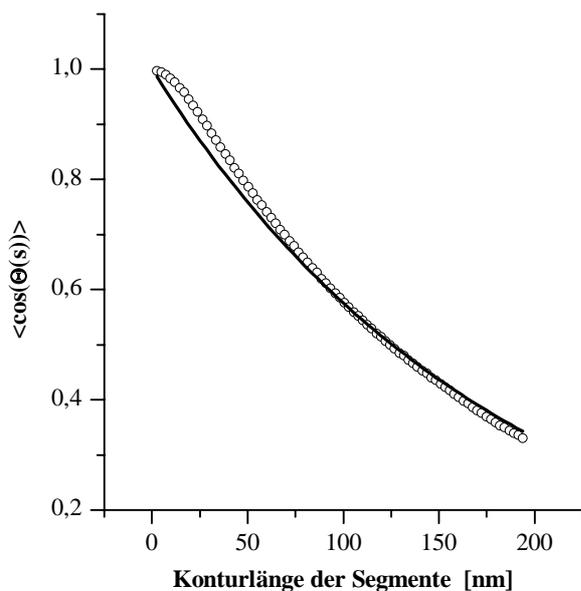


Abb. 5.1.2. Anpassung von Gl. (4.9), welche den exponentiellen Zerfall der Tangentenwinkel beschreibt, an die Daten einer aus 100 Nukleosomen bestehenden Chromatinfiber mit $l = 187$ bp, $\beta = 110^\circ$, kein Stamm. Für die ersten Datenpunkte sind die Segmente im Vergleich zur Konturlänge zu lang und somit die Korrelation unrealistisch hoch. Diese Punkte wurden aus der Anpassung ausgeschlossen. An der angepassten Kurve ist zu erkennen, dass die Korrelationslänge etwas geringer ausfällt, als man von der Datenkurve erwarten würde.

○: 187 bp, $\beta = 110^\circ$, kein Stamm;
—: A1, Anpassung des exponentiellen Zerfalls von Gl. (4.9)

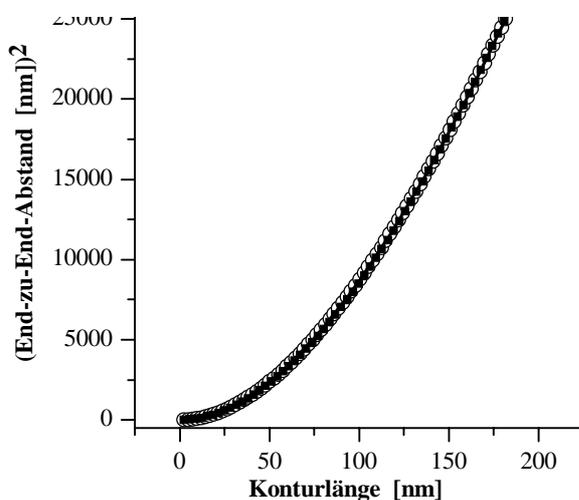


Abb. 5.1.3. Anpassung der Porod-Kratky-Gl. (4.9) des inextensible WLC sowie der Gl. (4.10) des extensible WLC an die Daten einer aus 100 Nukleosomen bestehenden Chromatinkette mit $l = 187$, $\beta = 110^\circ$, kein Stamm. Beide Anpassungen stimmen sehr gut mit den Daten überein. Das χ^2 für die extensible WLC ist durch die realistischere Beschreibung der Fiber etwas geringer als bei der inextensible WLC.

○: 187 bp, $\beta = 110^\circ$, kein Stamm;
●: extensible WLC, Gl. (4.10);
—: inextensible WLC, Gl. (4.9)

WLC wiederzuspiegeln (Plateau in Abb. 5.1.2). Aus diesem Grund wurden die ersten 20 Datenpunkte aus der Kurvenanpassung ausgeschlossen. Die Anpassung von Gleichung (4.9) führt somit zu ca. 6% (3%) kleineren Persistenzlängen L_p für Simulationen mit (ohne) Stamm.

Die Werte für die Persistenzlänge L_p aus der Anpassung der extensible WLC an den mittleren quadratischen End-zu-End-Abstand als Funktion der Konturlänge (A_2) sind systematisch 10% (8%) kleiner als die Werte aus der Anpassung der inextensible WLC mit (ohne) Stamm. Gegenüber der numerischen Lösung von Gleichung (4.11) sind die Werte systematisch 5% (3%) kleiner. Die extensible WLC (Gleichung 4.12) beschreibt die Flexibilität der Fiber realistischer als die inextensible WLC (Gleichung 4.11). Ihr zusätzlicher Term ermöglicht eine Verschiebung des angepassten Graphs entlang der y-Achse, wodurch das χ^2 reduziert und die Qualität der Kurvenanpassung verbessert wird. Das Resultat ist eine etwas weichere Fiber für die extensible WLC, was sich in geringfügig kleineren Persistenzlängen zeigt (Abb. 5.1.3). Diese stimmen gut mit den Werten überein, die sich aus der Methode der Fluktuationen der Tangentenwinkel (A_1) ergeben. Der relative Fehler ist dabei kleiner als 5% (3%) für Simulationen mit (ohne) Stamm.

Alle angewendeten Methoden zeigen die gleichen Tendenzen für Simulationen mit und ohne Stamm (Abb. 5.1.1). Eine größere Repeatlänge reduziert die Persistenzlänge L_p und führt zu weicheren Fibern. Dagegen sind Fibern mit höherem Torsionswinkel β aufgrund der steigenden Persistenzlänge L_p steifer und somit schwieriger zu biegen.

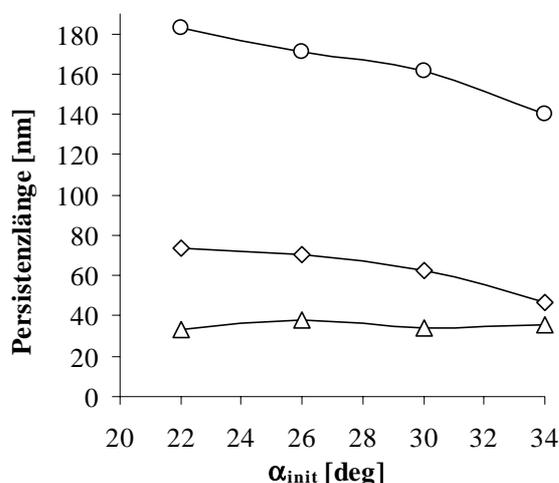


Abb. 5.1.4. Die Persistenzlänge für verschiedene Repeatlängen und Torsionswinkel als Funktion des initialen Öffnungswinkels α_{init} . Eine Vergrößerung dieses Öffnungswinkels führt zu einem Abfall der Persistenzlänge und damit zu weicheren Fibern. Dieser Trend ist stärker für kurze Repeatlängen, bei denen die elektrostatischen und nukleosomalen Wechselwirkungen stärker sind als bei langen.

○ : $l = 188$ bp, $\beta = 110^\circ$, kein Stamm;

◇ : $l = 192$ bp, $\beta = 120^\circ$, kein Stamm;

△ : $l = 199$ bp, $\beta = 110^\circ$, kein Stamm.

In der weiteren Analyse verwendete ich die Ergebnisse aus der Anpassung der extensible WLC mit Hilfe von Gleichung 4.10 aus Methode A2, welche mit allen anderen Methoden innerhalb einer Abweichung von weniger als 10% übereinstimmt.

Abbildung 5.1.4 zeigt die Abhängigkeit der Persistenzlänge L_p vom Initialwert des Öffnungswinkels α_{init} im Bereich zwischen 22° und 34° für verschiedene Repeatlängen und Torsionswinkel. Der Öffnungswinkel α_{eff} im Gleichgewicht hängt monoton von Initialwert α_{init} ab, wie bereits in Abbildung 4.1 deutlich wurde. Abbildung 5.1.4 zeigt, dass ein steigender Öffnungswinkel zu einer fallenden Persistenzlänge und damit zu weicheren Fibern führt. Dieser Trend ist für kurze Repeatlängen stärker, während für lange Repeatlängen die Biegesteifigkeit nahezu konstant bleibt. Dieses Verhalten ist zu erwarten, da bei Fibern mit kurzen Repeatlängen die Nukleosomen dichter positioniert sind und somit die elektrostatischen und nukleosomalen Wechselwirkungen einen stärkeren Einfluss besitzen.

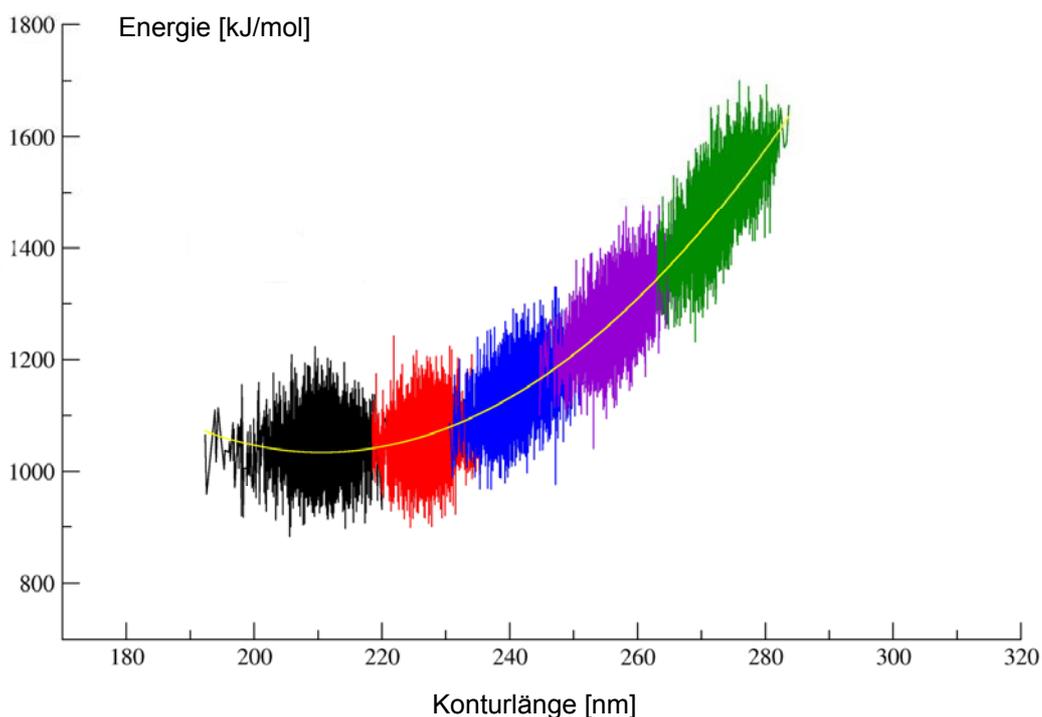


Abb. 5.1.5. Gesamtenergie einer 100 Nukleosomen Chromatinkette mit einer Repeatlänge $l = 190$ bp, $\beta = 110^\circ$, kein Stamm, als Funktion der Konturlänge. Die Kraftkonstante D ergibt sich aus einer Anpassung der energetischen Form des Hooke'schen Gesetzes $E = 0,5 \cdot D (L-L_0)^2 + \text{const}$ an die Daten.

— : 0 pN ; — : 5 pN ; — : 10 pN ; — : 15 pN ; — : 20 pN

5.1.2 Entropische Beiträge

Zur Bestimmung der Kraftkonstante D , mit deren Hilfe der Streckmodul ε nach Methode B2 berechnet werden kann, wurde die energetische Form des Hooke'schen Gesetzes an die Energie-Extensions-Kurve angepasst (Abb. 5.1.5). Dabei ist sicherzustellen, dass die Gesamt- oder freie Energie, welche sowohl den energetischen als auch den entropischen Teil beinhaltet, mit der potentiellen Energie übereinstimmt und die entropischen Effekte vernachlässigt werden können.

Aus diesem Grund wurde zunächst die angewendete Streckkraft gegen den End-zu-End-Abstand der gestreckten Chromatinfiber aufgetragen. Die Daten zeigen deutlich ein lineares Verhalten für den intermediären Kraftbereich (Abb. 5.1.6a).

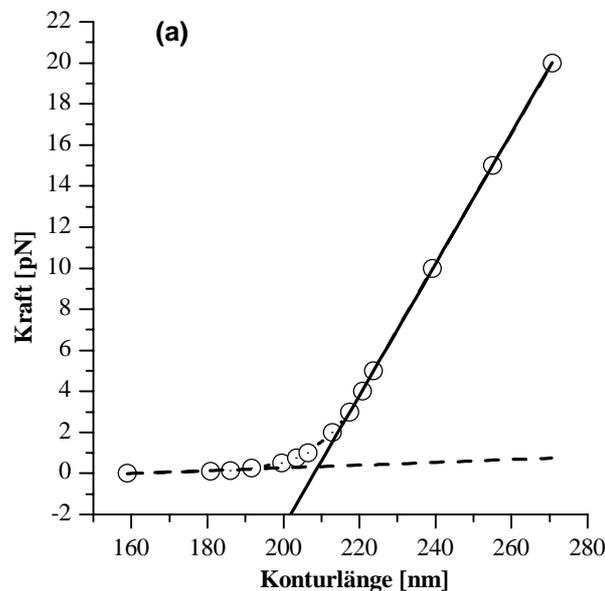
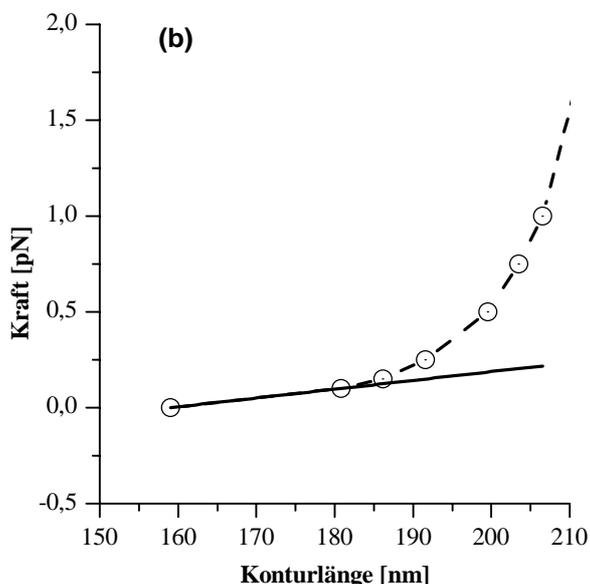


Abb. 5.1.6. (a) zeigt die Streckkraft als Funktion des End-zu-End-Abstands einer 100 Nukleosomen Chromatinfiber mit $l = 190$ bp und $\beta = 110^\circ$, kein Stamm. Das lineare Verhalten im mittleren Kraftbereich impliziert, dass der entropische Beitrag im Bereich zwischen 5 – 20 pN vernachlässigt werden kann. Im unteren Kraftbereich dagegen zeigt sich aufgrund des entropischen Energieanteils kein lineares Verhalten. Dies konnte kürzlich auch in Streckexperimenten beobachtet werden. Für Kräfte kleiner als 0,5 pN lässt sich in erster Ordnung ein lineares Verhalten erkennen.



(b) vergrößert diesen Kraftbereiches zwischen 0 – 0,5 pN und erlaubt ein Streckmodul für diesen Bereich abzuschätzen. Der Wert von $\varepsilon = 0,73$ pN für diesen entropisch dominierten Kraftbereich beträgt nur 2% des Streckmoduls für die intermediäre Kraftregion.

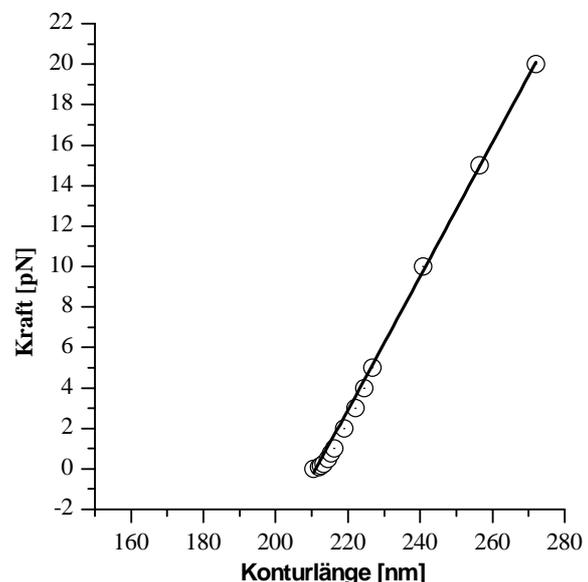
Hierdurch wird impliziert, dass der entropische Anteil in diesem Kraftregime keine Rolle spielt.

Weiterhin wird in Abbildung 5.1.6 deutlich, dass das Verhalten der Chromatinfiber für den Kraftbereich kleiner als 5 pN nicht linear ist. Dies stimmt mit Beobachtungen aus Streckexperimenten [128] überein. Für Kräfte, die kleiner als 0,5 pN sind, wird der Streckmodul ε von der Entropie dominiert. Er lässt sich in erster Ordnung durch eine lineare Anpassung approximieren (Abb. 5.1.6b). Da ich hauptsächlich an dem intermediären Bereich interessiert bin, gebe ich nur den Wert für den in Abbildung 5.1.6b dargestellten Parametersatz an: $\varepsilon = 0,73$ pN. Dieser Wert beträgt weniger als 2% des Streckmoduls für Kräfte größer als 5 pN und zeigt, dass entropische Anteile im intermediären Kraftbereich vernachlässigt werden können.

Weiterhin berechnete ich den Streckmodul durch die Anpassung einer linearen Funktion $F = \frac{\varepsilon}{L_0} \cdot L - \varepsilon$ an die Kraft-Extensions-Kurve (Abb. 5.1.7).

Da diese Funktion über ein Integral mit der Methode B1 verbunden ist, wird auch hier der entropische Anteil vernachlässigt. In den Abbildungen 5.1.8a und 5.1.8b werden diese Ergebnisse mit dem Streckmodul verglichen, welches mit Hilfe des Äquipartitionstheorems (B2) bestimmt wurde. Letzteres beinhaltet sowohl den energetischen als auch den entropischen Anteil der Energie. Die mittlere Abweichung der Werte ist kleiner als 10% (13%) für Simulationen ohne bzw. mit Stamm und zeigt ebenfalls, dass der entropische Anteil vernachlässigt werden kann.

Abb. 5.1.7. Kraft-Extensions-Kurve einer 100 Nukleosomen langen Chromatinkette mit $l = 190$ bp, $\beta = 110^\circ$, kein Stamm. Der Streckmodul ε wird durch eine Kurvenanpassung von $F = (\varepsilon / L_0) \cdot L - \varepsilon$ an die Daten im Kraftbereich 5 – 20 pN berechnet und stimmt mit den Werten aus Abbildung 5.1.6a überein.



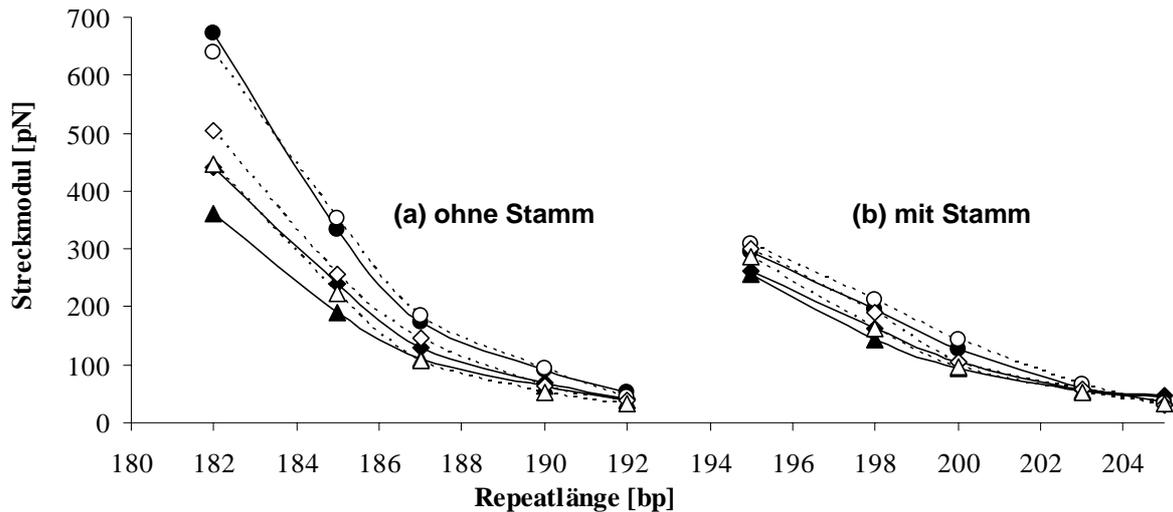


Abb. 5.1.8. Streckmodul ε für Simulationen ohne (a) und mit (b) Stamm als Funktion der Repeatlänge l und des Torsionswinkels β . Die Berechnung erfolgte einerseits aus einer linearen Kurvenanpassung an die Kraft-Ausdehnungskurve (geschlossene Symbole, durchgezogene Linien), andererseits unter Verwendung des Äquipartitionstheorem (offene Symbole, gestrichelte Linien). Beide Methoden stimmen gut überein und zeigen, dass entropische Anteile in dieser Region vernachlässigt werden können. \circ, \bullet : $\beta = 130^\circ$; \diamond, \blacklozenge : $\beta = 110^\circ$; $\triangle, \blacktriangle$: $\beta = 90^\circ$;

5.1.3 Strecksteifigkeit der Fiber: Der Streckmodul ε

In Abbildungen 5.1.9 sind die Ergebnisse der Methode B1, welche das Hooke'sche Gesetz verwendet, und der Methode B2, die auf dem Äquipartitionstheorem beruht, dargestellt. Beide Methoden stimmen gut überein, außer bei hohen Torsionswinkeln und kleinen Repeatlängen. Indem die Streckmodule ε in Methode B2 für alle Strecksimulationen (0, 5, 10, 15 und 20 pN) bestimmt und anschließend gemittelt wurden, konnte die Genauigkeit erhöht und die relative Differenz zwischen beiden Methoden auf 18% (8%) für Simulationen mit (ohne) Stamm reduziert werden (Abb. 5.1.9). Trotz der Differenz in den absoluten Werten für den Streckmodul bei hohen Torsionswinkel und kleinen Repeatlängen, weisen beide Methoden die gleichen Tendenzen auf. Dies gilt sowohl für Simulationen mit als auch ohne Stamm. Ein analoges Verhalten wurde bereits für die Persistenzlänge in Abschnitt 5.1.1 beschrieben. Bei steigender Repeatlänge oder steigendem Öffnungswinkel α nimmt der Streckmodul ab und die Fiber wird weicher. Eine Erhöhung des Torsionswinkels β führt zu einem Anstieg des Streckmoduls, wodurch die Fiber steifer und schwerer dehnbar wird.

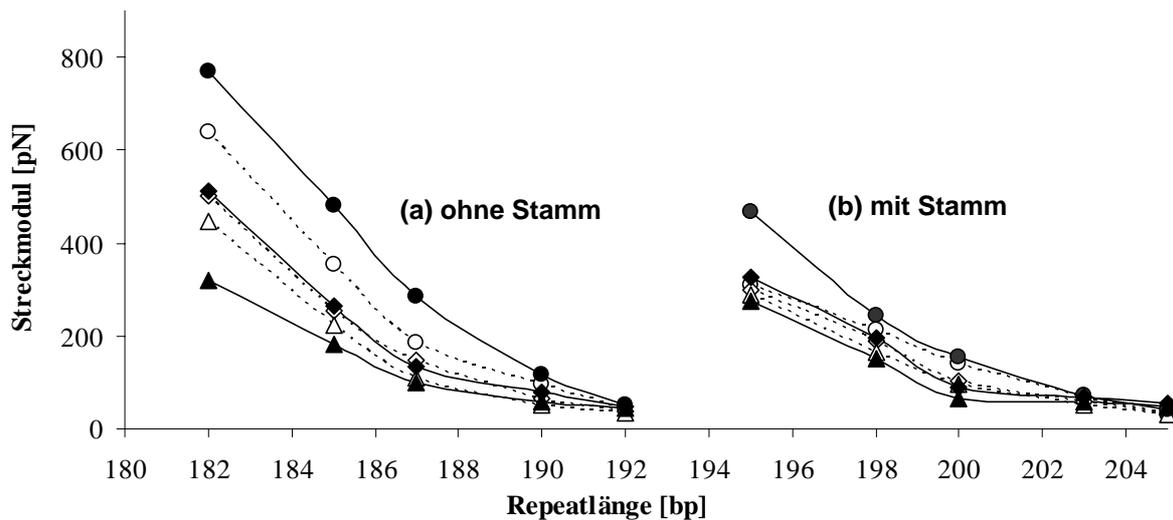


Abb. 5.1.9. Streckmodul ϵ bestimmt durch Anpassung des Hooke'schen Gesetzes (B1, geschlossene Symbole, durchgezogene Linien) und mit Hilfe des Äquipartitionstheorems (B2, offene Symbole, gestrichelte Linien). Für Simulationen ohne (a) und mit (b) Stamm als Funktion der Repeatlänge l und des Torsionswinkels β . Beide Methoden stimmen gut überein, abgesehen von kurzen Repeatlängen und hohen Torsionswinkeln. Unabhängig von der Präsenz eines Stamms nimmt der Streckmodul ϵ der Fiber mit steigender Repeatlänge bzw. fallendem Torsionswinkel β ab.

○, ●: $\beta = 130^\circ$; ◇, ◆: $\beta = 110^\circ$; △, ▲: $\beta = 90^\circ$

5.1.4 Wie steif ist die 30-nm-Chromatinfiber?

Sowohl Streck- als auch Biegesteifigkeit der simulierten Chromatinfibern zeigen ein ähnliches Verhalten: Die Steifigkeit wird größer, wenn der Torsionswinkel steigt und die Repeatlänge sinkt.

Um den Zusammenhang zwischen Biege- und Strecksteifigkeit im Fall der Chromatinfiber genauer zu beschreiben, vergleiche ich in diesem Abschnitt die Steifigkeit der Chromatinfiber mit einem typischen, homogenen, isotropen, elastischen Stab, der eine kreisförmige Querschnittsfläche besitzt.

Basierend auf dieser Annahme lässt sich eine Persistenzlänge L_p aus dem, bereits in den Simulationen bestimmten, Streckmodul ϵ wie folgt berechnen.

Die Biegung zweier Segmente einer Polymerkette um einen Winkel θ , welche eine Distanz L von einander entfernt sind, erfordert die Energie [183]

$$E_{\text{Biege}} = \frac{1}{2} \frac{Y \cdot J}{L} \cdot \theta^2, \quad (5.1)$$

Wobei Y der Young Modul und J das Flächenträgheitsmoment des Polymers ist.

Diese makroskopischen Größen hängen mit der Persistenzlänge L_p eines Polymers über

$$L_p = \frac{Y \cdot J}{k_B T} \quad (5.2)$$

zusammen, wobei k_B die Boltzmann-Konstante und T die Temperatur ist.

