

Simulation der Strukturbildung und Ligandenbindung von Nukleinsäuren im Raum kollektiver und innerer Variablen

Dissertation
vorgelegt von
Remo Rohs

eingereicht am
Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

Berlin 2002

Gutachter der eingereichten Dissertation:

1. Gutachter: Prof. Dr. Ernst-Walter Knapp
Freie Universität Berlin
2. Gutachter: Dr. sc. nat. Heinz Sklenar
Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Berlin

Eingereicht am: 21.11.2002

Disputation am: 27.01.2003

”Without structure one is simply guessing.”

Paul Sigler

”Without energetics there is a risk of believing everything one sees.”

B. Jayaram

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VII
1. Einleitung	1
2. Struktur und Funktion der Nukleinsäuren	4
2.1. Chemischer Aufbau und Modelle der Raumstruktur	4
2.2. Strukturelle Analyse von Nukleinsäuren	7
2.2.1. Beschreibung durch helikale Parameter	7
2.2.2. Furchengeometrien	9
2.2.3. Torsionswinkel und Zuckerfaltung	10
2.3. Ergebnisse experimenteller Methoden	12
2.3.1. Faserdiagramme	12
2.3.2. Röntgenkristallographie	13
2.3.3. Spektroskopische Methoden	13
2.4. Ergebnisse aus Theorie und Simulationen	15
2.4.1. Die DNA als Polyelektrolyt	15
2.4.2. Statische Modelle	16
2.4.3. Flexible Elemente in Nukleinsäurestrukturen	17
2.4.4. Dynamische Modelle	18
2.5. Komplexbildung mit Liganden und Proteinen	19
2.5.1. DNA-Liganden-Komplexe	20
2.5.2. DNA-Protein-Komplexe	21
2.6. Bedeutung und Anwendung der Erkenntnisse	22
3. Theoretische Methoden zur Simulation molekularer Strukturen	23
3.1. Molekulare Modelle	23
3.1.1. Physikalische Grundlagen	23
3.1.2. Potentialhyperfläche und Kraftfelder	26
3.1.3. Beschreibung des Lösungsmittels	29
3.2. Simulationstechniken	33
3.2.1. Energieminimierung	33
3.2.2. Molekulardynamik-Algorithmen	34
3.2.3. Monte-Carlo-Algorithmen	37
3.2.4. Vergleich der Monte-Carlo- und Molekulardynamik-Methode	43
3.2.5. Jacobi-Faktoren kanonischer Transformationen	44

4. Monte-Carlo-Algorithmus zur Simulation von Nukleinsäuren	46
4.1. Definition des molekularen Modells	46
4.1.1. Reduktion der Freiheitsgrade durch Einführung kollektiver und innerer Variablen	46
4.1.2. Molekulares Modell mit iterativem Kettenschluß	47
4.1.3. Molekulares Modell mit analytischem Kettenschluß	51
4.1.4. Behandlung der Zuckerfaltung	54
4.1.5. Explizite Gegenionen	58
4.1.6. Molekulares Modell für die Ligandenbindung	59
4.1.7. Gesamtdarstellung des molekularen Modells in Relation zu vergleichbaren Modellen	60
4.2. Programmtechnische Implementierung	64
4.2.1. Initialisierung	64
4.2.2. Energieberechnung	65
4.2.3. Dynamische Schrittweitenanpassung	66
4.2.4. Strukturelle