Löst man das Hooke'sche Gesetz (4.13) nach Y auf und substituiert es in Gleichung (5.2) so erhält man

$$L_p = \frac{1}{k_B T} \frac{D \cdot L_0}{A} \cdot J = \frac{1}{k_B T} \frac{\varepsilon}{A} \cdot J, \quad (5.3)$$

mit $\varepsilon = D \cdot L_0$. Setzt man nun das Flächenträgheitsmoment eines homogenen, isotropischen, elastischen Zylinders mit Radius R

$$J = \frac{1}{4} \pi R^4, \quad (5.4)$$

in (5.3) ein, so ergibt sich schließlich für die Persistenzlänge L_p der Ausdruck

$$L_p = \frac{1}{4} \frac{\varepsilon}{k_B T} R^2. \quad (5.5)$$

Aus dem Streckmodul ε lässt sich also unter der der Annahme, dass sich die Chromatinfiber wie ein homogener, isotroper, elastischer Zylinder verhält, eine Persistenzlänge $L_{p,Stab}$ berechnen. Diese vergleiche ich nun mit der Persistenzlänge $L_{p,Fluk}$, welche unmittelbar aus den Biegefluktuationen in Abschnitt 5.1.1 bestimmt wurde. Die Resultate sind in den Abbildungen 5.1.10a-d dargestellt und zeigen eindeutig, dass die Persistenzlängen $L_{p,Stab}$ 6-10-mal höher sind als die Persistenzlängen $L_{p,Fluk}$. Dies gilt für alle Parametersätze, sowohl für Simulationen mit als auch ohne Stamm. Demzufolge entspricht das elastische Verhalten der Chromatinfiber nicht einem homogenen, isotropen, elastischen Zylinder sondern eher einem Telefonkabel. Sie ist wesentlich leichter zu biegen als man von einem elastischen Stab erwarten kann: Ihre Strecksteifigkeit ist höher als ihre Biegesteifigkeit. Einzelmolekül-Experimente zeigen, dass sich dies bei freier DNS anders verhält: Streck- und Biegesteifigkeit stimmen nahezu überein [184].

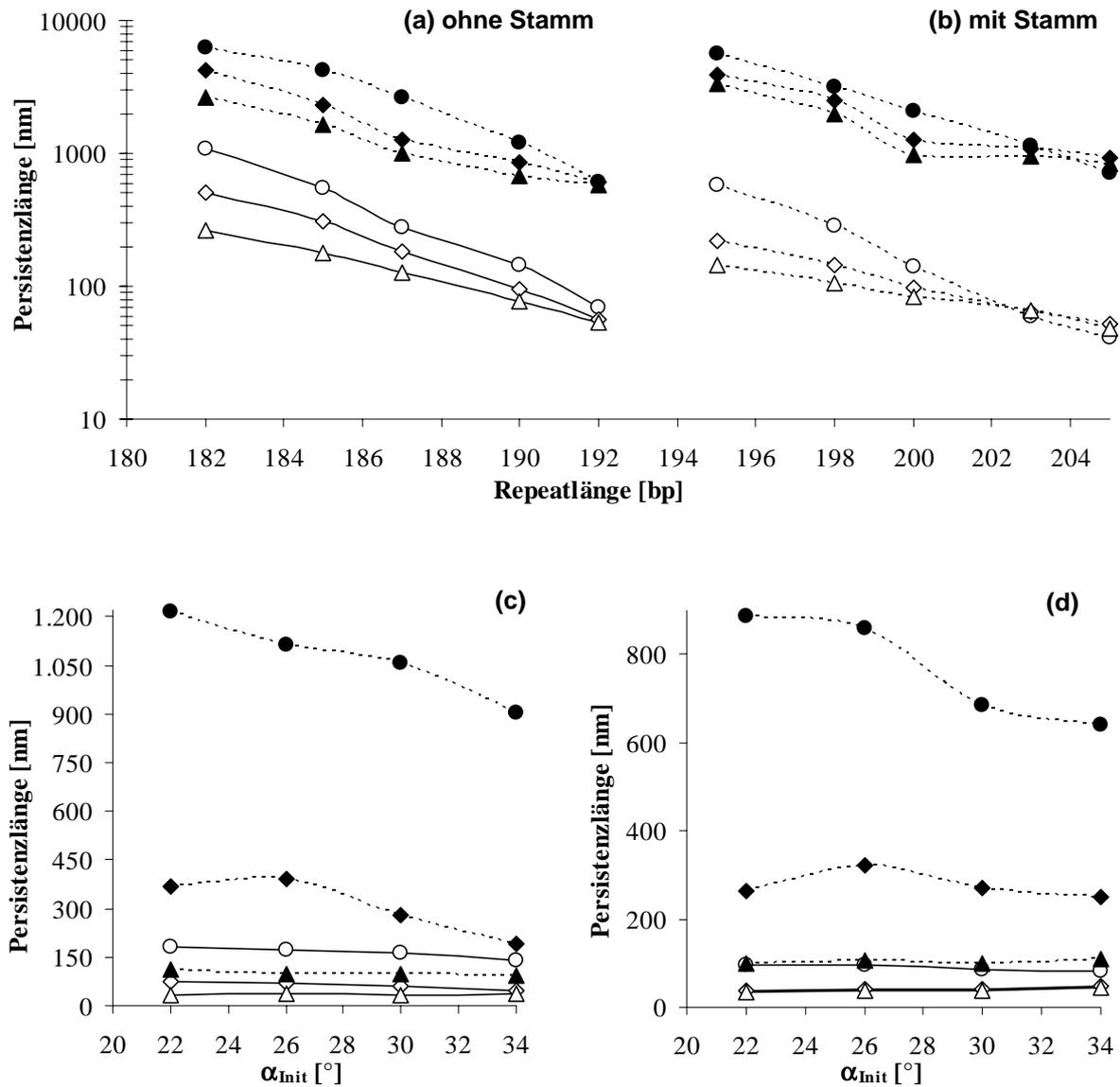


Abb. 5.1.10. Darstellung der Persistenzlänge für verschiedene Repeatlängen l und Torsionswinkel β . Die durchgezogenen Linien repräsentieren die Persistenzlängen $L_{p,\text{Fluk}}$, welche unmittelbar aus der Fluktuation der Tangentenwinkel berechnet wurden (A1, offene Symbole, durchgezogene Linien). Die gestrichelten Linien stehen für die Persistenzlängen $L_{p,\text{Stab}}$, welche aus dem Streckmodul berechnet wurden, unter der Annahme, dass sich die Fiber wie ein isotroper, homogener, elastischer Stab mit kreisförmigen Querschnitt verhält (B1, geschlossene Symbole, gestrichelte Linie). $L_{p,\text{Fluk}}$ ist 6-10 mal größer als $L_{p,\text{Stab}}$ für Simulationen mit (a), (c) und ohne (b), (d) Stamm. Dies bedeutet, dass die Chromatinfiber wesentlich leichter zu biegen ist, als es von einem elastischen Stab zu erwarten wäre.

Symbole (a),(b): \circ, \bullet : $\beta = 130^\circ$; \diamond, \blacklozenge : $\beta = 110^\circ$; $\triangle, \blacktriangle$: $\beta = 90^\circ$

Symbole (c): \circ, \bullet : $l = 188$ bp, $\beta = 110^\circ$; \diamond, \blacklozenge : $l = 192$ bp, $\beta = 120^\circ$; $\triangle, \blacktriangle$: $l = 199$ bp, $\beta = 110^\circ$;

Symbole (d): \circ, \bullet : $l = 201$ bp, $\beta = 110^\circ$; \diamond, \blacklozenge : $l = 205$ bp, $\beta = 120^\circ$; $\triangle, \blacktriangle$: $l = 212$ bp, $\beta = 110^\circ$;

5.1.5 Effekt des Nukleosom-Stamms

Zur Untersuchung des Einflusses des Linker-Histons auf die Persistenzlänge L_p der Chromatinfiber wurden Simulationen mit und ohne Stamm bei gleichen Repeatlängen durchgeführt und verglichen. Bei diesen Simulationen wurde der Torsionswinkel β entsprechend experimenteller Daten der Repeatlänge angepasst [7, 182]: Eine helikale Windung der doppelsträngigen DNS entspricht einer Länge von 10,5 bp. Die Abbildungen 5.1.11 zeigt die Ergebnisse dieser Simulationen für Repeatlängen in dem Bereich 191 – 220 bp.

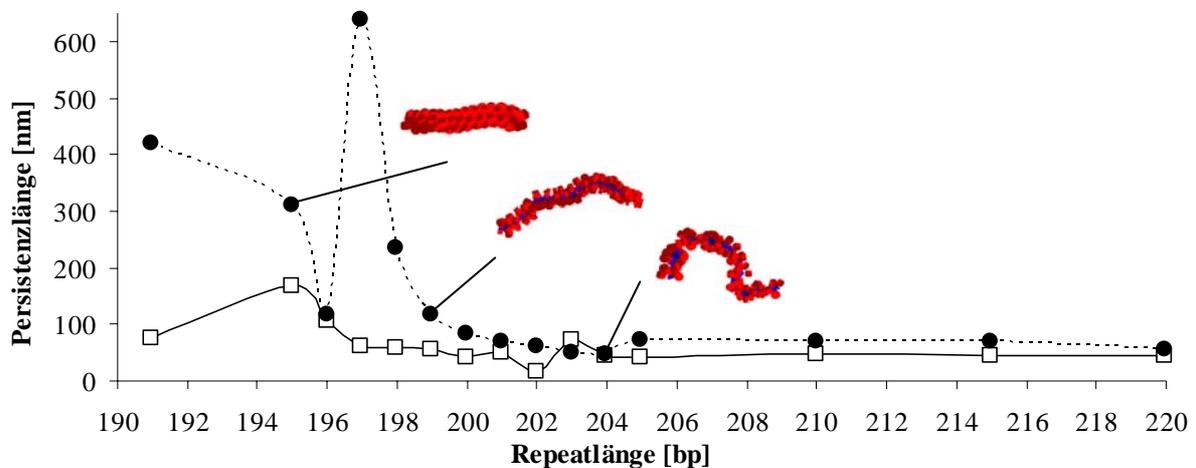


Abb. 5.1.11. Analyse des Einflusses eines vorhandenen Stamms für Simulationen mit gleicher Repeatlänge l . Für diese Simulationen wurde der Torsionswinkel β entsprechend der Linkerlänge angepasst: Eine helikale Windung der *ds*DNS entspricht einer Länge von 10,5 bp. Die Persistenzlängen der Fibern mit Stamm (●) sind höher als für die Fibern ohne Stamm (□). Dieser Effekt ist stärker für kurze und schwächer für große Repeatlängen. Die Spitzen zeigen, dass der Torsionswinkel stark die Steifigkeit beeinflusst und somit zu steifern Fibern führen kann. Aufgrund der höheren Repeatlänge wäre eigentlich eine weichere Fiber zu erwarten. Die typischen Fiberkonformationen verdeutlichen die höhere Flexibilität der Fiber bei hohen Repeatlängen.

Alle Simulationen weisen die gleiche generelle Tendenz auf: Die Persistenzlänge nimmt mit steigender Repeatlänge ab und die Fiber wird weicher. Dies stimmt mit den Resultaten überein, welche bereits den Abbildungen 5.1.10a und 5.1.10b entnommen werden konnten, sofern der Torsionswinkel als konstant betrachtet wird. Diese Tendenz ist für kurze Repeatlängen stärker ausgeprägt, da in diesen Fällen die elektrostatischen und nukleosomalen Kräfte besonders stark sind. Allerdings zeigen die Spitzen in Abbildung 5.1.11, dass das „Weicherwerden“ der Fiber aufgrund längerer Repeatlängen durch hohe Torsionswinkel überwunden werden kann. Dadurch kommt es zu steifern Fibern als es vorher in Abbildung 5.1.10a und 5.1.10b

der Fall war. Dieser Effekt dominiert nur bei kurzen Repeatlängen, da die Wechselwirkungen bei größeren Repeatlängen schwächer werden. Die Existenz solcher Spitzen könnte ein Grund dafür sein, dass in Organismen bestimmte Repeatlängen bevorzugt auftreten. Geometrische Chromatinfibermodelle, die auf der Kristallstruktur des Nukleosoms basieren und explizit die sterische Behinderung berücksichtigen, implizieren ebenfalls solche bevorzugten Repeatlängen (vgl. 5.3). Abbildung 5.1.11 zeigt deutlich, dass die Biegesteifigkeit von Fibern mit Stamm höher als die Biegesteifigkeit von Fibern ohne Stamm ist. Allerdings werden die Unterschiede bei höheren Repeatlängen kleiner. Dies weist auf die stabilisierende Rolle des Nukleosom-Stamms hin, wie bereits in Experimenten beobachtet wurde [81].

5.1.6 Diskussion

Meine Ergebnisse zeigen, dass die Biege- und Strecksteifigkeit der 30-nm-Chromatinfiber stark von der lokalen Geometrie der Nukleosomen abhängt. Sowohl die Persistenzlänge L_p , welche die Biegesteifigkeit charakterisiert, als auch der Streckmodul ε , der die Strecksteifigkeit beschreibt, nehmen ab, wenn die Repeatlänge im untersuchten Bereich um 10 bp erhöht wird. Den gleichen Effekt hat eine Steigerung des Öffnungswinkels von 22° auf 34° oder eine Reduzierung des Torsionswinkels von 130° auf 90° . Dieses Verhalten ist unabhängig von der Präsenz eines Stamm-Motivs, welches den Einfluss des Linker-Histons auf die Nukleosomen-Geometrie modelliert. Es ist bereits bekannt, dass die Anwesenheit eines Linker-Histons den Öffnungswinkel α zwischen eingehender und austretender Linker-DNS verringert. Dies führt bei hohen Salzkonzentrationen zu kompakteren Fiberstrukturen [81]. Auch meine Simulationsergebnisse zeigen: Fibern mit Stamm weisen eine höhere Persistenzlänge auf als die entsprechenden Fibern ohne Stamm und sind somit steifer bzw. kompakter (Abb. 5.1.11a und 5.1.11b).

Das zentrale Ergebnis meiner Simulationen beruht auf dem Vergleich der Strecksteifigkeit einer Chromatinfiber mit ihrer Biegesteifigkeit. Unter der Annahme eines homogenen, isotropen, elastischen Stabs mit kreisförmigem Querschnitt konnte ich zeigen, dass die Chromatinfiber bei ihrer Dehnung wesentlich mehr Widerstand leistet als bei ihrer Biegung. Diese Eigenschaft ist eine wichtige Voraussetzung, um ihre Kondensation und Dekondensation zu ermöglichen und somit z.B. das Binden von

Transkriptionsfaktoren zu regulieren. Betrachtet man mein Resultat von einem höheren Standpunkt der Kompaktierung aus, so ist es für eine Chromatinfiber günstiger, eine dichtere Packung mit Hilfe von Schleifen zu erreichen anstatt linear komprimiert zu werden. Die Formation solcher Haarnadelstrukturen wurde bereits in Cryo-EM-Bildern unter der Präsenz von MENT (myeloid and erythroid nuclear termination stage-specific protein) beobachtet [185]. Dabei handelt es sich um ein Heterochromatinprotein, welches Chromatinfiberfaltungen der höheren Ordnung vermittelt. Einige Haarnadel-Formationen konnten auch in meinen Simulationen beobachtet werden.

Betrachtet man den Zusammenhang zwischen Biege- und Streckelastizität, so zeigt sich in Einzelmolekül-Streckexperimenten [184], dass sich das Verhalten von *dsDNS* und Chromatinfiber unterscheiden:

Der Streckmodul ϵ von *dsDNS* bei physiologischer Salzkonzentration beträgt ca. 1100 pN [154, 186]. Anwendung der Gleichung (5.5) unter der Annahme eines homogenen, isotropen, elastischen Stabs mit einem Radius von 1 nm für die *dsDNS* führt zu einer Persistenzlänge der Biegung von $L_p = 70$ nm. Diese ist ungefähr 1,4-mal so groß wie die bekannte Persistenzlänge der *dsDNS* von 53 nm. Da es sich bei der *dsDNS* nicht um einen idealen, isotropen Zylinder handelt und die DNS-Furchen das Flächenträgheitsmoment etwas reduzieren, kann der tatsächliche effektive Radius etwas kleiner sein. Bereits eine Verminderung des Radius um 20% führt zu einer Übereinstimmung der beiden Persistenzlängen, d.h. *dsDNS* besitzt nahezu die gleiche Resistenz gegenüber ihrer Dehnung und ihrer Biegung. Bei der Chromatinfiber ist die Differenz mindestens viermal so groß (Abb. 5.1.10). Bedenkt man die Rolle von Chromatin, so ist dieses Verhalten im biologischen Sinn durchaus sinnvoll, da sich die Chromatinfiber durch einfache Biegung und Torsion für Proteine öffnen und schließen lässt.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, ist der exakte Wert für die Persistenzlänge der 30-nm-Chromatinfiber hart umstritten, wobei Werte im Bereich 30 nm bis 260 nm bestimmt wurden. Einige der Werte aus dem unteren Bereich wurden bei niedriger Salzkonzentration gemessen. Da niedrige Salzkonzentrationen bekannter Weise zu einer Öffnung der Fiber führen, sind diese Werte erwartungsgemäß verschieden von

Tabelle. 5.2. Persistenzlänge $L_{p, A1}$ berechnet aus den Fluktuationen der Tangentenwinkel ($A1$) für verschiedene Repeatlängen und Torsionswinkel.

Persistenzlänge [nm]			
$\alpha_{init} = 26^\circ$, kein Stamm			
l_{rep} [bp] \ β [°]	90	110	130
182	261	508	1090
185	177	309	547
187	126	183	280
190	76	96	146
192	54	56	70

Persistenzlänge [nm]			
$\alpha_{init} = 26^\circ$, Stamm			
l_{rep} [bp] \ β [°]	90	110	130
195	145	220	583
198	106	146	283
200	84	98	142
203	65	64	60
205	49	52	41

den Persistenzlängen aus meinen Simulationen, welche bei physiologischer Salzkonzentration durchgeführt wurden. Kleine Persistenzlängen wurden in Studien von Rekombinationsfrequenzen in human Zellenkernen sowie in Messungen von Formaldehyd-Vernetzungswahrscheinlichkeiten in Hefezellkernen bestimmt [121, 122]. Der zur Abstandsmessungen verwendete Ansatz einer unbeschränkten Irrfahrt (random walk) ohne Selbstvermeidung ist allerdings für Interphase-Chromatinfibern nur für kurze Abstände erfüllt. Deshalb hängt die gemessene Persistenzlänge von der Region und der genomischen Separation ab. Weiterhin werden die Faltungstopologie sowie das endliche Kernvolumen vernachlässigt. Dies kann zu einer Überschätzung

Tabelle. 5.3 Streckmodul berechnet aus der Kurvenanpassung an das Hooke'sche Gesetz (B1) für verschiedene Repeatlängen und Torsionswinkel

Streckmodul[pN]			
$\alpha = 26^\circ$, kein Stamm, $F = 0,5, 10, 15, 20$ pN			
l_{rep} [bp] \ β [°]	90	110	130
182	321	656	1251
185	181	263	591
187	100	133	285
190	60	79	116
192	44	50	52

Streckmodul[pN]			
$\alpha = 26^\circ$, Stamm, $F = 0,5, 10, 15, 20$ pN			
l_{rep} [bp] \ β [°]	90	110	130
195	95	264	468
198	74	151	276
200	66	90	154
203	59	68	73
205	47	55	41

der Kettenflexibilität und somit zu den beobachteten kleinen Persistenzlängen führen. Weiterhin ergeben sich bei einer Persistenzlänge im Bereich des Fiberradius von 30 nm sehr unregulären Strukturen, die nur schwer mit dem Konzept einer „Fiber“ zu vereinbaren sind.

Die Analyse der Abstandsverteilung von Paaren genetischer Markierungen in menschlichen Fibroblastzellkernen [123-125] führte zu höheren Werten im Bereich von $L_p = 100 - 140$ nm basierend auf der inextensible WLC. Aktuelle Experimente in Sprosshefezellen (*S. cerevisiae*) unter Verwendung von optimierter *in situ* Hybridisierung und Videomikroskopie [126] zeigten steife Interphase-Chromatinfibern mit Persistenzlängen im Bereich von $L_p = 170 - 200$ nm. Diese liegen im Bereich von $L_p =$

140 – 220 nm (Tabelle 5.2) meiner Simulationen für kurze Repeatlängen von 182 bp mit Stamm. Persistenzlängen, die ich für größere Repeatlängen bestimmt habe, liegen im Bereich von 50 – 280 nm (Tabelle 5.2), wobei diese mit steigender Repeatlänge kleiner werden. Vergleichbare Persistenzlängen zwischen 200 – 250 nm ergaben aktuelle Simulationen von Mergell *et al.* [127]. Dort wurde ein ähnlicher Ansatz für die Modellierung der Nukleosom-Nukleosom-Wechselwirkung verwendet. Die Nukleosomen interagieren ebenfalls in Form von Ellipsoiden mittels des Gay-Berne-Potentials miteinander. Allerdings wird, im Gegensatz zu dem in meinen Simulationen verwendeten Modell, der Versatz entlang der Nukleosom-Achse zwischen ein- und ausgehenden Linker-DNS-Segmenten nicht berücksichtigt. Weiterhin hat das in meinen Simulationen verwendete Modell den Vorteil, dass die abgeschirmte elektrostatische Wechselwirkung zwischen der Linker-DNS-Segmenten explizit durch ein Debye-Hückel-Potential modelliert wird. Dadurch hängt z.B. der Öffnungswinkel von der Salzkonzentration ab. Die Werte aus den Simulationen von Mergell *et al.* [127] für den Streckmodul liegen im Bereich von $\varepsilon = 60 - 240$ pN und stimmen gut mit meinen Daten überein (Tabelle 5.3).

Bennink *et al.* erhielten ein Streckmodul von 150 pN bei einer Salzkonzentration von 150 mM NaCl [128], indem sie mit Hilfe von optischen Pinzetten Streckexperimente an, mit Nukleosomen assemblierter, Lambda-Phagen-DNS durchführten. Diese wurde aus einem *Xenopus Laevis* Ei extrahiert, enthielt keine Linker-Histone und hatte eine Repeatlänge von 200 bp. In meinen Simulationen ergaben sich kleine Werte von $\varepsilon = 40$ pN bereits für Repeatlängen von 192 bp, ohne Stamm. Allerdings führte ich meine Simulationen bei einer Salzkonzentration von 100 mM durch. Diese um 50 mM geringere, Salzkonzentration kann ein Grund für die Diskrepanz sein. Weiterhin beinhaltet die Lösung in diesem Streckexperiment Proteine, von denen bekannt ist, dass sie einen ähnlichen, komprimierenden Einfluss besitzen wie die Linker-Histone. Dies wird von meinen Daten bestätigt, welche für eine Repeatlänge von 200 bp mit Stamm, zu dem im Experiment beobachteten Streckmodul im Bereich von 90 – 160 pN führen.

Natürlich ist das Gay-Berne-Potential nur eine Approximation für die tatsächliche Nukleosom-Nukleosom-Wechselwirkung. Die Daten aus meinen Simulationen erlauben allerdings keine Rückschlüsse darauf, ob es sich bei den unter physiologischen Salzkonzentration simulierten Fibern um Übergangsstrukturen handelt, wie es von

Sun *et al.* [53] vorgeschlagen wurde. Um dies zu untersuchen und genauere quantitative Ergebnisse zu erhalten, werden detaillierte Wechselwirkungspotentiale benötigt, die z.B. die salzabhängigen Effekte der Histon-Tails berücksichtigen. Ein solches Potential wird in Abschnitt 5.2 verwendet.

Um das Problem der Nukleosom-Abwicklung zu behandeln und entsprechende Experimente zu interpretieren [128, 129], ist ein Potential, welches die DNS-Nukleosom-Wechselwirkung beschreibt, von großem Interesse. Die Verwendung eines solchen Potentials in den Simulationen würde tiefere Einsicht in die Architektur und das Verhalten der Chromatinfiber erlauben. Es wäre möglich z.B. den Einfluss von biologisch wichtigen Modifizierungen zu untersuchen oder ihre Rolle während der Transkription und Genregulierung zu erforschen.

5.2 In silicio Kompaktierung von Chromatin

In Abschnitt 5.1 wurde die Steifigkeit der Chromatinfiber anhand physikalischer Parameter wie der Persistenzlänge und dem Streckmodul bei physiologischer Salzkonzentration von 100 mM untersucht. Dieser Abschnitt beschäftigt sich mit der Kompaktierung der Chromatinfiber, die besonders von dem Salzgehalt ihrer Umgebung beeinflusst wird. Dabei sind sowohl die Valenz der Ionen, als auch deren Konzentration von entscheidender Bedeutung [11]. Während die Chromatinfiber bei niedrigen Salzkonzentrationen eine ausgedehnte „Perlenkettenstruktur“ [13-15, 62] aufweist, geht sie bei höheren Salzkonzentrationen in die kompaktere Struktur der 30-nm-Fiber über [12, 55, 78, 79]. Der Mechanismus dieser Kompaktierung ist Gegenstand der aktuellen wissenschaftlichen Diskussion und bis heute weitgehend unverstanden. Allerdings ist bekannt, dass die Anwesenheit von Linker-Histonen (H1 oder H5) die Kompaktierung erhöht [9, 62]. Insbesondere der Einfluss der Histon-Tails am Nucleosom-Core-Partikel (NCP), welche bis zu 50 % der positiven Ladung des NCP tragen, spielen dabei eine wichtige Rolle [34, 170, 171].

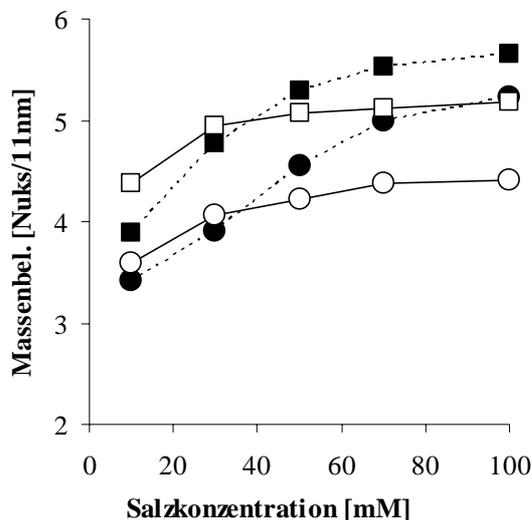


Abb. 5.2.1. Massenbelegungsichte als Funktion der Salzkonzentration für Simulationen mit dem salzunabhängigen Gay-Berne-Potential und dem salzabhängigen Tails-Potential. Die Kompaktierung des Tails-Potentials ist wesentlich stärker als beim Gay-Berne-Potential.

○: GB, $l = 182$, $\beta = 110$, kein Stamm

●: Tails, $l = 182$, $\beta = 110$, kein Stamm

□: GB, $l = 182$, $\beta = 130$, kein Stamm

■: Tails, $l = 182$, $\beta = 130$, kein Stamm

5.2.1 Tails-Potential vs. Gay-Berne-Potential

Um den Mechanismus der salzabhängigen Faltung zu untersuchen, führte ich zunächst Simulationen bei Salzkonzentrationen im Bereich von 10 – 100 mM monovalenter Ionenkonzentration durch. Das verwendete Gay-Berne-Potential, welches die Nukleosom-Nukleosom-Wechselwirkung beschreibt, besitzt keine Abhängigkeit von der Salzkonzentration. Dabei zeigte sich, dass die Berücksichtigung der Salzabhängigkeit allein in der Debye-Hückel-Wechselwirkung zwischen den Linker-DNS-Segmenten nicht ausreicht, um eine realistische Entfaltung der Chromatinfaser bei Salzkonzentrationen kleiner als 100 mM zu bewirken (Abb. 5.2.1). Eine Ursache ist die Debyelänge, die erst bei niedrigen Salzkonzentrationen von 10 mM ($1/\kappa \approx 3$ nm) deutlich im Bereich der DNS-Segmentabstände liegt.

Aus diesem Grund ersetzte ich die Gay-Berne-Wechselwirkung zwischen den Nukleosomen durch das in Abschnitt 3.7 beschriebene empirische Tails-Potential, welches von der Ionenstärke und der Salzkonzentration abhängt. Abbildung 5.2.2a und 5.2.2b

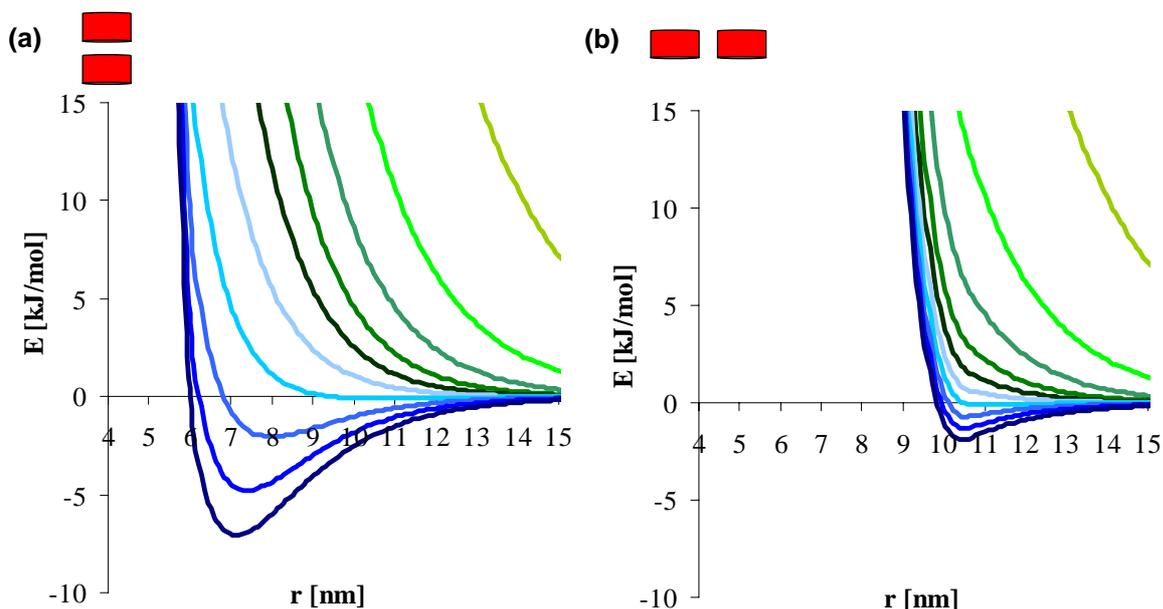
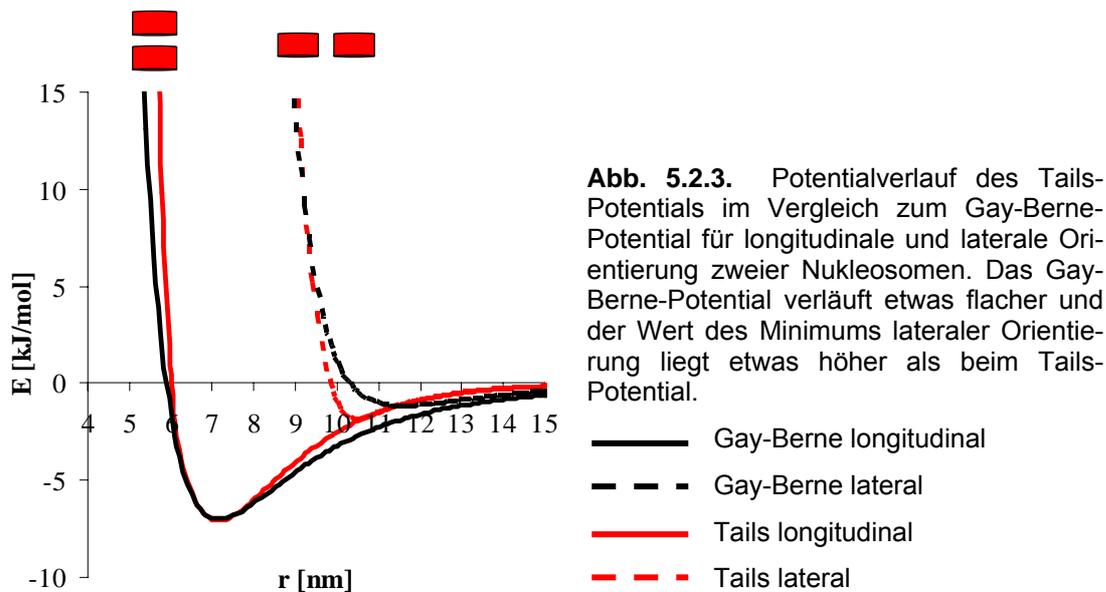


Abb. 5.2.2. Potentialverlauf des Tails-Potentials für verschiedene Salzkonzentrationen bei monovalenter Ionenstärke im Falle longitudinaler (a) und lateraler (b) Orientierung zweier Nukleosomen. Für niedrige Salzkonzentrationen ist das Potential positiv und damit abstoßend, wird allerdings mit zunehmender Salzkonzentration negativ und damit attraktiv.

— 10 mM — 30 mM — 50 mM — 70 mM — 90 mM
— 20 mM — 40 mM — 60 mM — 80 mM — 100 mM



veranschaulichen diesen Zusammenhang. Während das Potential bei hohen Salzkonzentrationen negative Werte annimmt und damit attraktiv ist, wird es bei niedrigen Salzkonzentrationen positiv, also abstoßend. Bei physiologischer Salzkonzentration ähnelt der Verlauf des Tails-Potentials der Form eines entsprechenden Gay-Berne-Potentials (Abb. 5.2.3). Allerdings verläuft das Tails-Potential geringfügig steiler und ist bei lateraler Orientierung etwas tiefer.

Für Simulationen, die bei physiologischer Salzkonzentration von 100 mM durchgeführt wurden, stimmen die Ergebnisse des Gay-Berne-Potentials und des Tails-Potentials gut überein. In Abbildung 5.2.4 ist der Verlauf charakteristischer Parameter wie Massenbelegungsdichte, Öffnungswinkel, Persistenzlänge und Durchmesser in Abhängigkeit von der Repeatlänge für beide Potentiale dargestellt. Abgesehen von einem Datenpunkt im Diagramm der Persistenzlänge, sind alle Werte nahezu identisch. Aufgrund des ähnlichen Potentialverlaufs (Abb. 5.2.3) ist dieses Verhalten zu erwarten. Da dennoch kleine Unterschiede, z.B. in der Potentialtiefe und der Steilheit des Kurvenverlaufs bestehen, kann z.B. der Ausreißer in der Persistenzlänge darauf zurückzuführen sein.

Für die Simulationen wurden die gleichen Parameterwerte gewählt wie in Tabelle 5.1. Der Öffnungswinkel der Linker-DNS betrug $\alpha_{\text{init}} = 26^\circ$ und die Repeatlänge variierte im Bereich von 191 - 220 bp. Der Torsionswinkel β wurde der Linkerlänge angepasst, so dass eine helikale Windung der dsDNS einer Länge von 10,5 bp entspricht [7, 182]. Die Äquilibrierung der Fibern bei verschiedenen Salzkonzentrationen

erfolgte nach der in Abschnitt 4.1 beschriebenen Vorgehensweise. Abbildung 5.2.5 zeigt typische, äquilibrierte Chromatinfaser-Strukturen eines Parametersatzes mit dem Tails-Potential bei verschiedenen Salzkonzentrationen. Während die Fiber bei niedriger Salzkonzentration relativ offen ist, sind ihre Konformationen bei hoher Salzkonzentration deutlich kompakter.

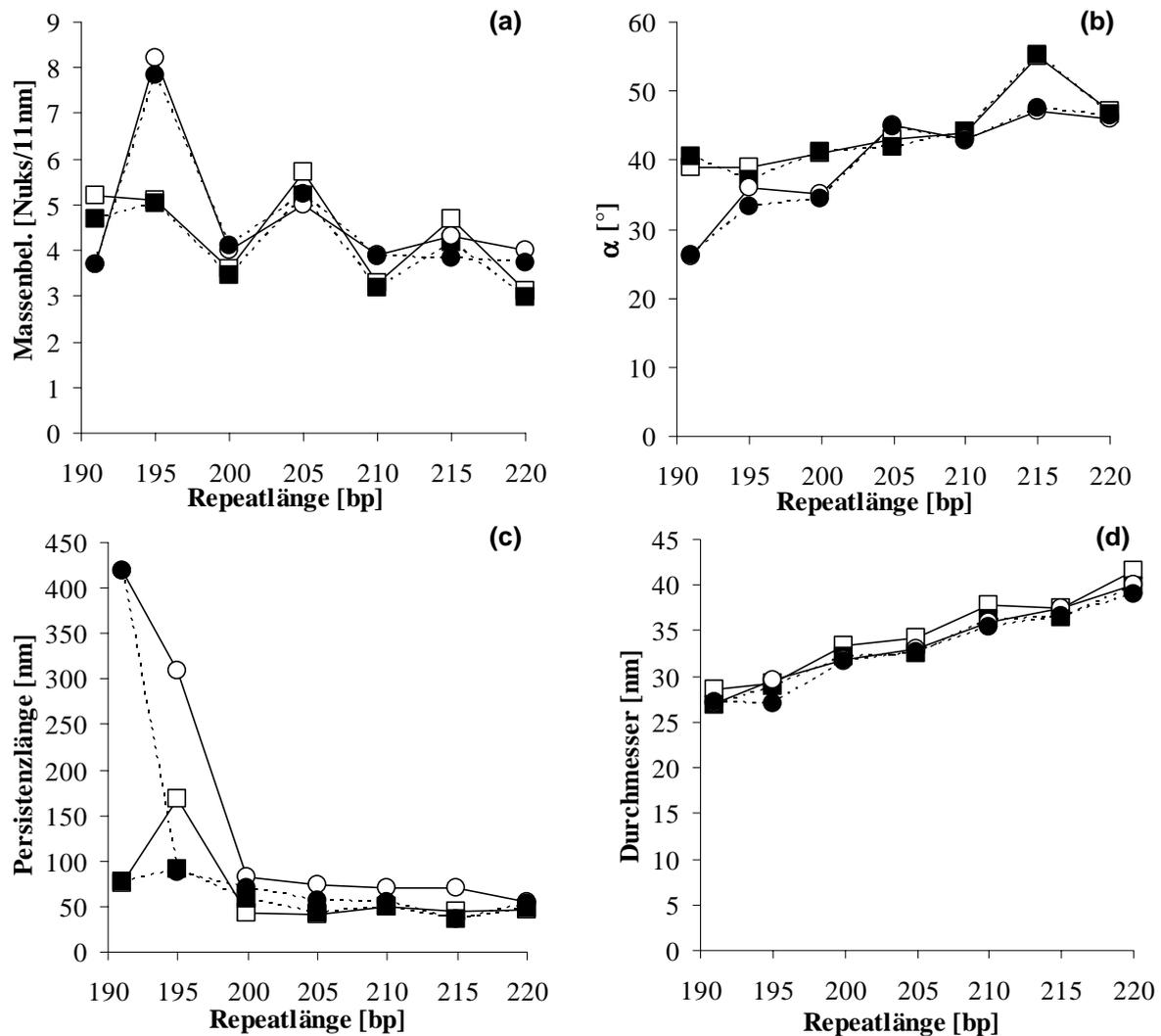


Abb. 5.2.4. Die Simulationen, welche die nukleosomale Wechselwirkung durch das Tails-Potential beschreiben, stimmen für physiologische Salzkonzentration von 100 mM bei typischen strukturellen Parametern wie Massenbelegungsichte, Öffnungswinkel α , Persistenzlänge und Durchmesser gut mit entsprechenden Simulationen überein, die das Gay-Berne-Potential verwenden.

○: Stamm GB; ●: Stamm Tails; □: kein Stamm GB, ■: kein Stamm Tails

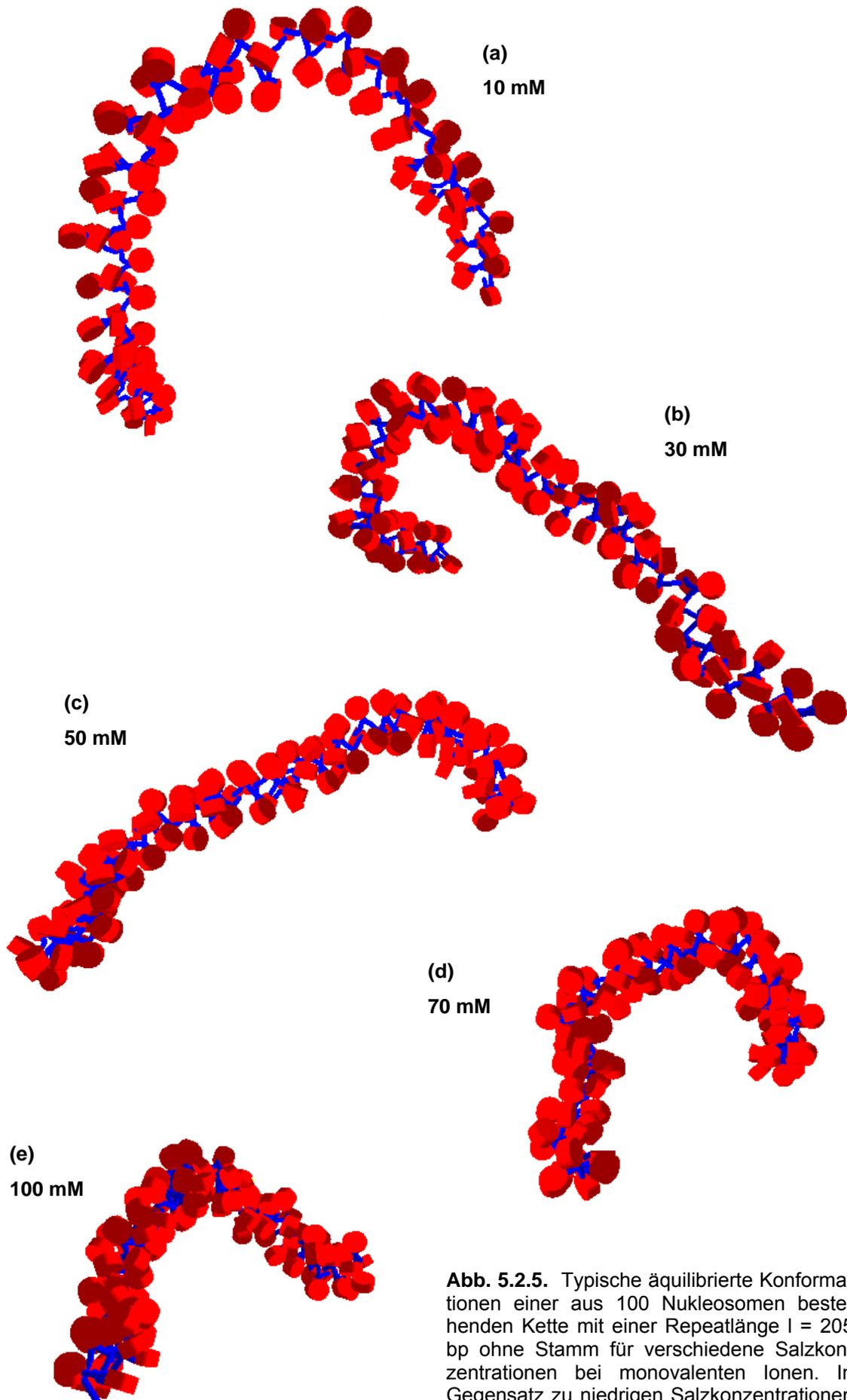


Abb. 5.2.5. Typische äquilibrierte Konformationen einer aus 100 Nukleosomen bestehenden Kette mit einer Repeatlänge $l = 205$ bp ohne Stamm für verschiedene Salzkonzentrationen bei monovalenten Ionen. In Gegensatz zu niedrigen Salzkonzentrationen nimmt das Chromatin bei hohen eine deutlich kompaktere Form an.

5.2.2 Quantitative Analyse der Kompaktierung

Die qualitative Analyse zeigt deutlich die Kompaktierung der Fiber bei hohen Salzkonzentrationen (Abb. 5.2.5). Dies konnte ich auch quantitativ anhand der, für die Fiber charakteristischen, Parameter wie Massenbelegungsdichte, Konturlänge und End-zu-End-Abstand beobachten. Der Verlauf dieser Strukturparameter zeigt, dass die Fiber für alle simulierten Repeatlängen, unabhängig von dem Vorhandensein eines Stamm-Motivs, mit steigender Salzkonzentration eine kompaktere Form annimmt. Die Massenbelegungsdichte ist in Abbildung 5.2.6 und 5.2.7 für die meisten simulierten Repeatlängen dargestellt. Abbildung 5.2.9 und 5.2.10 zeigen repräsentativ die Ergebnisse für Repeatlängen 195 – 205 in Schritten von 5 bp für Simulationen ohne Stamm.

Während sich die Massenbelegungsdichte im Mittel¹ um $49\pm 4\%$ ($41\pm 7\%$) erhöht, verringert sich der End-zu-End-Abstand und die Konturlänge ohne bzw. mit Stamm im Mittel um $58\pm 5\%$ ($49\pm 7\%$) bzw. $43\pm 4\%$ ($33\pm 8\%$). Die Kompaktierung wird auch am Sedimentationskoeffizienten deutlich, der sich um $40\pm 4\%$ ($30\pm 7\%$) wesentlich erhöht. Weiterhin reduziert sich der Öffnungswinkel der Linker-DNS um $37\pm 5\%$ ($28\pm 6\%$) und die Energie der Fibern um $55\pm 9\%$ ($51\pm 8\%$). Der Öffnungswinkel wird von dem Debye-Hückel-Potential, welches die DNS-DNS-Wechselwirkung beschreibt, beeinflusst, so dass die stärkere Abschirmung bei hohen Salzkonzentrationen Ursache für den geringen Öffnungswinkel ist. Gleichzeitig bewirkt das Ausklappen der Histon-Tails im Tails-Potential der Nukleosom-Nukleosom-Wechselwirkung eine stärkere elektrostatische Abschirmung und somit eine höhere Kompaktierung. Der Fiberradius ändert sich bei den verschiedenen Salzkonzentrationen nur unwesentlich um maximal 5 nm. Einerseits konnte ich keinen Phasenübergang von der 30-nm-Fiber zur 10-nm-Fiber beobachten, andererseits aber sehr gestreckte Zickzackkonformationen (Abb.5.2.5).

Durch die Analyse der thermischen Fluktuationen der Fiber (vgl. 5.1) lassen sich Aussagen über die Biege- und Strecksteifigkeit der Fiber bei verschiedenen Salzkon-

¹ Die Mittelwerte wurden nicht auf Basis, der in den Abbildungen, dargestellten repräsentativen Repeatlängen berechnet, sondern als Grundlage wurden jeweils alle simulierten Repeatlängen mit bzw. ohne Stamm verwendet: 191 bp, 195 bp, 200 bp, 205 bp, 210 bp, 215 bp, 220bp und 195 - 205bp.

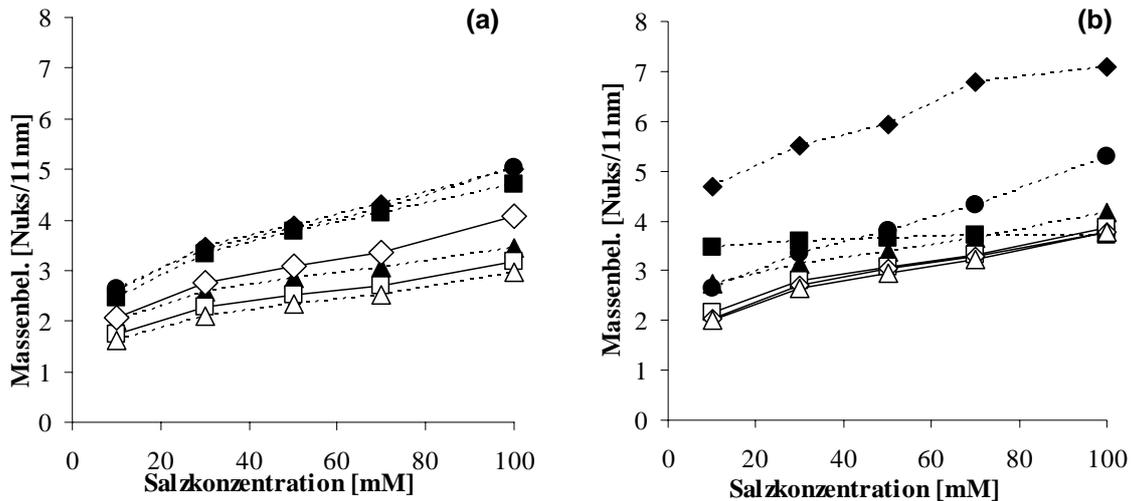


Abb. 5.2.6. Massenbelegungsdichte für Fibern ohne (a) bzw. mit (b) Stamm als Funktion der Salzkonzentration für verschiedene Repeatlängen. Charakteristisch für die Kompaktierung der Chromatinfiber ist ihr deutlicher Anstieg bei allen Repeatlängen. ■: $l = 191$ bp; ◆: $l = 195$ bp; ▲: $l = 200$ bp; ●: $l = 205$ bp; □: $l = 210$ bp; ◇: $l = 215$ bp; △: $l = 220$;

zentrationen machen. Abbildung 5.2.9 zeigt, dass die Persistenzlänge als Funktion der Salzkonzentration ohne und mit Stamm für alle Repeatlängen abnimmt, d.h. die Fiber besitzt bei hohen Salzkonzentrationen eine geringere Biegesteifigkeit als bei niedrigen Salzkonzentrationen. Die Persistenzlänge verringert sich um 81 ± 6 % bei Simulationen ohne Stamm und um 80 ± 5 % mit Stamm. Ein ähnliches Verhalten ist auch beim Streckmodul zu beobachten, welches in diesen Simulationen ohne zusätzliche Kraft, also rein entropisch, bestimmt wurde. Auch hier nimmt die Steifigkeit

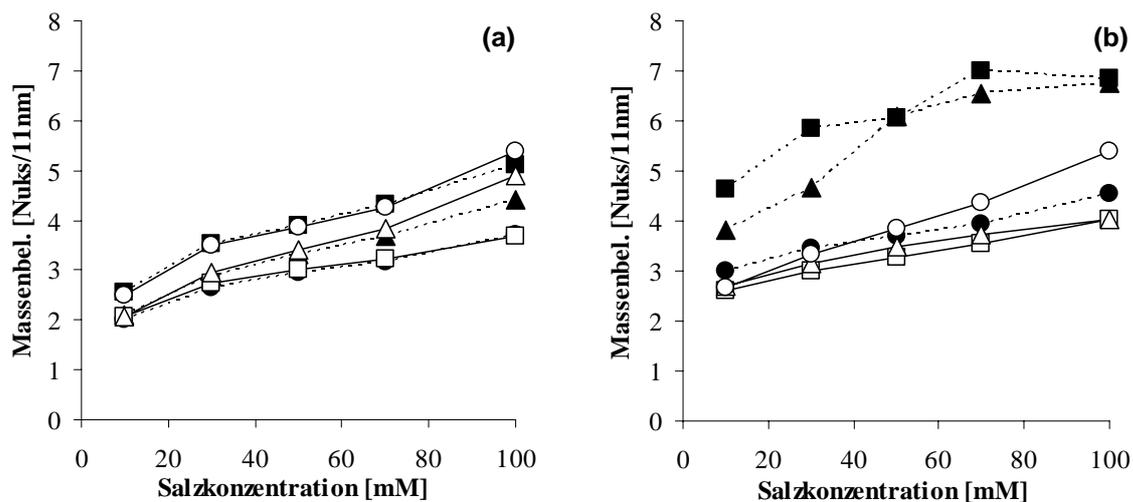
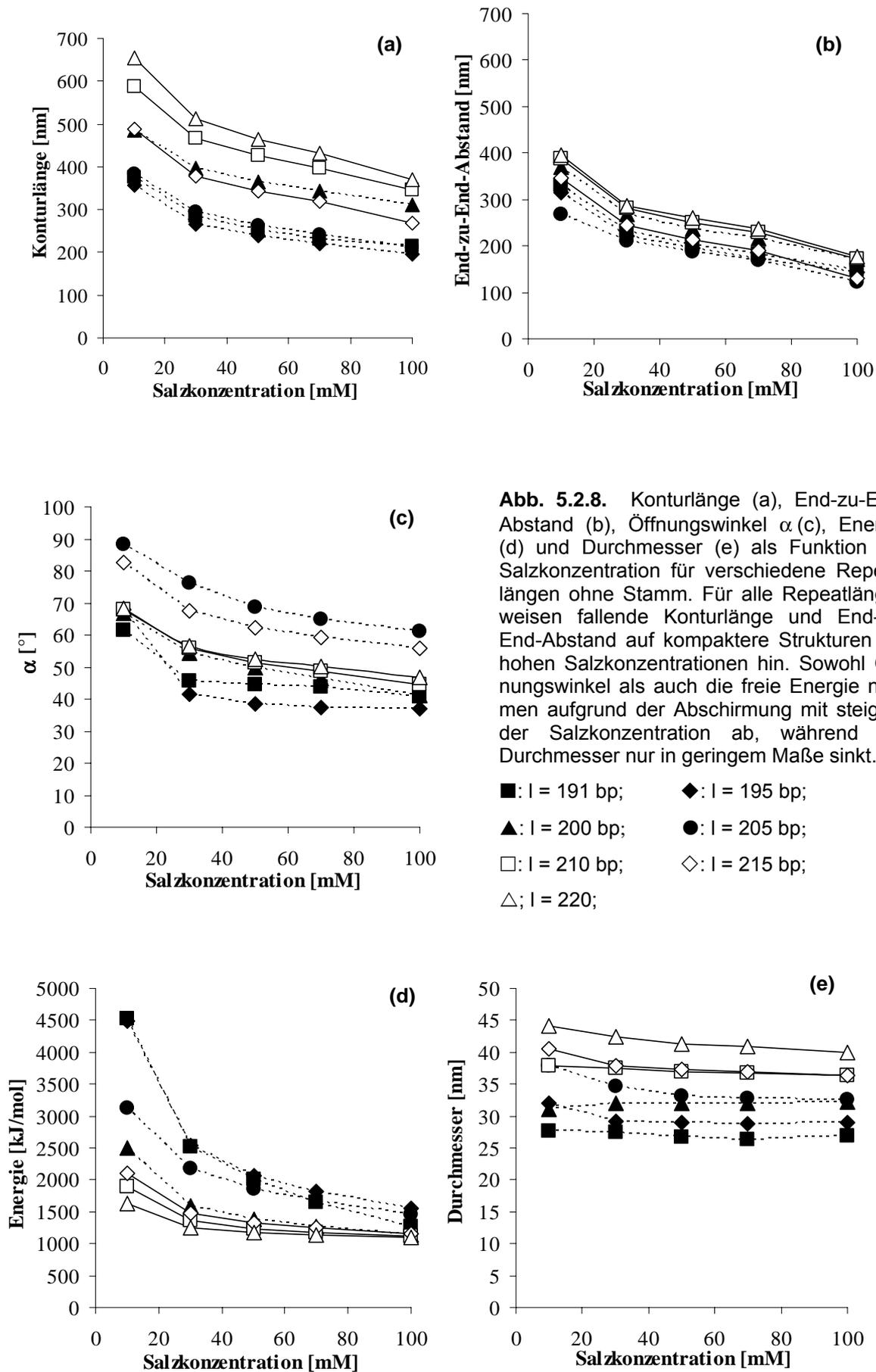


Abb. 5.2.7. Massenbelegungsdichte für Fibern ohne (a) bzw. mit (b) Stamm als Funktion der Salzkonzentration für verschiedene Repeatlängen. Analog zu 5.2.6 wird auch hier die Kompaktierung der Chromatinfiber anhand des Anstiegs der Massenbelegungsdichte bei allen Repeatlängen deutlich.

■: $l = 195$ bp; ▲: $l = 197$ bp; ●: $l = 199$ bp; □: $l = 201$ bp; △: $l = 203$; ○: $l = 205$



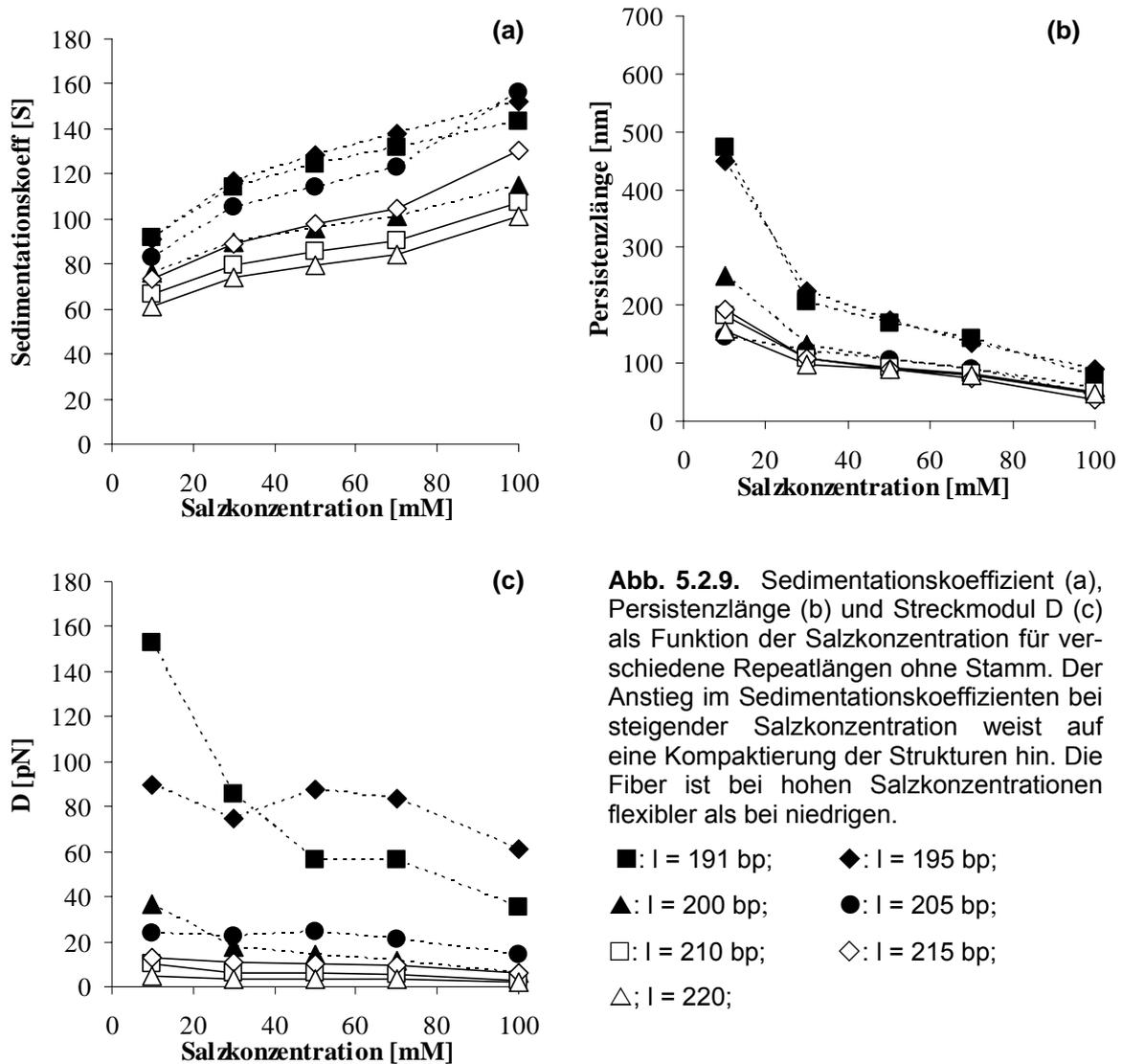


Abb. 5.2.9. Sedimentationskoeffizient (a), Persistenzlänge (b) und Streckmodul D (c) als Funktion der Salzkonzentration für verschiedene Repeatlängen ohne Stamm. Der Anstieg im Sedimentationskoeffizienten bei steigender Salzkonzentration weist auf eine Kompaktierung der Strukturen hin. Die Fiber ist bei hohen Salzkonzentrationen flexibler als bei niedrigen.

der Fiber mit steigender Salzkonzentration bei Simulationen ohne bzw. mit Stamm um $63 \pm 18\%$ ($78 \pm 16\%$) ab. Einer der Gründe für die beobachtete Abnahme der Flexibilität ist die starke elektrostatische Abstoßung bei niedrigen Salzkonzentrationen. Diese wird bei hohen Salzkonzentrationen durch das Ausklappen der Histon-Tails vermindert. Simulationen einer Repeatlänge von 191 bp mit Stamm werden aufgrund ihrer extrem kurzen Linkerlänge von 1 bp bei der Auswertung nicht berücksichtigt. Die größere Flexibilität der Fiber bei physiologischer Salzkonzentration erleichtert die Kompaktierung auf der nächst höheren Stufe, z.B. durch Schleifen, wie sie in Experimenten [185] und in meinen Simulationen (vgl. 5.1) beobachtet wurden.

Abb. 5.2.10 zeigt die Sedimentationskoeffizienten, welche einerseits mit Hilfe von Formel (4.8) und andererseits durch Anwendung des Programms HYDRO für verschiedene Salzkonzentrationen bestimmt wurden. Die Ergebnisse der beiden Methoden stimmen sehr gut miteinander überein und unterscheiden sich maximal um

0,6 S. Um die Vergleichbarkeit mit experimentellen und simulierten Daten zu gewährleisten, handelt es hier um relativ kurze Ketten von 12 Nukleosomen ohne Stamm. Der Anstieg des Sedimentationskoeffizienten mit steigender Salzkonzentration weist auch hier darauf hin, dass die Fiber bei hohen Salzkonzentrationen eine kompaktere Struktur annimmt. Dies stimmt mit den bereits besprochenen Ergebnissen für lange Fibern von 100 Nukleosomen überein.

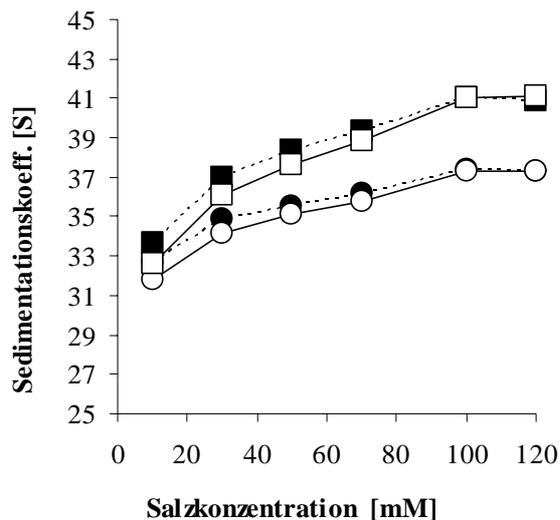


Abb. 5.2.10. Sedimentationskoeffizient als Funktion der Salzkonzentration. Die Werte, welche mit der Kirkwood-Nahrung (4.8) berechnet wurden, stimmen gut mit den Werten überein, welche durch Anwendung des Programms Hydro ermittelt wurden.

■: Hydro, I = 207 bp, delta = 0°

□: Kirkwood-Nahrung, I = 207 bp, delta = 0°

●: Hydro, I = 207 bp, delta = 65°

○: Kirkwood-Nahrung, I = 207 bp, delta = 65°

5.2.3 Diskussion

Durch die Berücksichtigung der salzabhängigen Extension der Histon-Tails in der Nukleosom-Nukleosom-Wechselwirkung, ist es mir gelungen, die Kompaktierung von bis zu 100 Nukleosomen langen Chromatinketten in Abhängigkeit von ihrer Salzkonzentration zu simulieren. Die Kompaktierung wurde sowohl qualitativ anhand der Konformationen, als auch quantitativ durch verschiedene Strukturparameter wie Konturlänge, End-zu-End-Abstand, Öffnungswinkel der Linker-DNS-Stränge, Energie, Massenbelegungsdichte sowie Sedimentationskoeffizient verifiziert. Entsprechend den experimentellen Messungen erwiesen sich simulierte Fibern mit Stamm als etwas kompakter als ohne Stamm. Ursache kann der kleinere Öffnungswinkel der Linker-DNS-Segmente sein, der sich aufgrund der Stammstruktur ergibt. Allerdings ist die relative Kompaktierung bei Fibern ohne Stamm im Mittel etwas größer. Dabei könnte die höhere Flexibilität der Fibern ohne Stamm eine Rolle spielen, welche in meinen Simulationen eine geringfügig niedrigere Persistenzlänge und ein kleineres Streckmodul aufwies. Allerdings spielt nach wie vor die lokale Geometrie eine ent-

scheidende Rolle. Es zeigte sich, dass der Durchmesser der Fiber nahezu konstant bleibt und ein Phasenübergang zu einem 10-nm-Filament nicht beobachtet wurde. Dies kann darauf hinweisen, dass die Chromatinfiber auch bei niedrigen Ionenstärken in einer höher geordneten Struktur organisiert ist. Ein ähnliches Verhalten zeigen auch die mittels Neutronenstreuung und STEM untersuchten Ketten in den Messungen von Gerchman *et al.* [93]. Allerdings wurde in Sedimentationsexperimenten von Thomas *et al.* [98, 187] ein Phasenübergang in Abhängigkeit der Ionenstärke bei Chromatinfragmenten beobachtet. Da dieser aber nur für Fragmente aus mindestens 50 Nukleosomen stattfindet, räumen die Autoren ein, dass der beobachtete Phasenübergang nicht die Folge einer Änderung der Sekundärstruktur ist, sondern seinen Ursprung in der größeren hydrodynamischen Scherung haben kann.

Die Simulationen zeigen, dass Konformationen bei höherer Salzkonzentration eine wesentlich geringere freie Energie besitzen, als bei niedriger Salzkonzentration. Das lokale Ausdehnen der Histon-Tails reduziert die elektrostatische Abstoßung zwischen den Nukleosomen und fördert global die Kompaktierung der Fiber. Die geringere elektrostatische Abstoßung durch diesen „Tail-Bridging“-Effekt ist auch die Ursache für die höhere Flexibilität der simulierten Chromatinfibern bei hohen Salzkonzentrationen. Dies wird an der mit der Salzkonzentration abnehmenden Persistenzlänge bzw. dem abnehmenden Streckmodul deutlich. Ein ähnliches Verhalten wurde auch bei dsDNS beobachtet [186]. Der von mir bestimmte entropische Streckmodul zwischen 5-10 pN bei einer Repeatlänge von 210 bp und niedriger Salzkonzentration liegt im Bereich der experimentell gemessenen Werte [120, 129, 188]. Allerdings ist die Persistenzlänge der simulierten Fibern mit 100-180 nm höher. Eine Ursache könnte der nicht vorhandene Phasenübergang in meinen Simulationen sein.

Abgesehen von meinen Simulationen und den Röntgenstreu- und Osmometrie Experimenten von Mangenot *et al.* [41-43] wird der „Tail-Bridging“-Effekt auch in anderen Simulationen beobachtet. Zum Beispiel in dem wesentlich einfacheren Modell von Mühlbacher *et al.* [51], welches die Histon-Tails als geladene Stäbe an je zwei Kugeln modelliert oder in Simulationen von Sun *et al.* [53], die wesentlich kürzere Ketten, basierend auf dem DiSCO-Modell, verwenden.

Abbildung 5.2.11 ermöglicht den Vergleich experimenteller Daten von Hühnerythrozyten, gemessen von Gerchman *et al.* [93] mittels Rastertunnelelektronenmikroskopie (STEM) und Neutronen-Streuung sowie Daten von Woodcock *et al.* [86],

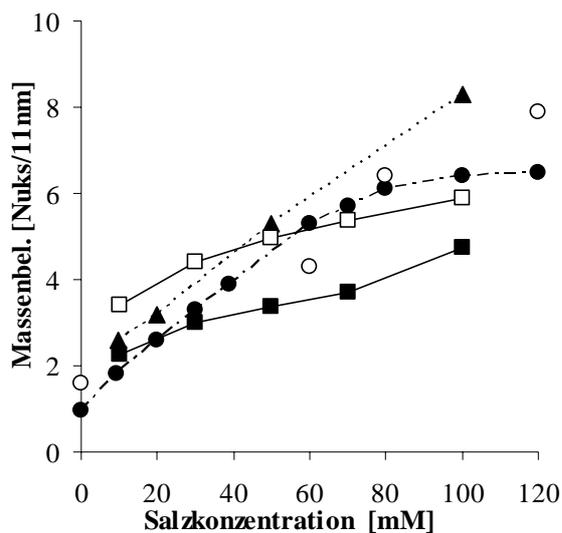


Abb. 5.2.11. Massenbelegungsdichte als Funktion der Salzkonzentration. Die Simulationen zeigen den gleichen Trend wie die experimentellen Daten: die Massenbelegungsdichte nimmt mit wachsender Ionenstärke zu. Zwar ist der Anstieg der Werte der Simulationen etwas flacher, nähert sich aber analog zu den Experimenten von Gerchman et al einer oberen Grenze.

●: Gerchman et al Neutronen Streuung (1987)

○: Gerchman et al STEM (1987)

▲: Woodcock et al. STEM (1984)

□: $l = 201$ bp, $\beta = 162^\circ$

■: $l = 211$ bp, $\beta = 145^\circ$

ebenfalls gewonnen durch STEM, mit den Ergebnissen aus meinen Simulationen. Die Massenbelegungsdichten der Simulationen weisen den gleichen Trend auf wie die experimentellen Messungen: Ihr Wert nimmt mit steigender Salzkonzentration zu und die Fiber wird kompakter. Allerdings ist der Anstieg der Massenbelegungsdichte in meinen Simulationen etwas flacher als in den Experimenten. Dadurch stimmen die Werte, je nach verwendeter lokaler Geometrie, entweder bei tiefen oder bei hohen Salzkonzentrationen gut mit den Messungen überein. Ein Grund für die stärkere Kompaktierung im Experiment kann die Verwendung von Spermin und Spermidin zur Stabilisierung der Fiber bei hohen Salzkonzentrationen sein. Diese Substanzen bewirken bekanntermaßen eine zusätzliche Kompaktierung. Berücksichtigt man die starke Streuung der STEM Daten von Gerchman *et al.* [93] gegenüber ihren Werten aus der Neutronenstreuung, so stimmen meine Daten in akzeptabler Weise mit den Experimenten überein.

Bei hohen Salzkonzentrationen zeigt die Massenbelegungsdichte das gleiche Verhalten wie bei Gerchman *et al.* [93]. Sie endet in einem Plateau, dass eine maximale Massenbelegungsdichte von 6-7 Nukleosomen pro 11 nm nicht überschreitet. Die älteren Experimente von Woodcock *et al.* [86] zeigen dagegen einen linearen Trend, der sich auch bei hohen Salzkonzentrationen fortsetzt. Ein Hauptgrund für die hohen Werte von Woodcock *et al.* [86] kann die Aggregation von Nukleosomen bei diesen hohen Ionenstärken sein. Aber auch Kalibrierungsunterschiede im Vergleich zu Gerchman *et al.* [93] sowie die Auswahl besonders geordneter Regionen in der Probe kommen als Ursache in Frage. Weiterhin bleibt zu bemerken, dass strukturelle Werte, wie die Massenbelegungsdichte, in den Simulationen stark von der lokalen

Fibergeometrie, insbesondere von der gewählten Repeatlänge bzw. Torsion abhängen.

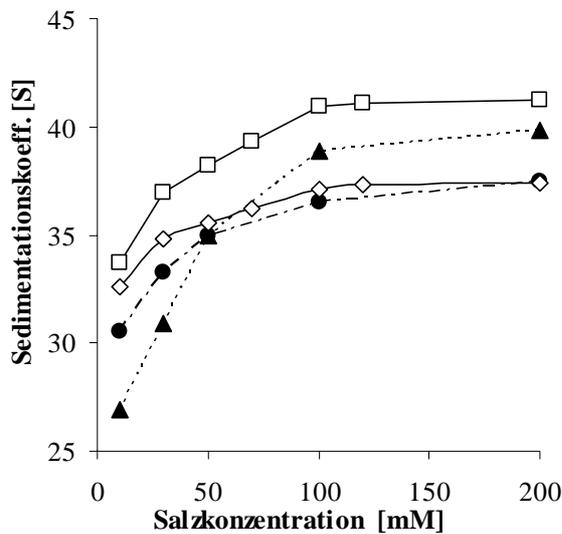


Abb. 5.2.12. Sedimentationskoeffizient als Funktion der Salzkonzentration. Während Monte-Carlo-Simulationen mit dem DiSCO-Modell und statischen Histon-Tails die experimentellen Werte unter- bzw. überschätzen, können meine Simulationen die experimentellen Werte sehr gut reproduzieren in dem etwas offenere Startstrukturen mit größerem Öffnungswinkel α verwendet werden.

●: Experiment Hansen et al. (1989)

▲: Monte-Carlo-Sun et al. (2005)

□: $\alpha = 65^\circ, l = 207 \text{ bp}, \text{HYDRO}$

■: $\alpha = 26^\circ, l = 207 \text{ bp}, \text{HYDRO}$

Zur abschließenden Validierung des Modells, vergleiche ich den Sedimentationskoeffizienten, mit den Werten aus der analytischen Ultrazentrifugation von Hansen *et al.* [116]. (Abb. 5.2.12). In dieser Messung wurden rekonstituiert Fibern ohne H1 verwendet, die aus 12 Nukleosomen bestanden und eine Repeatlänge von 207 bp besaßen. Die Resultate meiner Simulationen von Fibern mit der gleichen Anzahl von Nukleosomen und Repeatlänge stimmen gut mit dem Trend im Experiment überein: mit steigender Ionenstärke nimmt der Sedimentationskoeffizient zu und die Fiber wird kompakter. Der Anstieg des Sedimentationskoeffizienten beträgt im Experiment ca. 23 % und in der Simulation, je nach lokaler Geometrie, 15 % oder 22 %. Während geschlossene Startstrukturen systematisch über den experimentellen Werten liegen, stimmen die offeneren Startstrukturen sehr gut mit den experimentellen Daten überein.

Sowohl Experiment als auch Simulation nähern sich bei hohen Salzkonzentrationen einem maximalen Wert im Bereich von 37 - 41 S an. Ein Plateau bei hohen Salzkonzentrationen konnte zuvor auch bei der Massenbelegungsdichte beobachtet werden (Abb. 5.2.11). Weiterhin sind im Diagramm (Abb. 5.2.12) die Ergebnisse der Simulationen, welche den DiSCO Ansatz [53] mit statischen Histon-Tails verwenden, dargestellt. Da die statischen Histon-Tails bei niedrigen Salzkonzentrationen nicht an den NCP gebunden werden, findet keine partielle Abschirmung der elektrostatischen

Linker-Linker-Abstoßung statt. Das Resultat sind stark entfaltete Strukturen. Zusätzlich führt die Wechselwirkung zwischen dem festen H3-Tail und der Linker-DNS in diesem Modell zu unrealistisch großen Öffnungswinkeln, so dass der Sedimentationskoeffizient bei niedrigen Ionenstärken unterschätzt wird. Die Überschätzung des Sedimentationskoeffizienten bei hohen Salzkonzentrationen lässt sich auf eine unrealistische starke Nukleosom-Nukleosom-Wechselwirkung zurückführen. Indem die Autoren die Histon-Tails flexibel gestalteten, wurde das Modell entscheidend verbessert. Übereinstimmend mit meinen Daten konnten sie in einer neueren Publikation die experimentellen Daten genauer reproduzieren [54].

Der Vorteil des in meinen Simulationen verwendeten Modells, liegt in der relativ schnell zu berechnenden Nukleosom-Nukleosom-Wechselwirkung. Dadurch können sehr lange Ketten in akzeptabler Zeit simuliert werden. Die Modifikationen an den Histon-Tails spielen bei der Genregulation eine wichtige Rolle. Um diese genauer zu untersuchen sind weitere Veränderungen an der Nukleosom-Nukleosom-Wechselwirkung, insbesondere am elektrostatischen Teil, notwendig. Zur Analyse der Dynamik der Chromatinfiber, z.B. zur Bestimmung des Diffusionskoeffizienten, wäre der nächste Schritt die Implementierung einer Brownschen-Dynamik.

5.3 Äquilibration von geometrisch konstruierten Chromatinfibern

Die Simulationen in diesem Abschnitt untersuchen die Stabilität von Chromatinfibern in Abhängigkeit von der Repeatlänge. Hierzu erfolgte zunächst die thermodynamische Äquilibration der Strukturen wie in Abschnitt 4.1 beschrieben. Danach wurden sie qualitativ durch Visualisierung und quantitativ anhand charakteristischer Strukturparameter analysiert, um sie in stabile bzw. instabile Fibern zu unterteilen. Die Ergebnisse wurden mit Resultaten aus dem geometrischen Modell unserer Kooperationspartner Stephan Diekmann und Jürgen Sühnel von der FLI in Jena verglichen.

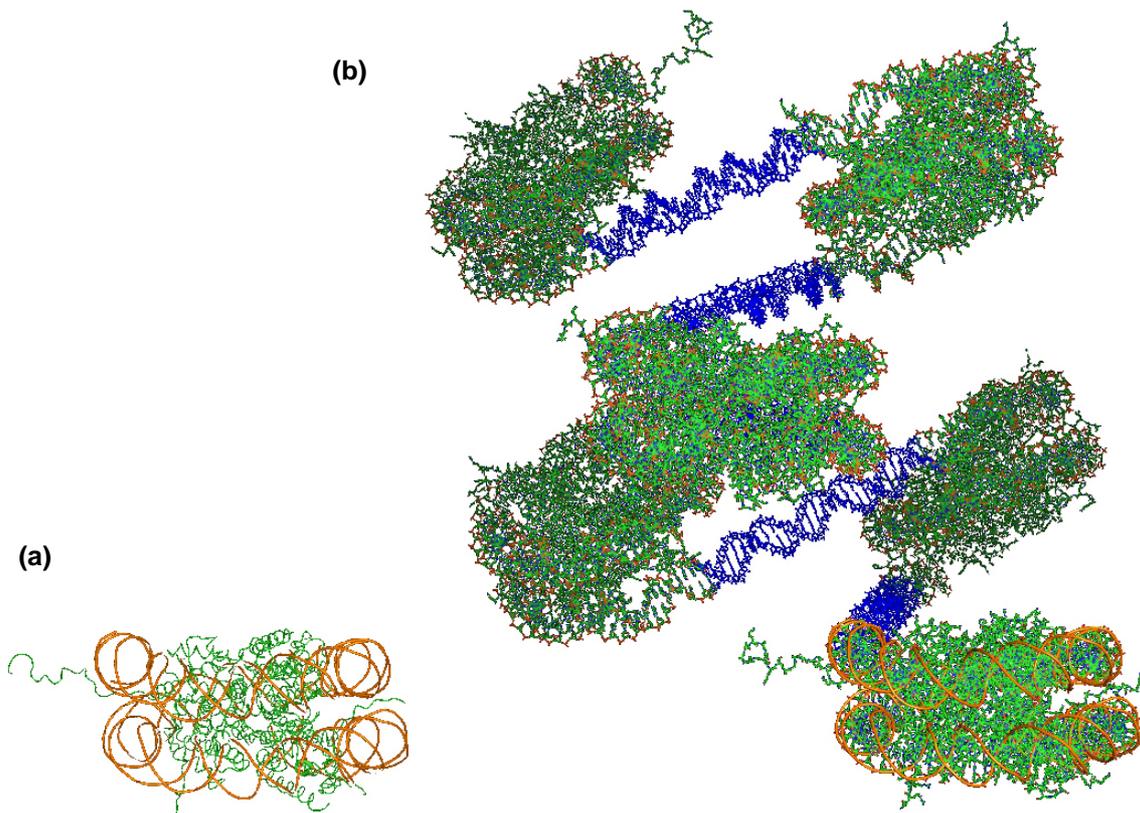


Abb. 5.3.1. Geometrische Konstruktion einer Chromatinfiber. Ausgehend von der Kristallstruktur eines Mononukleosoms (a) [6] wird eine Linker-DNS (blau) definierter Länge, hier 27 bp, in der entsprechenden Orientierung mit dem Nukleosom verbunden. Anschließend wird diese Kristallstruktur erneut verwendet, um ein weiteres Nukleosom in der passenden Orientierung an die Linker-DNS anzufügen. Nach mehrmaliger Iteration ergibt sich eine Chromatin Fiber (b), die auf Kollisionen untersucht werden kann.

Das Chromatinfaser-Modell von Sühnel geht von der Kristallstruktur eines einzelnen Nukleosoms [6] aus. Zunächst wird eine Linker-DNS definierter Länge passend orientiert und an die DNS, welche das Nukleosom verlässt, angefügt. Anschließend wird ein weiteres Nukleosom, basierend auf der gleichen Kristallstruktur, entsprechend orientiert und mit der zuvor eingefügten Linker-DNS passend verbunden (Abb. 5.3.1). Mit Hilfe dieses geometrischen Verfahrens konstruierte Sühnel Chromatinfibern mit DNS-Linkerlängen im Bereich von 9 - 65 bp, welche jeweils aus 24 Nukleosomen bestanden. Bei einer genaueren Analyse zeigte sich, dass es bei Fibern mit bestimmten Linker- bzw. Repeatlängen zu Kollisionen und Überlappungen kommt. Solche Fibern können theoretisch nicht existieren und sind instabil. Auf die Praxis ist diese Aussage nur zutreffend, wenn sich die Fiber im thermodynamischen Gleichgewicht befindet. Dies ist bei den geometrisch konstruierten Fibern natürlich nicht der Fall.

Aus diesem Grund passte ich das Modell der Chromatinfaser dem geometrischen Modell von Sühnel an und analysierte die Strukturen nach der thermodynamischen Äquilibrierung. Hierfür war es notwendig den Einfluss des Anknüpfungswinkels der Linker-DNS-Stränge in das Modell zu integrieren. Dies realisiert der Parameter δ (vgl. 5.2.3), welcher in den bisher beschriebenen Simulationen immer identisch Null gesetzt wurde, d.h. ein- und ausgehende Linker-DNS lagen im Abstand von 3,1 nm parallel zu superhelikalen Achse des Nukleosoms übereinander (vgl. 3.8).

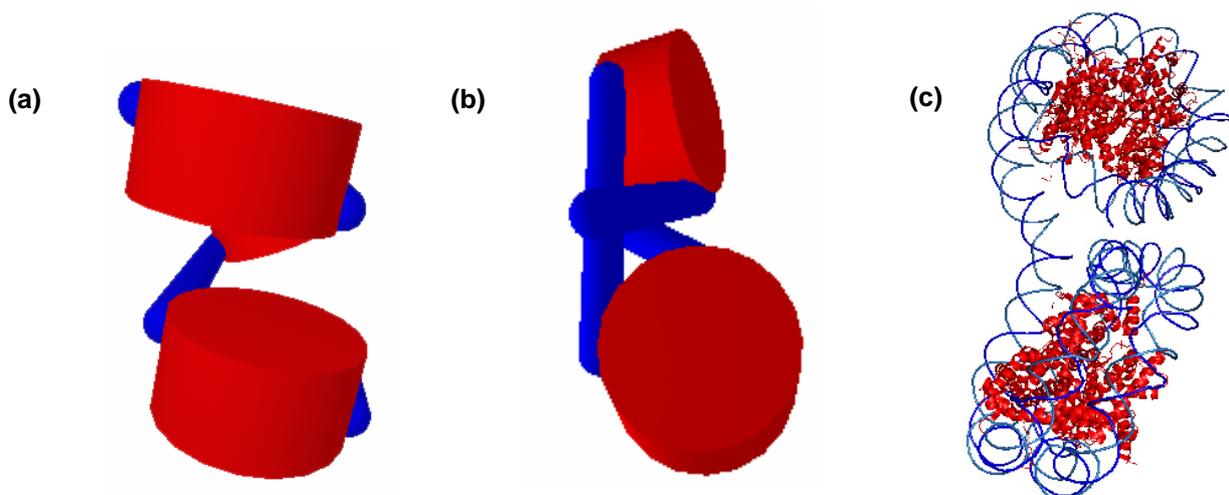


Abb. 5.3.2. Visualisierung der lokalen Geometrie für Parametersatz 1 (a) mit $\delta = 180^\circ$ und $\alpha = 0^\circ$ und für Parametersatz 2 (b) mit $\delta = 119^\circ$ und $\alpha = 60^\circ$. In Abbildung (c) ist zum Vergleich die Kristallstruktur zweier Nukleosomen des Tetranukleosoms [8] dargestellt.

Ich simulierte drei verschiedene Parametersätze:

In Parametersatz 1 (Abb. 5.3.2a) wählte ich in Anlehnung an die geometrisch konstruierten Fibern einen maximalen Abstand zwischen ein- und ausgehenden Linker-DNS-Segmenten ($\delta = 180^\circ$), wobei diese zueinander parallel lagen ($\alpha = 0^\circ$).

In Parametersatz 2 (Abb. 5.3.2b) ist die Kristallstruktur des Tetranukleosoms (Abb. 5.3.1c) [8] die Grundlage für die Parameterwahl. Hier sind die 147 bp 1,67-mal um das Nukleosom gewickelt, so dass sich für den Anknüpfungswinkel $\delta = 360^\circ - (360^\circ * 0,67) \approx 119^\circ$ wählte. Dabei nahm ich an, dass die Anknüpfungspunkte der Linker-DNS symmetrisch zueinander liegen. Den Öffnungswinkel zwischen ein- und austretender Linker-DNS setzte ich $\alpha = 60^\circ$, so dass er im Bereich von $55^\circ - 65^\circ$ liegt, wie er sich aus der Kristallstruktur [8] und den geometrischen Modell von Sühnel bestimmen lässt.

Für Parametersatz 3 wurde der Anknüpfungswinkel auf Basis der Kristallstruktur des Mononukleosoms gewählt [6]. Bei einer DNS Länge von 146 bp, welche 1,65-mal um das Nukleosom gewunden ist, ergibt sich $\delta = 126^\circ$. Der Öffnungswinkel wurde analog zum Parametersatz 2 auf $\alpha = 60^\circ$ gesetzt.

Bei allen Parametersätzen wurden Fibern mit Repeatlängen von 155 – 211 bp simuliert. Entsprechend den geometrischen Fibermodellen, bestanden sie aus jeweils 24 Nukleosomen. Das geometrische Modell sowie die Kristallstruktur des Tetranukleosoms weisen einen Torsionswinkel von $\beta = 72^\circ$ für eine Linkerlänge $l = 20$ bp auf. Der in diesen Simulationen verwendete Torsionswinkel β hängt von der Länge der Linker-DNS ab und ergibt sich aus der helikalen Steigung die, aus Gründen der Vergleichbarkeit mit dem geometrischen Modell, als 10 bp angenommen wurde:

$$\beta = (\text{Linkerlänge } l - 20 \text{ bp}) * 36^\circ + 72^\circ . \quad (5.6)$$

Um den Einfluss der Nukleosomanzahl zu untersuchen wurden zusätzlich Simulationen von Fibern durchgeführt, die nicht aus 24 Nukleosomen, sondern aus 100 Nukleosomen bestehen.

Als Potential verwendete ich das Gay-Berne-Potential mit den in der Tabelle 5.1 dargestellten Parametern. Die Äquilibration erfolgte wie in Abschnitt 4.1 beschrieben.

5.3.1 Stabile und instabile Fibern

Um zu entscheiden, ob die simulierten Fibern im Gleichgewicht stabil oder instabil sind, analysierte ich diese zunächst qualitativ durch Visualisierung. Anschließend erfolge eine quantitative Untersuchung, indem ich charakteristische Parameter wie die Energie, Massenbelegungsdichte und End-zu-End-Abstand verglich. Trägt man diese Parameter als Funktion der Repeatlänge auf (Abb. 5.3.4 – 5), so zeigt sich für alle Parametersätze ein periodisches Verhalten mit einer Periode, die der helikalen Steigung der Linker-DNS von 10 bp entspricht. Abb. 5.3.3a zeigt eine typische stabile Fiber, während in Abb. 5.3.3b eine instabile Fiber dargestellt ist. Die Nukleosomen der instabilen Fiber aggregieren und bilden Klumpen.

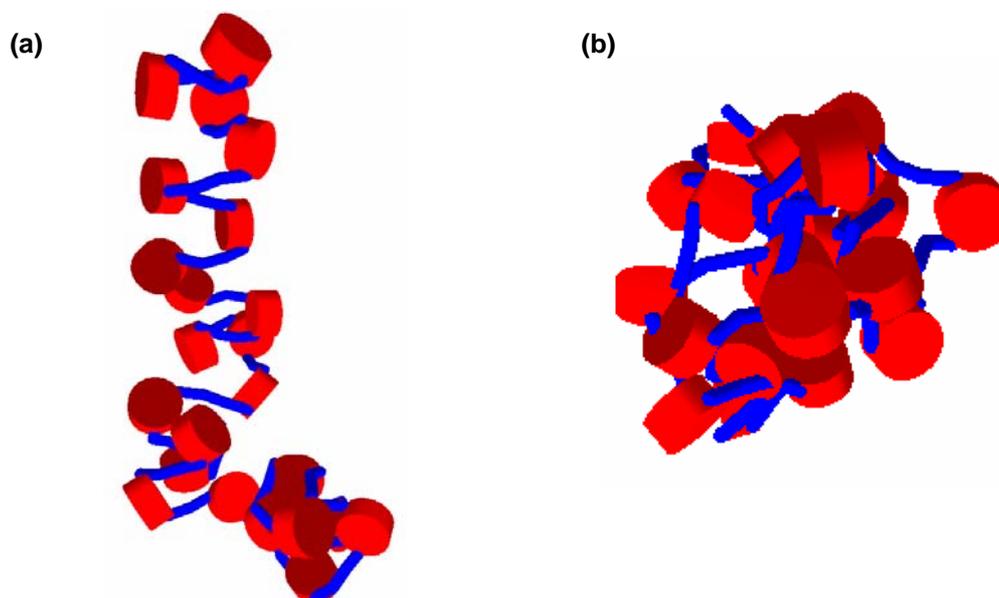


Abb. 5.3.3. Typische stabile (a) und instabile (b) Konformationen. Während die stabilen Strukturen die Form einer Fiber aufweisen aggregieren die instabilen Strukturen zu klumpenartigen Gebilden.

Für Parametersatz 1 (Abb. 5.3.4) finden sich Spitzen bei Repeatlängen 159 bis 209 bp in Schritten von 10 bp. Es handelt sich um instabile Fibern, welche eine hohe Energie und Massenbelegungsdichte sowie eine entsprechend geringe Konturlänge bzw. End-zu-End-Abstand aufweisen. Aufgrund der starken Wechselwirkungen zwischen den Nukleosomen sind Fibern mit einer Repeatlänge kleiner als 159 bp ebenfalls instabil. Die stabilen Fibern mit der höchsten Kompaktierung und Massenbelegungsdichte von mehr als 3 Nuk/11nm besitzen Repeatlängen zwischen 160

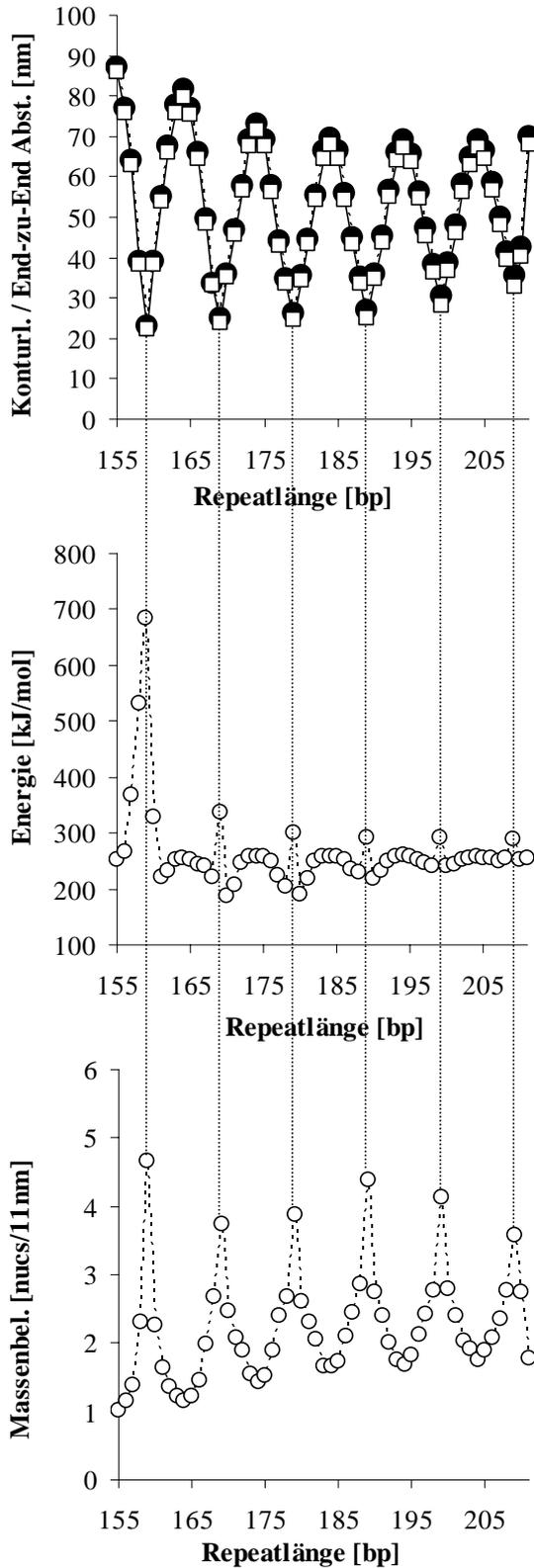


Abb. 5.3.4. Konturlänge (●), End-zu-End-Abstand (□), Energie und Massenbelegungsdichte für den Parametersatz 1: $\delta = 180^\circ$, $\alpha = 0^\circ$. Die Spitzen sind charakteristisch für instabile Fibern. Sie beginnen bei 159 bp und wiederholen sich im Abstand von 10 bp welcher der helikalen Steigung der DNS entspricht.

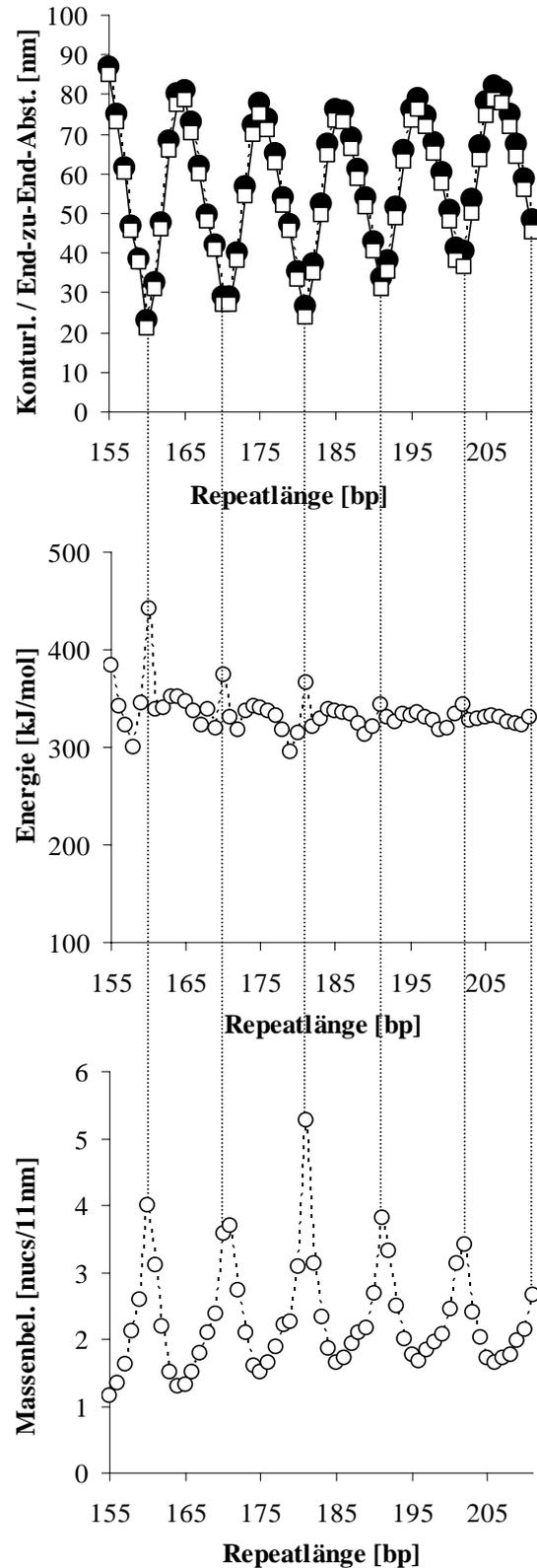


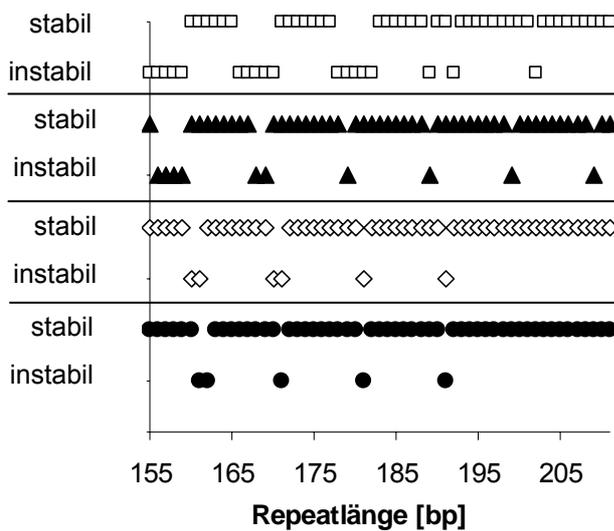
Abb. 5.3.5. Konturlänge (●), End-zu-End-Abstand (□), Energie und Massenbelegungsdichte für den Parametersatz 2: $\delta = 119^\circ$, $\alpha = 60^\circ$. Die Spitzen sind in diesem Parametersatz aufgrund der unterschiedlichen lokalen Geometrie gegenüber dem Parametersatz 1 aus Abb. 5.3.1 um 1-2 bp verschoben. Sie beginnen bei 161 bp und zeigen ebenfalls eine Periode von 10 bp.

und 210 bp in Schritten von 10 bp. Im Vergleich zu den geometrisch konstruierten Fibern von Sühnel ergab sich bei meinen Simulationen eine größere Anzahl stabiler Fibern (Abb. 5.3.6). Hauptgrund ist die Möglichkeit der Fiberelemente, Kollisionen durch thermische Fluktuationen zu vermeiden. Dies ist bei den geometrischen Strukturen unmöglich. Entropische Effekte sind dafür verantwortlich, dass die simulierten Strukturen stärker gebogen sind als die starren geometrischen Modelle.

Der Einfluss der lokalen Geometrie wird an den Ergebnissen von Parametersatz 2 deutlich (Abb. 5.3.5). Die Spitzen der Graphen sind um 1 – 2 bp zu höheren Repeatlängen verschoben. Analog zu Parametersatz 1 findet man die instabilen Fibern in Schritten von 10 bp bei Repeatlängen, die kleiner als 192 bp sind. Die thermischen Fluktuationen der Fiber ermöglichen es, bei Repeatlängen größer als 191 bp, Kollisionen zu vermeiden, so dass keine instabilen Fibern in diesem Bereich auftraten. Die charakteristische Fluktuation in den Parametern bleibt allerdings bestehen. Eine abnehmende Anzahl von instabilen Fibern für längere Repeatlängen wird sowohl in meinen Simulationen, als auch in den geometrischen Modellen beobachtet. Allerdings ist deren Gesamtzahl in meinen Simulationen etwas geringer, und die Strukturen sind aufgrund der Fluktuation gebogen. Die stabilen Strukturen mit der höchsten Massenbelegungsdichte von 3-4 Nuk/11nm sind ebenfalls um 2 bp zu höheren Repeatlängen verschoben und befinden sich zwischen 162 - 212 bp in Abständen von 10 bp.

Die Ergebnisse der Simulationen von Parametersatz 3 stimmen mit den Resultaten von Parametersatz 2 überein. Die geringe Vergrößerung des Anknüpfungswinkels gegenüber Parametersatz 2 zeigte in meinen Simulationen keine Wirkung auf die Stabilität der simulierten Chromatinfibern. Auch bei Simulationen von Chromatinfibern, welche aus 100 Nukleosomen bestanden oder statt des Gay-Berne-Potentials das Tails-Potential verwendeten, beobachtete ich erwartungsgemäß keinen Einfluss auf die Fiberstabilität. Die Repeatlängen, welche stabile bzw. instabile Konformationen aufwiesen, stimmten exakt mit den Repeatlängen aus den Simulationen mit Gay-Berne-Potential und 24 Nukleosomen überein. Allerdings ist die beobachtete maximale Massenbelegungsdichte der stabilen Strukturen von 3,5 Nukleosomen pro 11 nm sowohl in dem geometrischen Fibern, als auch in meinen Simulationen, relativ gering. Dagegen ergaben sich in früheren Simulationen (Abschnitt 5.1, Abschnitt 5.2) wesentlich höhere Werte, so dass ein Zusammenhang mit dem Potential unwahr-

scheinlich ist. Es ist zu vermuten, dass die Wahl der lokalen Parameter, z.B. Öffnungswinkel α , die Massenbelegungsdichte beeinflusst. Da es sich aber um relative Beobachtungen handelt kann davon ausgegangen werden, dass eine Erhöhung des Absolutwerts der Massenbelegungsdichte die beobachtete Periode von 10 bp für instabile Fibern nicht beeinflusst.



- ▲: Parametersatz 1: $\delta = 180^\circ$, $\alpha = 0^\circ$
- ◇: Parametersatz 2: $\delta = 119^\circ$, $\alpha = 60^\circ$
- : Parametersatz 3: $\delta = 126^\circ$, $\alpha = 60^\circ$
- : geometrisches Modell

Abb. 5.3.6. Übersicht der stabilen und instabilen Strukturen des geometrischen Modells sowie der drei simulierten Parametersätze.

Aufgrund von thermischen Fluktuationen werden Kollisionen vermieden, so dass weniger instabile Strukturen auftreten als beim geometrischen Modell. Bei höherer Repeatlänge nehmen die Kollisionen, und damit die Anzahl der instabilen Fibern, für alle Modelle ab. Alle Simulationen weisen instabile Strukturen im festen Abstand von 10 bp auf. Dieselben instabilen Strukturen finden sich auch in dem geometrischen Modell.

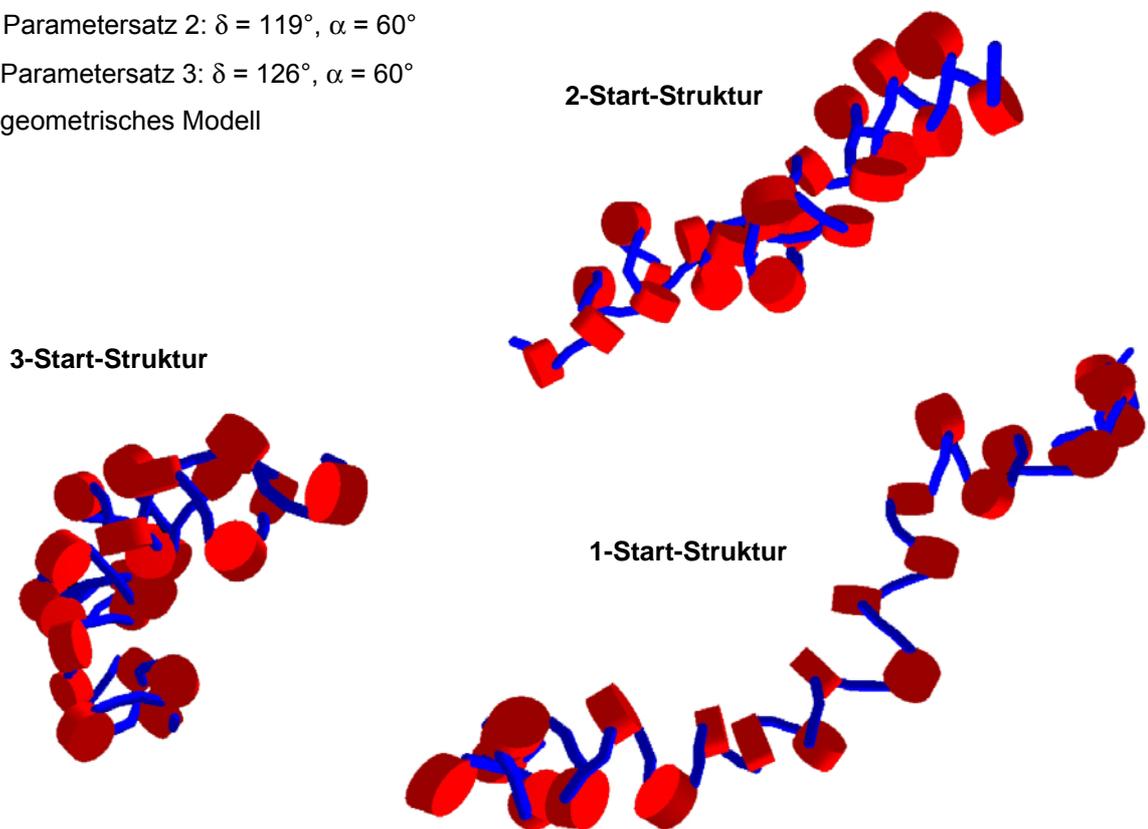


Abb. 5.3.7. Typische Faserkonformationen, die aufgrund der Verteilung des mittleren Abstands der Nucleosomen als 1-Start-, 2-Start- bzw. 3-Start-Struktur klassifiziert werden.

5.3.2 N-Start-Fibern

Um die Struktur der simulierten Chromatinfibern zu charakterisieren, analysierte ich ihre helikale Startstruktur. Eine n-Start-Fiber ist eine Struktur, in welcher der mittlere Abstand zwischen zwei Nukleosomen minimal ist, falls diese durch n-1 Nukleosomen getrennt werden. Das klassische Solenoidmodell der 30-nm-Chromatinfiber, in welchem die Nukleosomen einen helikalen Pfad beschreiben, ist ein Beispiel für ein typisches 1-Start-Modell. In diesem Fall besitzen die unmittelbar aufeinander folgenden Nukleosomen den minimalen Abstand durch die gesamte Fiber hinweg. Abb. 5.3.8 zeigt eine typische Verteilung der mittleren Abstände, um die Startstruktur einer Fiber zu bestimmen. In Abb. 5.3.7 sind repräsentative Fibern für die jeweilige Startstruktur dargestellt.

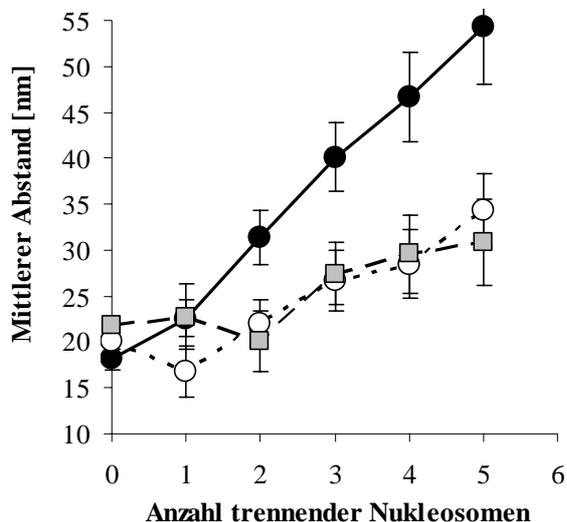


Abb. 5.3.8. Mittlere Abstandsverteilung der Nukleosomen für simulierte Fibern, die eine typische 1-, 2- oder 3-Start-Struktur aufweisen. Die Position des Minimums bestimmt die n-Start Struktur.

●: $l = 187$ bp, $\delta = 119^\circ$, $\alpha = 60^\circ$, 1-Start-Fiber

○: $l = 190$ bp, $\delta = 119^\circ$, $\alpha = 60^\circ$, 2-Start-Fiber

■: $l = 192$ bp, $\delta = 119^\circ$, $\alpha = 60^\circ$, 3-Start-Fiber

Während die Daten für Parametersatz 1 (Abb.5.3.9) bei kurzen Repeatlängen von 1-Start-Fibern dominiert werden, nimmt die Anzahl von 2-Start-Fibern bei höheren Repeatlängen zu. Insbesondere Fibern mit hoher Massenbelegungsdichte weisen eine 2-Start-Struktur auf und befinden sich im Bereich von $169 \text{ bp} \pm 2 \text{ bp}$ mit einer Periode von 10 bp. Es wurden keine 3-Start- oder höhere n-Start-Fibern bei diesem Parametersatz beobachtet.

Bei Parametersatz 2 konnte ich eine größere Anzahl 2-Start-Fibern beobachten, welche bei Repeatlängen von (160 ± 1) bp in Schritten von 10 bp für Repeatlängen kleiner als 175 bp auftraten und sonst bei (179 ± 1) bp in Schritten von 10 bp. Weiterhin ergaben sich 3-Start-Fibern für Repeatlängen größer als 180 bp im Bereich von (181 ± 1) bp in Schritten von 10 bp und hauptsächlich für Fibern mit hoher Massenbe-

legungsdichte. Allerdings sind nicht alle diese Fibern stabil (vgl. 5.3.3). Solche 3-Start-Fibern wurden auch in den geometrischen Modellen von Sühnel beobachtet.

Parametersatz 3 führt zu ähnlichen Ergebnissen wie Parametersatz 2. Allerdings sind die 2-Start- und 3-Start-Strukturen zum Teil um 1 bp verschoben. Auch die Gesamtzahl der 2-Start-Strukturen ist etwas geringer als bei Parametersatz 2.

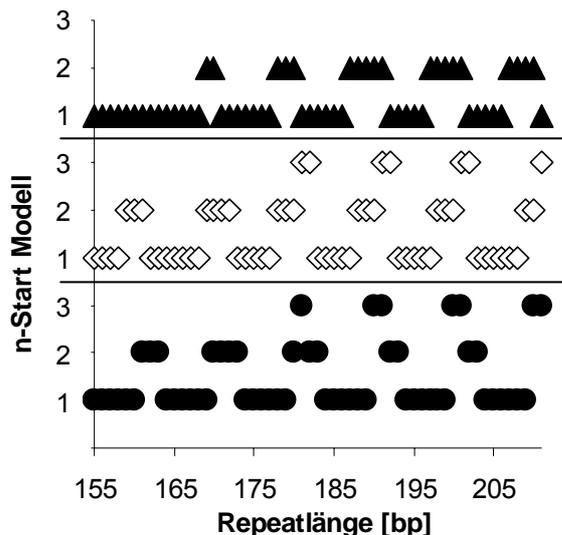


Abb. 5.3.9. Übersicht der n-Start-Strukturen der drei simulierten Parametersätze.

Für größere Repeatlängen nimmt die Anzahl der 1-Start-Strukturen ab. In Parametersatz 2 und 3 finden sich weniger 1-Start-Strukturen als in Parametersatz 1. Insbesondere treten hier 3-Start-Fibern auf, von denen allerdings nicht alle stabil sind. Ähnliche 3-Start-Strukturen wurden auch im geometrischen Modell beobachtet.

▲: Parametersatz 1: $\delta = 180^\circ$, $\alpha = 0^\circ$

◇: Parametersatz 2: $\delta = 119^\circ$, $\alpha = 60^\circ$

●: Parametersatz 3: $\delta = 126^\circ$, $\alpha = 60^\circ$

5.3.3 Einfluss des Anknüpfungswinkels δ

Abschließend untersuchte ich, welchen Einfluss die Anknüpfungspunkte der Linker-DNS am Nukleosom-Zylinder auf die strukturellen Parameter der 30-nm-Chromatinfiber besitzen. Hierzu variierte ich systematisch den Anknüpfungswinkel δ . Dies ist insbesondere für die Erweiterung des Modells interessant, um z.B. das Abwickeln der Nukleosomen zu integrieren. Für die Simulationen ging ich, analog zu Parametersatz 2, von der Kristallstruktur des Tetranukleosoms [8] aus. Seine Repeatlänge beträgt 167 bp, wobei 147 bp an das Nukleosom gebunden sind. Die gebundene DNS ist 1,67-mal um das Nukleosom gewunden, so dass die Anknüpfungspunkte der Linker-DNS einen Anknüpfungswinkel δ von ca. 119° bilden. Die Fibern bestanden aus 100 Nukleosomen ohne Stamm-Motiv.

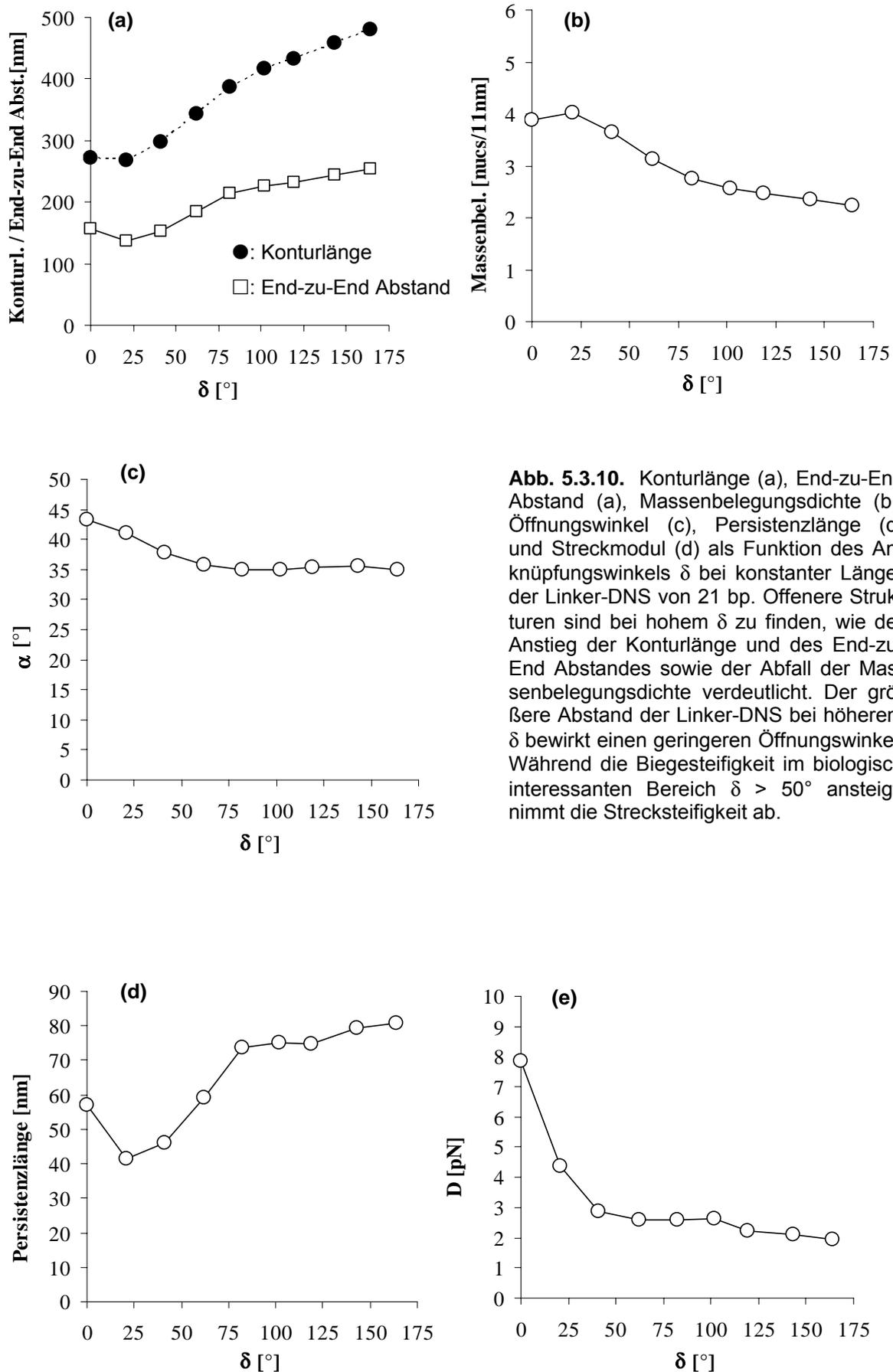


Abb. 5.3.10. Konturlänge (a), End-zu-End Abstand (a), Massenbelegungsdichte (b), Öffnungswinkel (c), Persistenzlänge (d) und Streckmodul (d) als Funktion des Anknüpfungswinkels δ bei konstanter Länge der Linker-DNS von 21 bp. Offener Strukturen sind bei hohem δ zu finden, wie der Anstieg der Konturlänge und des End-zu-End Abstandes sowie der Abfall der Massenbelegungsdichte verdeutlicht. Der größere Abstand der Linker-DNS bei höherem δ bewirkt einen geringeren Öffnungswinkel. Während die Biegesteifigkeit im biologisch interessanten Bereich $\delta > 50^\circ$ ansteigt, nimmt die Strecksteifigkeit ab.

In einer ersten Simulationsreihe wurde die Linkerlänge konstant gehalten und der Anknüpfungswinkel systematisch variiert (Abb. 5.3.10). Liegen die beiden Anknüpfungspunkte der Linker-DNS weit auseinander, d.h. der Anknüpfungswinkel δ ist sehr groß, dann führt dies zu etwas offeneren Strukturen. Dies wird auch am ansteigenden Verlauf der Konturlänge und des End-zu-End-Abstandes bei steigendem Anknüpfungswinkel deutlich, wobei die Parameter sich um ca. 40 % ändern. Entsprechend nimmt die Massenbelegungsdichte ebenfalls um 40 % ab.

Auch der Öffnungswinkel der Linker-DNS nimmt bei größeren Abständen der Anknüpfungspunkte um ca. 20 % geringere Werte an. Dies ist zu erwarten, da die elektrostatische Abstoßung der Linker-DNS-Segmente, welche den Öffnungswinkel dominiert, vom Abstand abhängt. Die Persistenzlänge der Fiber fällt zunächst leicht ab, steigt aber anschließend an, so dass die Biegesteifigkeit im biologisch interessanteren Bereich von $\delta > 50^\circ$ um ca. 30 % zunimmt. Dagegen nimmt der rein entropische, zunächst stark abfallende, Streckmodul der Fiber in diesem Bereich um ca. 30 % ab, d.h. die Fiber ist leichter zu dehnen.

In einer weiteren Simulationsreihe wurde der biologisch interessantere Fall simuliert. Dabei blieb die Repeatlänge von 167 bp fixiert, so dass die Länge der Linker-DNS in Abhängigkeit ihrer symmetrischen Anknüpfungspunkte bzw. vom Anknüpfungswinkel δ variierte (Abb. 5.3.11). Der Torsionswinkel β aufeinander folgender Nukleosomen wurde aufgrund der unveränderten Repeatlänge konstant gehalten.

Übereinstimmend mit der vorherigen Simulationsreihe, nimmt die Fiber bei größeren Anknüpfungswinkeln eine offener Struktur an. Dies wird an dem ca. 30 %-igen Anstieg der Konturlänge und dem ca. 20 %-igen Abfall der Massenbelegungsdichte deutlich. Auch der um ca. 30 % größere Öffnungswinkel der Linker-DNS weist darauf hin. Der Öffnungswinkel wird von der stärkeren Abstoßung aufgrund der längeren Linker-DNS dominiert. Die in den vorherigen Simulationen beobachtete Reduzierung des Öffnungswinkels durch den größeren Abstand der Linker-DNS-Segmente spielt nur noch eine untergeordnete Rolle.

Auffallend ist der, im Gegensatz zur Konturlänge, nahezu konstante End-zu-End-Abstand, welcher sich nur um ca. 3 % verändert. Dies verdeutlicht, dass die, bei weit entfernten Anknüpfungspunkten, beobachteten, offenen Fibern wesentlich flexibler

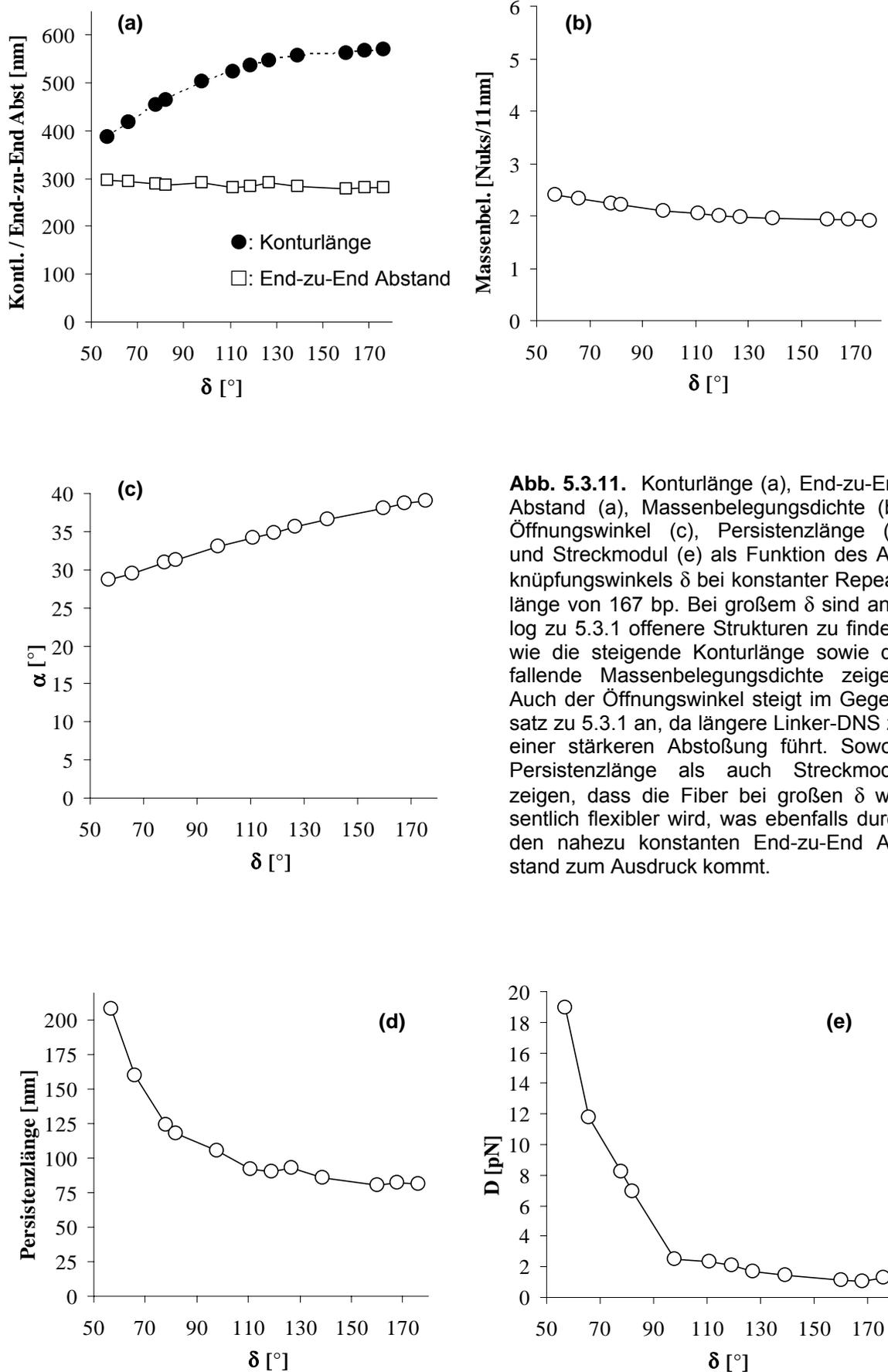


Abb. 5.3.11. Konturlänge (a), End-zu-End Abstand (a), Massenbelegdichte (b), Öffnungswinkel (c), Persistenzlänge (d) und Streckmodul (e) als Funktion des Anknüpfungswinkels δ bei konstanter Repeatlänge von 167 bp. Bei großem δ sind analog zu 5.3.1 offenere Strukturen zu finden, wie die steigende Konturlänge sowie die fallende Massenbelegdichte zeigen. Auch der Öffnungswinkel steigt im Gegensatz zu 5.3.1 an, da längere Linker-DNS zu einer stärkeren Abstoßung führt. Sowohl Persistenzlänge als auch Streckmodul zeigen, dass die Fiber bei großen δ wesentlich flexibler wird, was ebenfalls durch den nahezu konstanten End-zu-End Abstand zum Ausdruck kommt.

sind. Auch die Persistenzlänge und der entropische Streckmodul, die beide bei steigendem Anknüpfungswinkel um jeweils 50 % bzw. 90 % abfallen, weisen auf flexible Fibern bei weit entfernten Anknüpfungspunkten hin.

Eine Berücksichtigung der Wechselwirkung zwischen Nukleosom und der gebundenen DNS ist im verwendeten Programm nicht implementiert. Allerdings ist bekannt, dass die Anzahl der gebundenen Basenpaare ohne große energetische Strafe um wenige Basenpaare variieren kann. Wird der Bereich der Analyse auf die Variation von 5 gebundenen Basenpaare auf 147 ± 5 bp beschränkt ($\delta = 89^\circ - 139^\circ$), so zeigt sich auch hier eine Änderung der Konturlänge um ca. 10 % und der Massenbelegungs-dichte um ca. 7%. Dabei bleibt der End-zu-End-Abstand nahezu konstant und schwankt nur maximal um 1 %. Persistenzlänge und Streckmodul ändern sich in diesem Bereich um ca. 20 % bzw. 40 %. Die Ablösung von wenigen Basenpaaren führt also in meinen Simulationen bereits zu einer signifikanten Erhöhung der Fiberflexibilität.

5.3.4 Diskussion

Ausgehend von den Kristallstrukturen des Mono- und Tetranukleosoms [6, 8], konnte ich übereinstimmend mit den geometrisch konstruierten Chromatinfibern von Sühnel demonstrieren, dass nach einer thermodynamischen Äquilibrierung instabile Fibern nur bei bestimmten Repeatlängen auftreten. Diese wiederholten sich periodisch im Abstand von 10 bp, welcher gerade der helikalen Steigung der DNS entspricht. Weiterhin beobachtete ich Chromatinfibern mit besonders hoher Kompaktierung in dem gleichen periodischen Abstand von 10 bp. Dies legt die Vermutung nahe, dass gerade diese Repeatlängen bevorzugt in Organismen vorkommen, d.h. die Repeatlänge sowie die Linkerlänge sind quantisiert.

Auch experimentelle Daten lassen auf eine derartige Quantisierung schließen. So weisen z.B. Gelbanden aus der Untersuchung von einsträngiger DNS Produkten, die von Dinukleosomen stammten, Abstände von 10 bp auf [77]. Weiterhin wurden bei der Verdauung von Chromatin durch DNase I und DNase II Banden mit der Periode $10n + 5$ bp [74-76] beobachtet, wobei ein ähnliches Experiment zwar ein quantisiertes Verhalten, allerdings mit einer Verschiebung von -1 bis -3 bp [189] aufwies. In anderen Studien [190-192] wurden keine Verschiebung beobachtet. Dies ist nicht

unbedingt ein Widerspruch zur Quantisierung mit der Periode von 10 bp, da in diesen Experimenten die Restriktionsenzyme nicht immer exakt am Ein- und Ausgangspunkt der Nukleosomen schnitten, sondern überall auf der Linker-DNS. Genauere Restriktionsexperimente wurden an Dinukleosomen durchgeführt die mittels *Micrococcal* Nuklease hergestellt und deren Enden präzise entfernt wurden [75]. Die dabei beobachtete breite Bande wies aufgrund einer höheren Auflösung, im Vergleich zu früheren Studien [193, 194], Spitzen im Abstand von 10 bp auf und spricht deutlich für die in meinen Simulationen gefundene Repeatlängenperiode.

Die von uns beobachtete Quantisierung stimmt gut mit Ergebnissen von Widom *et al.* [73] überein. Er etabliert eine Repeatlängenperiode von 10 bp, indem er Resultate aus verschiedenen Experimenten zur Bestimmung der Repeatlänge von mehreren Organismen zusammenfasste und systematisch untersuchte. Den geometrischen Modellen gelingt es nicht die von Widom beobachtete Quantisierung bei großen Repeatlängen zu erklären, da keine sterischen Überlappungen mehr vorkommen. Dagegen zeigen alle Parametersätze aus meinen Simulationen, dass die lokale Geometrie bei bestimmten Repeatlängen periodisch zu einer höheren bzw. niedrigeren Kompaktierung führt. Dies gilt auch für lange Repeatlängen, da in diesem Fall die Wechselwirkungen noch von der lokalen Geometrie beeinflusst werden. Bedenkt man, dass eine hohe Kompaktierung für einen Organismus von Vorteil ist, könnten diese Repeatlängen in der Natur bevorzugt zu finden sein und somit die von Widom beobachtete Quantisierung erklären.

Natürlich ist zu bemerken, dass der Wert für die Quantisierungsperiode von 10 bp nur im Modell exakt ist. Widom gibt in Abhängigkeit der betrachteten experimentellen Datensätze und ihrer Fehlerangaben einen Wert zwischen 9,5 bp und 10,5 bp an. Insbesondere bei großen Repeatlängen existieren nur wenige Messungen, so dass hier entsprechend flache Maxima in der Wahrscheinlichkeitsverteilung zu erkennen sind. Dabei räumt er ein, dass einige der von ihm verwendeten experimentellen Daten, durchaus falsch sein könnten. Eine Identifizierung und Elimination dieser Daten würde eine wesentlich genauere Bestimmung der Periode ermöglichen. Weiterhin ist nicht auszuschließen, dass genetische Zwangsbedingungen zu Abweichungen von der bevorzugten Repeatlänge führen. So können etwa Proteine, die für die Regulation von Transkription und Replikation eine wichtige Rolle spielen, zu einer Abwei-

chung führen oder spezielle DNS-Sequenzen, die eine bestimmte Positionierung der Nukleosomen bevorzugen.

Übereinstimmend mit den geometrischen Modellen von Sühnel, beobachtete ich in meinen Simulationen weitgehend 1- und 2-Start-Modelle sowie in den Parametersätzen 2 und 3 überraschenderweise 3-Start-Modelle. Die 2-Start-Modelle treten hauptsächlich bei Repeatlängen mit hohen Massenbelegungsdichten auf und besitzen eine irreguläre dreidimensionale Zickzackstruktur mit nahezu gerader Linker-DNS. Dies stimmt mit dem, in der Einleitung besprochenem, Zickzackmodell überein. 1-Start-Strukturen dagegen sind in den gestreckten Fibern geringer Kompaktierung zu finden und besitzen aufgrund ihrer gestreckten Linker-DNS mehr Ähnlichkeit mit dem Zickzackmodell als mit dem Solenoidmodell. 3-Start-Strukturen sind Fibern mit sehr hoher Massenbelegungsdichte und mehrheitlich instabil. In Experimenten ist noch keine 3-Start-Strukturen beobachtet worden. Dies mag daran liegen, dass die wenigen stabilen 3-Start-Strukturen meistens im Fehlerbereich einer entsprechenden 2-Start-Struktur zu finden sind. Meine Ergebnisse zeigen, dass die Start-Struktur der Chromatinfiber von der betrachteten Repeatlänge abhängt. Da diese innerhalb der Chromatinfiber nicht konstant ist, sondern durchaus um mehrere Basenpaare variieren kann, lässt sich vermuten, dass die Chromatinfiber lokal beide Startstrukturen annehmen kann. Dies würde auch die verschiedenen Experimente, die für ein 1-Start [55, 62, 79, 80] bzw. 2-Start-Modelle [9, 69, 106-110] sprechen, verständlich machen.

Eine systematische Variation des Anknüpfungswinkels δ zeigte, dass ein steigender Abstand der Anknüpfungspunkte der Linker-DNS am Nukleosom zu offeneren und flexibleren Strukturen führt. Dies wurde bereits bei einer geringen Änderung der gebundenen Basenpaarenanzahl von weniger als 5 bp bei fester Repeatlänge beobachtet. Eine lokale Ablösung der DNS aufgrund thermischer Fluktuationen in einem Teilbereich der Fiber kann somit eine erhebliche Erleichterung für die lokale Zugänglichkeit und Remodellierung der Fiber bedeuten.

An meinen Ergebnissen wird deutlich, dass geometrische Modelle durchaus wichtige Eigenschaften des Chromatins aufdecken können, eine realistische Einschätzung dieser Resultate kann allerdings erst durch thermodynamische Äquilibrierung erfolgen. So wäre durchaus zu erwarten gewesen, dass die Chromatinfiber aufgrund der thermischen Fluktuationen in der Lage ist, sämtlichen Überlappungen „auszuwei-

chen“ und somit keine instabilen Fibern zustande kommen. Entscheidend ist jedoch der Einfluss der lokalen Geometrie auf die Wechselwirkungen. Dadurch entstehen zwar instabile Fibern, allerdings weit weniger als von dem geometrischen Modell vorhergesagt wird. Um möglichst realistische Ergebnisse zu erhalten, ist notwendig, die Wechselwirkungen kontinuierlich zu verbessern. So wäre es z.B. wünschenswert eine realistische Interaktion zwischen DNS und Nukleosomen zu implementieren, um etwa die Ablösung des Nukleosoms in diesem Modell zu simulieren.

Kapitel 6

Zusammenfassung und Ausblick

In den vergangenen Jahren wurde deutlich, dass strukturelle Veränderungen, wie die Kondensation, Dekondensation und Remodellierung des Chromatins eine wichtige Rolle spielen. Sie beeinflussen z.B. die Regulation biologischer Prozesse wie Transkription, Replikation, Rekombination, DNS-Reparatur und Zellteilung. Um diese Mechanismen zu verstehen, ist es notwendig, strukturelle Eigenschaften der Chromatinfiber zu kennen und ein fundamentales Verständnis von der Anordnung der Nukleosomen zu erlangen. In dieser Arbeit wurde ein neuartiges physikalisches Modell der 30-nm-Chromatinfiber entwickelt, welches gut mit strukturellen Parametern wie Massenbelegungsdichte, Persistenzlänge und Streckmodul aus Streck- und Kompaktierungsexperimenten übereinstimmt.

Die Chromatinfiber wird durch eine flexible Polymerkette modelliert, bei der oblate Ellipsoide die Nukleosomen repräsentieren. Die lokale Geometrie der Fiber basiert auf dem „Zwei-Winkel-Modell“ und wird durch die Länge der Linker-DNS l , den Öffnungswinkel α zwischen den Linker-DNS-Strängen, dem Torsionswinkel β zwischen aufeinander folgenden Nukleosomen sowie dem Anknüpfungswinkel δ der Linker-DNS definiert. Die elastischen Wechselwirkungen zwischen zwei DNS-Linker-Segmenten bzw. DNS-Linker-Segment und Nukleosom-Segment werden als harmonisch angenommen. Zur Beschreibung der Elektrostatik zwischen der Linker-DNS wird die Debye-Hückel-Approximation verwendet. Die Interaktion zwischen den Nukleosomen bei einer physiologischen Salzkonzentration wird zunächst durch das Gay-Berne-Potential approximiert. Der Einfluss des Linker-Histons auf die lokale Geometrie der Fiber modelliert ein Stamm-Motiv. Die Anwendung des Monte-Carlo-Algorithmus von Metropolis erlaubt es, repräsentative Fiberkonformationen im thermodynamischen Gleichgewicht zu erzeugen.

Die Strecksimulationen von 100-Nukleosom-langen Fibern zur Untersuchung der Biege- und Strecksteifigkeit der 30-nm-Chromatinfiber zeigten, dass ihre Flexibilität entscheidend von der lokalen Geometrie beeinflusst wird. Unabhängig von der Präsenz eines Stamm-Motivs nimmt sowohl die Persistenzlänge als auch der Streckmodul ab, wenn die Repeatlänge im simulierten Bereich um 10 bp steigt, der Öffnungswinkel von 22° auf 34° zunimmt oder der Torsionswinkel von 130° auf 90° abnimmt. Fibern mit Stamm-Motiv erwiesen sind kompakter und steifer als Fibern ohne Stamm-Motiv. Die Werte für Persistenzlänge und Streckmodul aus meinen Simulationen stimmen gut mit experimentellen Daten überein. Schließlich konnte ich zeigen, dass sich die Chromatinfiber nicht wie ein homogener, isotropischer, elastischer Stab mit kreisförmigem Querschnitt verhält, sondern wesentlich leichter zu biegen als zu dehnen ist. Dies begünstigt die Bildung von Schleifen, wie sie in Experimenten und teilweise in meinen Simulationen beobachtet wurden.

Simulationen mit dem salzunabhängigen Gay-Berne-Potential erzielten keine ausreichende Entfaltung der Chromatinfiber bei niedrigen Salzkonzentrationen. Deshalb wurde es durch ein neues, empirisches Tails-Potential ersetzt, welches die salzabhängige Ausdehnung der Histon-Tails berücksichtigt. Während beide Potentiale bei physiologischer Salzkonzentration gut übereinstimmen, konnte bei dem Tails-Potential eine höhere Kompaktierung beobachtet werden. Diese steht im Einklang mit den experimentellen Ergebnissen. Hauptursache für die Kompaktierung in meinen Simulationen ist die reduzierte elektrostatische Abstoßung zwischen Nukleosomen durch die entfalteten Histon-Tails bei hohen Salzkonzentrationen. Dieser „Tail-Bridging“-Effekt wird auch in Experimenten und in anderen Simulationen beobachtet. Er könnte die Ursache für die größere Flexibilität der simulierten Fibern bei hohen Salzkonzentrationen sein. Sowohl Persistenzlänge als auch Streckmodul nehmen bei hohen Salzkonzentrationen ab. Unabhängig von der Salzkonzentration wiesen Fibern mit Stamm eine höhere Kompaktierung auf, als entsprechende Fibern ohne Stamm. Der Durchmesser der simulierten Fibern änderte sich mit der Salzkonzentration nur unwesentlich, so dass kein Phasenübergang zu einem 10-nm-Filament festzustellen war. Dies könnte auf eine höhere Organisationsstruktur bei niedriger Salzkonzentration hinweisen.

Schließlich konnte ich in meinen Simulationen, übereinstimmend mit geometrisch konstruierten Modellen, demonstrieren, dass auch im thermodynamischen Gleichge-

wicht nur bei bestimmten Repeatlängen instabile Fibern bzw. Fibern besonders hoher Massenbelegungsichte vorkommen. Diese Repeatlängen treten in periodischen Abständen von 10 bp auf, was gerade der helikalen Steigung der DNS entspricht. Eine derartige Quantisierung der Repeatlänge wird auch experimentell in verschiedenen Organismen beobachtet. Einige der simulierten Fibern mit besonders hoher Massenbelegungsichte wiesen, neben 1- und 2-Start-Strukturen, auch 3-Start-Strukturen auf, wobei letztere im Fehlerbereich der 2-Start-Strukturen zu finden waren. Weitere Simulationsreihen, die systematisch den Einfluss der Linker-DNS-Anknüpfungspunkte untersuchten, zeigten, dass eine Vergrößerung des Anknüpfungswinkels bei konstanter Repeatlänge zu offeneren und flexibleren Strukturen führten.

Zusammenfassend lässt sich aus diesen Ergebnissen schließen, dass Eigenschaften der 30-nm-Fiber in meinem Modell gut mit denen der realen Fibern übereinstimmen und realistische, quantitative Aus- sowie Voraussagen über ihre Strukturparameter gemacht werden können.

Natürlich ist das verwendete Modell nur eine grobe Beschreibung der realen Chromatinfiber. Von entscheidender Bedeutung für die Verbesserung des Modells sind die Potentiale der Wechselwirkungen, insbesondere der Nukleosom-Nukleosom-Interaktion. Unsere Arbeitsgruppe arbeitet im Rahmen eines Multiskalen-Ansatzes an einer exakteren Beschreibung dieser Wechselwirkung. Durch Molekulardynamik-Simulationen einzelner Nukleosomen sollen die, für die Interaktion wichtigen, Teilbereiche identifiziert werden und somit als Grundlage für ein realistischeres Potential dienen. Weiterhin wäre es wünschenswert, einzelne Modifikationen an den Histon-Tails, z.B. die Ladungsreduzierung durch Acetylierung in das Tails-Potential zu integrieren. Dadurch kann ihre Rolle bei der Genregulation und Epigenetik genauer untersucht werden.

Um Streckexperimente [128, 129] bei höheren Streckkräften als 20 pN im verwendeten Modell zu interpretieren, ist es notwendig, eine DNS-Nukleosom-Wechselwirkung zu integrieren. Dadurch lässt sich das Problem der Nukleosom-Abwicklung untersuchen. Als Basis hierfür können z.B. die theoretischen Betrachtungen von Kulic et al. [195] dienen. Ein entsprechender Ansatz wurde bereits in unserer Gruppe verwendet, um die Abwicklung eines einzelnen Nukleosoms mittels Brownscher-Dynamik zu simulieren. Das in dieser Arbeit verwendete Programm sieht entsprechende Ob-

jekte und Methoden für die Brownsche-Dynamik bereits vor. Allerdings müssen die entsprechenden Algorithmen noch implementiert werden. Während die Monte-Carlo-Simulation keine zeitliche Information beinhaltet, ließe sich mit Hilfe der Brownschen-Dynamik die Dynamik der Chromatinfiber, z.B. die Kompaktierung bei verschiedenen Salzkonzentrationen oder ihre Diffusion, untersuchen. Auch Remodellierungen der Fiber finden in Zeitbereichen statt die im Rahmen der Brownschen-Dynamik analysiert werden können.

Im Zusammenhang mit der Nukleosom-Abwicklung kann es von Bedeutung sein, das Nukleosom nicht als kompakte Einheit zu modellieren, sondern seine Zusammensetzung aus dem H3-H4 Tetramer und den beiden H2A-H2B Dimeren zu berücksichtigen. Aktuelle Studien durch Claudet *et al.* [196] weisen darauf hin, dass nicht unbedingt das komplette Oktamer abgewickelt wird, sondern z.B. bei einer sehr geringen Konzentration von Nukleosomen, nur die Dimere entfernt werden.

Analog zur Untersuchungen der DNS könnten die superhelikalen Eigenschaften der Chromatinfiber anhand des in dieser Arbeit verwendeten Modells analysiert und mit experimentellen Daten verglichen werden. Hierzu müsste die Fiber zu einem geschlossenen Kreis zusammengeführt und entsprechend über- bzw. unterwunden werden.

Durch das Hinzufügen einer externen Torsionskraft sollte es möglich sein, mit dem Modell Torsionsmodule zu bestimmen. Diese ließen sich mit Studien vergleichen, die Chromatin mit Hilfe von magnetischen Pinzetten verdrillen Werte [188].

Für das Verständnis der nächst höheren Kompaktierungsebene ist es interessant zu analysieren, wie sich die Eigenschaften der Chromatinfiber verändern, wenn zwei oder mehr Fibern die Möglichkeit gegeben wird miteinander zu interagieren. Allerdings muss gewährleistet werden, dass die Fibern zusammen zu bleiben. Dies kann z.B. durch ein stark abfallendes Potential realisiert werden, welches die Fibern umschließt. Von großem Interesse sind dabei sowohl die Anordnungen der Nukleosomen der beiden Fibern, als auch deren strukturelle Eigenschaften.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1.	Überblick über die verschiedenen ...	2
Abbildung 1.2.	DNS-Doppelstranghelix in der B-Form ...	4
Abbildung 1.3.	Kristallstruktur des Nukleosom-Core-Partikels ...	5
Abbildung 1.4.	N- und C-terminale Histon-Tails ...	7
Abbildung 1.5.	(a) zeigt ein vom Autor zur Kristallstruktur ...	11
Abbildung 1.6.	Aufnahmen von Hühnererythrozyten mit ...	12
Abbildung 1.7.	Elektronenmikroskopische Aufnahme einer ...	14
Abbildung 1.8.	Visualisierung des Solenoidmodells (a) und des ...	16
Abbildung 2.1.	Skizze einer idealen Zufallskette	22
Abbildung 3.1.	Die Chromatinfiber wird durch eine flexible ...	36
Abbildung 3.2.	Visualisierung der Geometrie basierend ...	37
Abbildung 3.3.	Kettengeometrie und lokale Koordinatensysteme ...	38
Abbildung 3.4.	Definition des Torsionswinkels ...	39
Abbildung 3.5.	Definition des Biegevektors ...	39
Abbildung 3.6.	Veranschaulichung der Geometrie des Nukleosoms ...	40
Abbildung 3.7.	Berechnung der gebundenen DNS für ...	41
Abbildung 3.8.	Skizze eines Pivot- und eines Rotations-Schritts ...	43
Abbildung 3.9.	Schematische Darstellung der kolumnalen ...	52
Abbildung 3.10.	Verlauf des Gay-Berne-Potentials mit ...	53
Abbildung 3.11.	Verlauf der Gesamtenergie des Tails-Potentials ...	59
Abbildung 3.12.	Visualisierung der Geometrie des erweiterten Modells ...	60
Abbildung 3.13.	Veranschaulichung der Lage des ...	61
Abbildung 4.1.	Mittlerer effektiver Öffnungswinkel ...	63

Abbildung 4.2.	Typische Strecksimulation einer Fiber ...	64
Abbildung 4.3.	Schematische Skizze zur Berechnung der Kontur ...	68
Abbildung 4.4.	Persistenzlänge (a) und Streckmodul (b) als Funktion ...	69
Abbildung 4.5.	Schematische Skizze der zum Rückgrat ...	69
Abbildung 5.1.1.	Persistenzlänge L_p bestimmt mit Hilfe der Fluktuation	80
Abbildung 5.1.2.	Anpassung von Gl. (4.9), welche den ...l	81
Abbildung 5.1.3.	Anpassung der Porod-Kratky-Gl. (4.9) des ...	81
Abbildung 5.1.4.	Die Persistenzlänge für verschiedene Repeatlängen ...	82
Abbildung 5.1.5.	Gesamtenergie einer 100 Nukleosomen ...	83
Abbildung 5.1.6.	Abbildung (a) zeigt die Streckkraft als Funktion ...	84
Abbildung 5.1.7.	Kraft-Extensionskurve einer 100...	85
Abbildung 5.1.8.	Streckmodul ε für Simulationen ohne ...	86
Abbildung 5.1.9.	Streckmodul ε bestimmt durch Anpassung ...	87
Abbildung 5.1.10.	Darstellung der Persistenzlänge für verschiedene ...	89
Abbildung 5.1.11	Analyse des Einflusses eines vorhandenen Stamms ...	90
Abbildung 5.2.1.	Massenbelegungsdichte als Funktion der ...	97
Abbildung 5.2.2.	Potentialverlauf des Tails-Potentials für verschiedene ...	98
Abbildung 5.2.3.	Potentialverlauf des Tails-Potentials im Vergleich ...	99
Abbildung 5.2.4.	Die Simulationen, welche die nukleosomale ...	100
Abbildung 5.2.5.	Typische äquilibrierte Konformationen ...	101
Abbildung 5.2.6.	Massenbelegungsdichte für Fibern ...	103
Abbildung 5.2.7.	Massenbelegungsdichte für Fibern ...	103
Abbildung 5.2.8.	Konturlänge (a), End-zu-End-Abstand (b), ...	104
Abbildung 5.2.9.	Sedimentationskoeffizient (a), Persistenzlänge (b) ...	105
Abbildung 5.2.10.	Sedimentationskoeffizient als Funktion der ...	106
Abbildung 5.2.11.	Massenbelegungsdichte als Funktion der ...	108

Abbildung 5.2.12.	Sedimentationskoeffizient als Funktion der ...	109
Abbildung 5.3.1.	Geometrische Konstruktion einer Chromatinfiber ...	111
Abbildung 5.3.2.	Visualisierung der lokalen Geometrie ...	112
Abbildung 5.3.3.	Typische stabile (a) und instabile ...	114
Abbildung 5.3.4.	Konturlänge (●), End-zu-End-Abstand (□), ...	115
Abbildung 5.3.5.	Konturlänge (●), End-zu-End-Abstand (□), ...	115
Abbildung 5.3.6.	Übersicht der stabilen und instabilen ...	117
Abbildung 5.3.7.	Typische Strukturen, die aufgrund der Verteilung des ...	117
Abbildung 5.3.8.	Mittlere Abstandsverteilung der Nukleosomen ...	118
Abbildung 5.3.9.	Übersicht der n-Start-Strukturen der ...	119
Abbildung 5.3.10.	Konturlänge (a), End-zu-End Abstand ...	120
Abbildung 5.3.11.	Konturlänge (a), End-zu-End Abstand ...	122

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1.	Übersicht über die Repeatlängen einiger ...	13
Tabelle 3.1.	Übersicht über die Parameter des ...	57
Tabelle 5.1.	Übersicht der in der Simulation ...	80
Tabelle 5.2.	Persistenzlänge $L_{p, A1}$ berechnet aus den ...	93
Tabelle 5.3.	Streckmodul berechnet aus der Kurvenanpassung ...	94

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
bp	Basenpaare (basepairs)
DiSCO	Discrete Surface Charge Optimization
DLVO	Derjaguin-Landau-Verwy-Overbeek
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dsDNS	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
EM	Elektronenmikroskopie
Gl.	Gleichung
H1, H5, usw.	Histon 1, Histon 5, usw.
HMG	high mobility group
MENT	myeloid and erythroid nuclear termination stage-specific protein
NCP	Nukleosom-Core-Partikel
STEM	Rastertunnelelektronenmikroskopie (scanning transmission electron microscopy)
SWI/SNF.	switch / sniff Protein

usw.	und so weiter
vgl.	vergleiche
WLC	wurmartige Kette (worm like chain)
z.B.	zum Beispiel

Literaturverzeichnis

1. Pollard, T.D., *Cell Biology*. 2004, Philadelphia: Saunders.
2. Schiessel, H., *The physics of chromatin*. Journal of Physics: Condensed Matter, 2003. **15**: p. R699-R774.
3. Wedemann, M.G., *Simulation von Struktur und Strukturregulation von Chromatin*. 1999, Bergische Universität-Gesamthochschule Wuppertal: Wuppertal. p. 131.
4. Alberts, B., et al., *Molekularbiologie der Zell*. 4. Auflage ed, ed. L. Jaenicke. 2004, Weinheim: WILEY-VCH Verlag. 1-1800.
5. Wolffe, A., *Chromatin: Structure and Function*. 2 ed. 1995, London: Academic Press.
6. Davey, C.A., et al., *Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 Å resolution*. J Mol Biol, 2002. **319**(5): p. 1097-113.
7. Luger, K., et al., *Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution*. Nature, 1997. **389**: p. 251-260.
8. Schalch, T., et al., *X-ray structure of a tetranucleosome and its implications for the chromatin fibre*. Nature, 2005. **436**(7047): p. 138-141.
9. Bednar, J., et al., *Nucleosomes, linker DNA, and linker histone form a unique structural motif that directs the higher-order folding and compaction of chromatin*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 1998. **95**(24): p. 14173-14178.
10. Newton, G., *The human genome: Quick facts*. 2005.
11. van Holde, K.E., *Chromatin*. 1989, Heidelberg: Springer.
12. Widom, J., *Structure, dynamics, and function of chromatin in vitro*. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 1998. **27**: p. 285-327.
13. Olins, A.L. and D.E. Olins, *Spheroid chromatin units (v bodies)*. Journal of Cell Biology, 1973. **59**: p. 252a.

14. Olins, A.L. and D.E. Olins, *Spheroid chromatin units (v bodies)*. Science, 1974. **183**(122): p. 330-2.
15. Woodcock, C.L.F., *Ultrastructure of inactive chromatin*. Journal of Cell Biology, 1973. **59**: p. 368a.
16. Noll, M. and R.D. Kornberg, *Action of micrococcal nuclease on chromatin and the location of histone H1*. J Mol Biol, 1977. **109**(3): p. 393-404.
17. Simpson, R.T., *Structure of the chromatosome, a chromatin particle containing 160 base pairs of DNA and all the histones*. Biochemistry, 1978. **17**(25): p. 5524-31.
18. Allan, J., et al., *The structure of histone H1 and its location in chromatin*. Nature, 1980. **288**(5792): p. 675-9.
19. Richmond, T.J. and C.A. Davey, *The structure of DNA in the nucleosome core*. Nature, 2003. **423**(6936): p. 145-50.
20. Mateescu, E.M., C. Jeppesen, and P. Pincus, *Overcharging of a spherical macroion by an oppositely charged polyelectrolyte*. Europhysics Letters, 1999. **46**(4): p. 493-498.
21. Park, S.Y., R.F. Bruinsma, and W.M. Gelbart, *Spontaneous overcharging of macro-ion complexes*. Europhysics Letters, 1999. **46**(4): p. 454-460.
22. Khrapunov, S.N., et al., *Mechanisms of stabilizing nucleosome structure. Study of dissociation of histone octamer from DNA*. Biochimica Et Biophysica Acta-Genet Structure and Expression, 1997. **1351**(1-2): p. 213-222.
23. Polach, K.J. and J. Widom, *A model for the cooperative binding of eukaryotic regulatory proteins to nucleosomal target sites*. J Mol Biol, 1996. **258**(5): p. 800-12.
24. Anderson, J.D. and J. Widom, *Sequence and position-dependence of the equilibrium accessibility of nucleosomal DNA target sites*. J Mol Biol, 2000. **296**(4): p. 979-87.
25. Luger, K. and T.J. Richmond, *The histone tails of the nucleosome*. Curr Opin Genet Dev, 1998. **8**(2): p. 140-6.
26. Wade, P.A. and A.P. Wolffe, *Chromatin: Histone acetyltransferases in control*. Current Biology, 1997. **7**(2): p. R82-R84.

27. Tse, C., et al., *Disruption of higher-order folding by core histone acetylation dramatically enhances transcription of nucleosomal arrays by RNA polymerase III*. *Molecular and Cellular Biology*, 1998. **18**(8): p. 4629-4638.
28. Wade, P.A., D. Pruss, and A.P. Wolffe, *Histone acetylation: Chromatin in action*. *Trends in Biochemical Sciences*, 1997. **22**(4): p. 128-132.
29. Horn, P.J. and C.L. Peterson, *Molecular biology: Chromatin higher order folding: Wrapping up transcription*. *Science*, 2002. **297**(5588): p. 1824-1827.
30. Davie, J.R., *Histone modifications*, in *Chromatin Structure and Dynamics: State-of-the-Art*, J. Zlananova and S.H. Leuba, Editors. 2004, Elsevier: Amsterdam. p. 205-240.
31. Ausio, J. and D.W. Abbott, *The role of histone variability in chromatin stability and folding*, in *Chromatin Structure and Dynamics: State-of-the-Art*, J. Zlananova and S.H. Leuba, Editors. 2004, Elsevier: Amsterdam. p. 241-290.
32. Buttinelli, M., et al., *Influence of DNA topology and histone tails in nucleosome organization on pBR322 DNA*. *Nucleic Acids Res*, 1991. **19**(16): p. 4543-9.
33. Fletcher, T.M. and J.C. Hansen, *Core histone tail domains mediate oligonucleosome folding and nucleosomal DNA organization through distinct molecular mechanisms*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(43): p. 25359-62.
34. Garcia-Ramirez, M., F. Dong, and J. Ausio, *Role of the histone "tails" in the folding of oligonucleosomes depleted of histone H1*. *The Journal of Biological Chemistry*, 1992. **267**(27): p. 19587-19595.
35. Garcia-Ramirez, M., C. Rocchini, and J. Ausio, *Modulation of chromatin folding by histone acetylation*. *The Journal of Biological Chemistry*, 1995. **270**(30): p. 17923-17928.
36. Schwarz, P.M., et al., *Reversible oligonucleosome self-association: dependence on divalent cations and core histone tail domains*. *Biochemistry*, 1996. **35**(13): p. 4009-4015.
37. Dorigo, B., et al., *Chromatin fiber folding: requirement for the histone H4 N-terminal tail*. *J Mol Biol*, 2003. **327**(1): p. 85-96.
38. Dorigo, B., et al., *Nucleosome arrays reveal the two-start organization of the chromatin fiber*. *Science*, 2004. **306**(5701): p. 1571-3.
39. Goytisolo, F.A., et al., *Identification of two DNA-binding sites on the globular domain of histone H5*. *The EMBO Journal*, 1996. **15**(13): p. 3421-3429.

40. Lindsey, G.G., et al., *Extended C-terminal tail of wheat histone H2A interacts with DNA of the "linker" region*. J Mol Biol, 1991. **218**(4): p. 805-13.
41. Mangenot, S., et al., *Salt-induced conformation and interaction changes of nucleosome core particles*. Biophys J, 2002. **82**(1 Pt 1): p. 345-56.
42. Mangenot, S., et al., *Interactions between isolated nucleosome core particles: A tail-bridging effect?* European Physical Journal E, 2002. **7**(3): p. 221-231.
43. Bertin, A., et al., *Role of histone tails in the conformation and interactions of nucleosome core particles*. Biochemistry, 2004. **43**(16): p. 4773-80.
44. Dong, F., C. Nelson, and J. Ausio, *Analysis of the changes in the structure and hydration of the nucleosome core particle at moderate ionic strengths*. Biochemistry, 1990. **29**(47): p. 10710-6.
45. Verwey, E.J. and J.T.G. Overbeek, *Theory of the Stability of Lyophobic Colloids*. 1948, New York: Elsevier.
46. Corti, M. and V. Degiorgio, *Quasi-Elastic Light Scattering Study of Intermicellar Interactions in Aqueous Sodium Dodecyl Sulfate Solutions*. Journal of Physical Chemistry, 1981. **85**: p. 711-717.
47. Retailleau, P., et al., *Coulombic interaction and ion-protein macroion coupled diffusion evidenced by light scattering*. Europhysics Letters, 1999. **46**(2): p. 154-159.
48. Boroudjerdi, H. and R.R. Netz, *Interactions between polyelectrolyte-macroion complexes*. Europhysics Letters, 2003. **64**(3): p. 413-419.
49. Boroudjerdi, H. and R.R. Netz, *Strongly coupled polyelectrolyte-macroion complexes*. Journal of Physics-Condensed Matter, 2005. **17**(14): p. S1137-S1151.
50. Podgornik, R., *Two-body polyelectrolyte-mediated bridging interactions*. Journal of Chemical Physics, 2003. **118**(24): p. 11286-11296.
51. Muhlbacher, F., C. Holm, and H. Schiessel, *Controlled DNA compaction within chromatin: The tail-bridging effect*. Europhysics Letters, 2006. **73**(1): p. 135-141.
52. Korolev, N., A.P. Lyubartsev, and L. Nordenskiöld, *Computer modeling demonstrates that electrostatic attraction of nucleosomal DNA is mediated by histone tails*. Biophys J, 2006. **90**(12): p. 4305-16.

53. Sun, J., Q. Zhang, and T. Schlick, *Electrostatic mechanism of nucleosomal array folding revealed by computer simulation*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(23): p. 8180-8185.
54. Arya, G., Q. Zhang, and T. Schlick, *Flexible histone tails in a new mesoscopic oligonucleosome model*. Biophys J, 2006. **91**(1): p. 133-50.
55. Widom, J., *Toward a unified model of chromatin folding*. Annu Rev Biophys Biophys Chem, 1989. **18**: p. 365-95.
56. Draves, P.H., P.T. Lowary, and J. Widom, *Co-operative binding of the globular domain of histone H5 to DNA*. J Mol Biol, 1992. **225**(4): p. 1105-21.
57. Thomas, J.O., C. Rees, and J.T. Finch, *Cooperative binding of the globular domains of histones H1 and H5 to DNA*. Nucleic Acids Res, 1992. **20**(2): p. 187-94.
58. Clark, D.J. and T. Kimura, *Electrostatic mechanism of chromatin folding*. J Mol Biol, 1990. **211**(4): p. 883-96.
59. Hayes, J.J., *Site-directed cleavage of DNA by a linker histone--Fe(II) EDTA conjugate: localization of a globular domain binding site within a nucleosome*. Biochemistry, 1996. **35**(37): p. 11931-7.
60. Pruss, D., et al., *An asymmetric model for the nucleosome: a binding site for linker histones inside the DNA gyres*. Science, 1996. **274**(5287): p. 614-7.
61. Ramakrishnan, V., *Histone structure and the organization of the nucleosome*. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure, 1997. **26**: p. 83-112.
62. Thoma, F., T. Koller, and A. Klug, *Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin*. J Cell Biol, 1979. **83**(2 Pt 1): p. 403-27.
63. Fan, Y., et al., *Histone H1 depletion in mammals alters global chromatin structure but causes specific changes in gene regulation*. Cell, 2005. **123**(7): p. 1199-212.
64. Dasso, M., S. Dimitrov, and A.P. Wolffe, *Nuclear assembly is independent of linker histones*. Proc Natl Acad Sci USA, 1994. **91**(26): p. 12477-12481.
65. Bednar, J., et al., *Chromatin conformation and salt-induced compaction: three-dimensional structural information from cryoelectron microscopy*. J Cell Biol, 1995. **131**(6 Pt 1): p. 1365-76.

66. Hamiche, A., et al., *Linker histone-dependent DNA structure in linear mononucleosomes*. J Mol Biol, 1996. **257**(1): p. 30-42.
67. Lee, D.Y., et al., *A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA*. Cell, 1993. **72**(1): p. 73-84.
68. Zlatanova, J., S.H. Leuba, and K. van Holde, *Chromatin fiber structure: morphology, molecular determinants, structural transitions*. Biophys J, 1998. **74**(5): p. 2554-66.
69. Woodcock, C.L., et al., *A chromatin folding model that incorporates linker variability generates fibers resembling the native structures*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 1993. **90**(19): p. 9021-9025.
70. Yao, J., P.T. Lowary, and J. Widom, *Direct detection of linker DNA bending in defined-length oligomers of chromatin*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 1990. **87**: p. 7603-7607.
71. Yao, J., P.T. Lowary, and J. Widom, *Linker DNA bending induced by the core histones of chromatin*. Biochemistry, 1991. **30**(34): p. 8408-14.
72. Hammermann, M., *Strukturuntersuchungen mit Neutronenkleinwinkelstreuung an superhelikaler DNA und Oligonucleosomen*, in *Abteilung Biophysik der Makromoleküle Deutsches Krebsforschungszentrum*. 1999, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg: Heidelberg.
73. Widom, J., *A relationship between the helical twist of DNA and the ordered positioning of nucleosomes in all eukaryotic cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(3): p. 1095-9.
74. Lohr, D. and K.E. Van Holde, *Organization of spacer DNA in chromatin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(12): p. 6326-30.
75. Strauss, F. and A. Prunell, *Organization of internucleosomal DNA in rat liver chromatin*. Embo J, 1983. **2**(1): p. 51-6.
76. Lohr, D., *The salt dependence of chicken and yeast chromatin structure. Effects on internucleosomal organization and relation to active chromatin*. J Biol Chem, 1986. **261**(21): p. 9904-14.
77. Karpov, V.L., et al., *Alignment of nucleosomes along DNA and organization of spacer DNA in Drosophila chromatin*. Nucleic Acids Res, 1982. **10**(14): p. 4321-37.
78. Widom, J., *Physicochemical Studies of the Folding of the 100 A Nucleosome Filament into the 300 A Filament*. J. Mol Biol., 1986. **190**: p. 411-424.

79. Finch, J.T. and A. Klug, *Solenoidal model for superstructure in chromatin*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 1976. **73**(6): p. 1897-1901.
80. van Holde, K. and J. Zlatanova, *Chromatin higher order structure: Chasing a mirage?* The Journal of Biological Chemistry, 1995. **270**(15): p. 8373-8376.
81. van Holde, K. and J. Zlatanova, *What determines the folding of the chromatin fiber*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 1996. **93**: p. 10548-10555.
82. Leuba, S.H., J. Zlatanova, and K. van Holde, *On the location of histones H1 and H5 in the chromatin fiber. Studies with immobilized trypsin and chymotrypsin*. J Mol Biol, 1993. **229**(4): p. 917-29.
83. Graziano, V., et al., *Histone H1 is located in the interior of the chromatin 30-nm filament*. Nature, 1994. **368**(6469): p. 351-4.
84. Worcel, A., S. Strogatz, and D. Riley, *Structure of chromatin and the linking number of DNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78**(3): p. 1461-5.
85. Zentgraf, H. and W.W. Franke, *Differences of supranucleosomal organization in different kinds of chromatin: cell type-specific globular subunits containing different numbers of nucleosomes*. J Cell Biol, 1984. **99**(1 Pt 1): p. 272-86.
86. Woodcock, C.L., L.L. Frado, and J.B. Rattner, *The higher-order structure of chromatin: evidence for a helical ribbon arrangement*. J Cell Biol, 1984. **99**(1 Pt 1): p. 42-52.
87. Widom, J., J.T. Finch, and J.O. Thomas, *Higher-order structure of long repeat chromatin*. Embo J, 1985. **4**(12): p. 3189-94.
88. Williams, S.P., et al., *Chromatin fibers are left-handed double helices with diameter and mass per unit length that depend on linker length*. Biophys J, 1986. **49**(1): p. 233-48.
89. Athey, B.D., et al., *The diameters of frozen-hydrated chromatin fibers increase with DNA linker length: evidence in support of variable diameter models for chromatin*. J Cell Biol, 1990. **111**(3): p. 795-806.
90. Smith, M.F., et al., *Radial density distribution of chromatin: evidence that chromatin fibers have solid centers*. J Cell Biol, 1990. **110**(2): p. 245-54.
91. Woodcock, C.L., *Chromatin fibers observed in situ in frozen hydrated sections. Native fiber diameter is not correlated with nucleosome repeat length*. J Cell Biol, 1994. **125**(1): p. 11-19.

92. Widom, J. and A. Klug, *Structure of the 300A chromatin filament: X-ray diffraction from oriented samples*. Cell, 1985. **43**(1): p. 207-13.
93. Gerchman, S.E. and V. Ramakrishnan, *Chromatin higher-order structure studied by neutron scattering and scanning transmission electron microscopy*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 1987. **84**(22): p. 7802-7806.
94. Williams, S.P. and J.P. Langmore, *Small angle x-ray scattering of chromatin. Radius and mass per unit length depend on linker length*. Biophys J, 1991. **59**(3): p. 606-18.
95. McGhee, J.D., et al., *Orientation of the nucleosome within the higher order structure of chromatin*. Cell, 1980. **22**(1 Pt 1): p. 87-96.
96. McGhee, J.D., et al., *Higher order structure of chromatin: orientation of nucleosomes within the 30 nm chromatin solenoid is independent of species and spacer length*. Cell, 1983. **33**(3): p. 831-41.
97. Sen, D., S. Mitra, and D.M. Crothers, *Higher order structure of chromatin: evidence from photochemically detected linear dichroism*. Biochemistry, 1986. **25**(11): p. 3441-7.
98. Butler, P.J. and J.O. Thomas, *Changes in chromatin folding in solution*. J Mol Biol, 1980. **140**(4): p. 505-29.
99. Thomas, J.O. and P.J. Butler, *Size-dependence of a stable higher-order structure of chromatin*. J Mol Biol, 1980. **144**(1): p. 89-93.
100. Butler, P.J., *A defined structure of the 30 nm chromatin fibre which accommodates different nucleosomal repeat lengths*. Embo J, 1984. **3**(11): p. 2599-604.
101. Tse, C. and J.C. Hansen, *Hybrid trypsinized nucleosomal arrays: identification of multiple functional roles of the H2A/H2B and H3/H4 N-termini in chromatin fiber compaction*. Biochemistry, 1997. **36**(38): p. 11381-11388.
102. Kornberg, R.D., *Structure of chromatin*. Annu Rev Biochem, 1977. **46**: p. 931-54.
103. Staynov, D.Z., *DNase I digestion reveals alternating asymmetrical protection of the nucleosome by the higher order chromatin structure*. Nucleic Acids Res, 2000. **28**(16): p. 3092-3099.
104. Richmond, T.J., et al., *Structure of the nucleosome core particle at 7 A resolution*. Nature, 1984. **311**(5986): p. 532-537.

105. Ramakrishnan, V., et al., *Crystal structure of globular domain of histone H5 and its implications for nucleosome binding*. Nature, 1993. **362**(6417): p. 219-23.
106. Horowitz, R.A., et al., *The three-dimensional architecture of chromatin in situ: electron tomography reveals fibers composed of a continuously variable zig-zag nucleosomal ribbon*. J Cell Biol, 1994. **125**(1): p. 1-10.
107. Leuba, S.H., et al., *Three-dimensional structure of extended chromatin fibers as revealed by tapping-mode scanning force microscopy*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 1994. **91**(24): p. 11621-11625.
108. Woodcock, C.L. and S. Dimitrov, *Higher-order structure of chromatin and chromosomes*. Curr Opin Genet Dev, 2001. **11**(2): p. 130-5.
109. Schiessel, H., W.M. Gelbart, and R. Bruinsma, *DNA folding: Structural and mechanical properties of the two-angle model for chromatin*. Biophysical Journal, 2001. **80**(4): p. 1940-1956.
110. Luger, K., *Structure and dynamic behavior of nucleosomes*. Curr Opin Genet Dev, 2003. **13**(2): p. 127-35.
111. Robinson, P.J., et al., *EM measurements define the dimensions of the "30-nm" chromatin fiber: evidence for a compact, interdigitated structure*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(17): p. 6506-11.
112. Rydberg, B., et al., *Chromatin Conformation in Living Cells: Support for a Zig-Zag Model of the 30 nm Chromatin Fiber*. J Mol Biol, 1998. **284**(1): p. 71-84.
113. Pardon, J.F., M.H. Wilkins, and B.M. Richards, *Super-helical model for nucleohistone*. Nature, 1967. **215**(100): p. 508-9.
114. Pardon, J.F. and M.H. Wilkins, *A super-coil model for nucleohistone*. J Mol Biol, 1972. **68**(1): p. 115-24.
115. Suau, P., E.M. Bradbury, and J.P. Baldwin, *Higher-order structures of chromatin in solution*. Eur J Biochem, 1979. **97**(2): p. 593-602.
116. Hansen, J.C., et al., *Homogeneous reconstituted oligonucleosomes, evidence for salt-dependent folding in the absence of histone H1*. Biochemistry, 1989. **28**(23): p. 9129-36.
117. Castro, C., *Measurement of the elasticity of single chromatin fibers: the effect of histone H1*. 1994, University of Oregon, Eugene: Eugene.

118. Houchmanzadeh, B., et al., *Elasticity and structure of eukaryote chromosomes studied by micromanipulation and micropipette aspiration*. J. Cell. Biol., 1997. **139**(1): p. 1-12.
119. Bussiek, M., N. Mucke, and J. Langowski, *Polylysine-coated mica can be used to observe systematic changes in the supercoiled DNA conformation by scanning force microscopy in solution*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(22): p. e137.
120. Cui, Y. and C. Bustamante, *Pulling a single chromatin fiber reveals the forces that maintain its higher-order structure*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 2000. **97**(1): p. 127-132.
121. Ringrose, L., et al., *Quantitative comparison of DNA looping in vitro and in vivo: chromatin increases effective DNA flexibility at short distances*. The EMBO Journal, 1999. **18**(23): p. 6630-6641.
122. Dekker, J., et al., *Capturing Chromosome Conformation*. Science, 2002. **295**(5558): p. 1306-1311.
123. van den Engh, G., R. Sachs, and B.J. Trask, *Estimating genomic distance from DNA sequence location in cell nuclei by a random walk model*. Science, 1992. **257**: p. 1410-1412.
124. Trask, B.J., et al., *Studies of metaphase and interphase chromosomes using fluorescence in situ hybridization*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1993. **58**: p. 767-75.
125. Yokota, H., et al., *Evidence for the organization of chromatin in megabase pair-sized loops arranged along a random walk path in the human G0/G1 interphase nucleus*. The Journal of Cell Biology, 1995. **130**(6): p. 1239-1249.
126. Bystricky, K., et al., *Analyzing long-range compaction of interphase chromatin in budding yeast by high resolution imaging techniques*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(47): p. 16495-16500.
127. Mergell, B., R. Everaers, and H. Schiessel, *Nucleosome interactions in chromatin: Fiber stiffening and hairpin formation*. Physical Review E, 2004. **70**(1): p. 011915.
128. Bennink, M.L., et al., *Unfolding individual nucleosomes by stretching single chromatin fibers with optical tweezers*. Nat Struct Biol, 2001. **8**(7): p. 606-10.
129. Brower-Toland, B.D., et al., *Mechanical disruption of individual nucleosomes reveals a reversible multistage release of DNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(4): p. 1960-5.

130. Leuba, S.H., M.L. Bennink, and J. Zlatanova, *Single-molecule analysis of chromatin*, in *Chromatin and Chromatin Remodeling Enzymes, Pt B*. 2004, Elsevier Academic Press: Amsterdam. p. 73-105.
131. Doi, M. and S.F. Edwards, *The theory of polymer dynamics*. 1986, Oxford: Oxford University Press.
132. Grosberg, A.Y. and A.R. Khokhlov, *Statistical Physics of Macromolecules*, ed. R. Larson and P.A. Pincus. 1994, New York: AIP Press, American Institute of Physics.
133. Flory, J.P., *Statistical mechanics of chain molecules*. 1988, Munich; Vienna; New York: Carl Hanser Verlag.
134. Binder, K. and D.W. Herrmann, *Monte Carlo Simulation in Statistical Physics*. Springer Series in Solid-State Sciences, ed. P. Fulde. Vol. 80. 1992, Heidelberg: Springer-Verlag.
135. Metropolis, N., et al., *Equation of state calculations by fast computing machines*. The Journal of Chemical Physics, 1953. **21**: p. 1087-1092.
136. Toth, K., N. Brun, and J. Langowski, *Geometry of linker DNA in reconstituted mononucleosomes studied by fluorescence resonance energy transfer*. Biophysical Journal, 2000. **78**(1): p. 403A-403A.
137. Sokal, A.D., *Monte Carlo methods for the self-avoiding walk*. Nuclear Physics B, 1996: p. 172-179.
138. Madras, N. and A.D. Sokal, *The pivot algorithm: A highly efficient Monte Carlo method for the self-avoiding walk*. J. Stat. Phys., 1988. **50**(1-2): p. 109-186.
139. Freire, J.J. and A. Horta, *Mean reciprocal distances of short polymethylene chains: calculation of the translational diffusion coefficient of n-alkanes*. J. Chem. Phys., 1976. **65**(10): p. 4049-4054.
140. Allen, M.P. and D.J. Tildesley, *Computer simulation in chemical physics*. NATO ASI Series / Series C: Mathematical and Physical Sciences. Vol. 397. 1993: Kluwer Academic Publishers.
141. Verdier, P.H. and W.H. Stockmayer, *Monte Carlo Calculations on the Dynamics of Polymers in Dilute Solution*. Journal of Chemical Physics, 1962. **36**(1): p. 227-235.
142. Baumgärtner, A. and K. Binder, *Monte Carlo studies on the freely jointed polymer chain with excluded volume interaction*. J. Chem. Phys., 1979. **71**(6): p. 2541-2545.

143. Holst, M.J., *The Poisson-Boltzmann Equation. Analysis and Multilevel Numerical Solution*. 1993, University of Illinois, Urbana-Champaign: Urbana-Champaign.
144. Klenin, K., H. Merlitz, and J. Langowski, *A Brownian dynamics program for the simulation of linear and circular DNA and other wormlike chain polyelectrolytes*. *Biophys J*, 1998. **74**(2 Pt 1): p. 780-788.
145. Merlitz, H., et al., *Looping dynamics of linear DNA molecules and the effect of DNA curvature: a study by Brownian dynamics simulation*. *Biophysical Journal*, 1998. **74**(2 Pt 1): p. 773-779.
146. Hammermann, M., et al., *Salt effects on the structure and internal dynamics of superhelical DNAs studied by light scattering and Brownian dynamics*. *Biophys J*, 1997. **73**(5): p. 2674-87.
147. Hammermann, M., et al., *Salt-dependent DNA superhelix diameter studied by small angle neutron scattering measurements and Monte Carlo simulations*. *Biophys J*, 1998. **75**(6): p. 3057-3063.
148. Jackson, J.D., *Klassische Elektrodynamik*. 2 ed. 1983, Berlin, New York: Walter De Gruyter.
149. Stigter, D., *Interactions of highly charged colloidal cylinders with applications to double stranded DNA*. *Biopolymers*, 1977. **16**: p. 1435-1448.
150. Chirico, G. and J. Langowski, *Kinetics of DNA supercoiling studied by Brownian dynamics simulation*. *Biopolymers*, 1994. **34**: p. 415-433.
151. Langowski, J. and H. Schiessel, *Theory and computational modeling of the 30 nm chromatin fiber*, in *Chromatin Structure and Dynamics: State-of-the-Art*, J. Zlananova and S.H. Leuba, Editors. 2004, Elsevier: Amsterdam. p. 397-420.
152. Lu, Y., B. Weers, and N.C. Stellwagen, *DNA persistence length revisited*. *Biopolymers*, 2001. **61**(4): p. 261-75.
153. Hagerman, P.J., *Flexibility of DNA*. *Annu Rev Biophys Biophys Chem*, 1988. **17**: p. 265-86.
154. Smith, S.B., Y. Cui, and C. Bustamante, *Overstretching B-DNA: the elastic response of individual double-stranded and single-stranded DNA molecules*. *Science*, 1996. **271**(5250): p. 795-799.
155. Klenin, K.V., M.D. Frank-Kamenetskii, and J. Langowski, *Modulation of intramolecular interactions in superhelical DNA by curved sequences: a Monte Carlo simulation study*. *Biophysical Journal*, 1995. **68**(1): p. 81-88.

156. Delrow, J.J., J.A. Gebe, and J.M. Schurr, *Comparison of hard-cylinder and screened Coulomb interactions in the modeling of supercoiled DNAs*. *Biopolymers*, 1997. **42**(4): p. 455-70.
157. Cantor, C.R., R.H. Morse, and R. Benezra, *Torsional properties of DNA in chromatin*. *Prog Clin Biol Res*, 1985. **172A**: p. 3-18.
158. Morse, R.H. and C.R. Cantor, *Nucleosome core particles suppress the thermal untwisting of core DNA and adjacent linker DNA*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1985. **82**(14): p. 4653-7.
159. Allen, M.P. and D.J. Tildesley, *Computer simulations of liquids*. 1989, Oxford: Oxford University Press.
160. Berne, B. and P. Pechukas, *Gaussian Model Potentials for molecular Interactions*. *J. Chem. Phys.*, 1972. **56**(8): p. 4213-4216.
161. Gay, J.G. and B.J. Berne, *Modification of the overlap potential to mimic a linear site--site potential*. *Journal of Chemical Physics*, 1981. **74**: p. 3316--3319.
162. Kabadi, V., *Molecular Dynamics of Fluids: The Gaussian Overlap Model II*. *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, 1986. **90**(4): p. 327-332.
163. Kabadi, V., *Statistical mechanics of non-spherical molecules: spherical harmonic expansions on non-spherical surfaces II. Gay -Berne Gaussian overlap potential*. *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, 1986. **90**(4): p. 332-339.
164. Luckhurst, G.R. and P.S.J. Simmonds, *Computer simulation studies of anisotropic systems xxi. parametrization of the gay-berne potential for model mesogens*. *Mol. Phys.*, 1993. **80**(2): p. 233-252.
165. Leforestier, A. and F. Livolant, *Liquid crystalline ordering of nucleosome core particles under macromolecular crowding conditions: evidence for a discotic columnar hexagonal phase*. *Biophys J*, 1997. **73**(4): p. 1771-6.
166. Mangenot, S., et al., *X-ray diffraction characterization of the dense phases formed by nucleosome core particles*. *Biophys J*, 2003. **84**(4): p. 2570-84.
167. Emerson, A.P.J., G.R. Luckhurst, and S.G. Whatling, *Computer simulation studies of anisotropic systems XXIII. The Gay-Berne discogen*. *Molecular Physics*, 1994. **82**(1): p. 113-124.
168. Wedemann, G. and J. Langowski, *Computer simulation of the 30-nanometer chromatin fiber*. *Biophys J*, 2002. **82**(6): p. 2847-59.

-
169. Aumann, F., et al., *Monte Carlo simulation of chromatin stretching*. Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys, 2006. **73**(4 Pt 1): p. 041927.
170. Moore, S.C. and J. Ausio, *Major role of the histones H3-H4 in the folding of the chromatin fiber*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **230**(1): p. 136-9.
171. Hansen, J.C., C. Tse, and A.P. Wolffe, *Structure and function of the core histone N-termini: more than meets the eye*. Biochemistry, 1998. **37**(51): p. 17637-41.
172. Zheng, C. and J.J. Hayes, *Structures and interactions of the core histone tail domains*. Biopolymers, 2003. **68**(4): p. 539-46.
173. Zhulina, E.B., et al., *Adsorption of tethered polyelectrolytes onto oppositely charged solid-liquid interfaces*. Langmuir, 2001. **17**(4): p. 1277-1293.
174. Katritch, V., C. Bustamante, and V.K. Olson, *Pulling chromatin fibers: Computer simulations of direct physical micromanipulations*. Journal of Molecular Biology, 2000. **295**(1): p. 29-40.
175. Sokal, A.D., *Monte Carlo Methods in Statistical Physics: Foundations and New Algorithms*, in *Lecture Notes of the Cours de Troisieme Cycle de la Physique en Suisse Romande*. 1996: Lausanne.
176. Kirkwood, J.G., *The general theory of irreversible processes in solutions of macromolecules*. J. Polymer Sci., 1954. **12**: p. 1-14.
177. Garcia de la Torre, J., et al., *HYDRO: A computer software for the prediction of hydrodynamic properties of macromolecules*. Biophysical Journal, 1994. **67**: p. 530-531.
178. Bloomfield, V., W.O. Dalton, and K.E. Van Holde, *Frictional coefficients of multisubunit structures. I. Theory*. Biopolymers, 1967. **5**(2): p. 135-48.
179. Press, W.H., et al., *Numerical Recipes in C: The art of scientific computing*. 1992, Cambridge: Cambridge University Press.
180. Storm, C. and P.C. Nelson, *Theory of high-force DNA stretching and overstretching*. Physical Review E, 2003. **67**(5): p. 051906.
181. Kierfeld, J., et al., *Stretching of semiflexible polymers with elastic bonds*. Eur Phys J E Soft Matter, 2004. **14**(1): p. 17-34.
182. Wang, M.D., et al., *Stretching DNA with Optical Tweezers*. BIOPHYSICAL JOURNAL, 1997. **72**(3): p. 1335-1346.

183. Landau, L.D. and E.M. Lifshitz, *Theory of Elasticity*. 1986, Oxford, N.Y.: Pergamon Press.
184. Bustamante, C., et al., *Single-molecule studies of DNA mechanics*. *Curr Opin Struct Biol*, 2000. **10**(3): p. 279-85.
185. Grigoryev, S.A., J. Bednar, and C.L. Woodcock, *MENT, a heterochromatin protein that mediates higher order chromatin folding, is a new serpin family member*. *Journal of Biological Chemistry*, 1999. **274**(9): p. 5626-5636.
186. Baumann, C.G., et al., *Ionic effects on the elasticity of single DNA molecules*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(12): p. 6185-6190.
187. Thomas, J.O., *The higher order structure of chromatin and histone H1*. *J Cell Sci Suppl*, 1984. **1**: p. 1-20.
188. Bancaud, A., et al., *Structural plasticity of single chromatin fibers revealed by torsional manipulation*. *Nat Struct Mol Biol*, 2006. **13**(5): p. 444-50.
189. Drew, H.R. and C.R. Calladine, *Sequence-specific positioning of core histones on an 860 base-pair DNA. Experiment and theory*. *J Mol Biol*, 1987. **195**(1): p. 143-73.
190. Hayes, J.J., D.J. Clark, and A.P. Wolffe, *Histone contributions to the structure of DNA in the nucleosome*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. **88**(15): p. 6829-33.
191. Hayes, J.J., T.D. Tullius, and A.P. Wolffe, *The structure of DNA in a nucleosome*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. **87**(19): p. 7405-9.
192. Bavykin, S.G., et al., *Structure of nucleosomes and organization of internucleosomal DNA in chromatin*. *J Mol Biol*, 1990. **212**(3): p. 495-511.
193. Prunell, A. and R.D. Kornberg, *Variable center to center distance of nucleosomes in chromatin*. *J Mol Biol*, 1982. **154**(3): p. 515-23.
194. Strauss, F. and A. Prunell, *Nucleosome spacing in rat liver chromatin. A study with exonuclease III*. *Nucleic Acids Res*, 1982. **10**(7): p. 2275-93.
195. Kulic, I.M. and H. Schiessel, *DNA Spools under Tension*. *Phys Rev Lett*, 2004. **92**(22): p. 228101-4.
196. Claudet, C., et al., *Histone octamer instability under single molecule experiment conditions*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(20): p. 19958-65.

Danksagung

Prof. Dr. Jörg Langowski danke ich für die Überlassung der interdisziplinären Themenstellung meiner Dissertation und seine wissenschaftlichen Betreuung. Sein Verständnis und seine Unterstützung sowohl auf fachlicher als auch persönlicher Ebene haben mich während der gesamten Dauer meiner Promotion motiviert und wesentlich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Bei Prof. Dr. Dieter. W. Heermann bedanke ich mich für die Betreuung und Unterstützung seitens der Fakultät für Physik und Astronomie. Dabei möchte ich die unkomplizierte und effiziente Kommunikation hervorheben, die sowohl fachlich als auch organisatorisch diese Arbeit ermöglichten.

Prof. Dr. Stephan Diekmann und Prof. Dr. Dr. Jürgen Sühnel danke ich für die fachlichen Gespräche und die angenehme sowie effektive Zusammenarbeit.

Dr. Filip Lankas danke ich für seinen Ideenreichtum und die fachlichen Diskussionen. Die Erstellung dieser Arbeit wurde durch seine Betreuung in ihrer Anfangsphase und seine konstruktive Kritik wesentlich unterstützt.

Bei Dr. Konstatin Klenin möchte ich mich besonders für die Hilfe bei theoretischen Fragen bedanken. Die fachlichen Gespräche gaben mir viele Anregungen und nützliche Hinweise.

Lutz Gehlen danke ich für die gemeinsame Erörterung vieler biologischer und physikalischer Probleme sowie die unermüdliche Beantwortung meiner Pearl- und SQL-Fragen.

Ein großes Dankeschön gilt auch Alexander Gansen, Florian Hauger, Robert Kirmse sowie Malte Bussiek und Norbert Mücke, deren Hilfsbereitschaft und fachliche Anregungen mich während der Erstellung dieser Arbeit unterstützten

Mein besonderer Dank gilt meinen Zimmerkollegen, Annika Wedemeier und Susanne Kunkel und Tomasz Wocjan. die neben interessanten fachlichen Diskussionen auch für eine freundliche und angenehme Arbeitsatmosphäre sorgten.

Insbesondere möchte ich mich bei Allen bedanken, die ich mit der Durchsicht des Manuskripts beauftragt habe.

Alle nicht namentlich genannten Mitarbeiter der Arbeitsgruppe danke ich für ihre stete Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Mein größter Dank gilt natürlich meiner Frau Alexandra, deren Liebe und Unterstützung diese Arbeit entscheidend förderten, sowie meinen Eltern, die mir den Weg der letzten Jahre ermöglichten.

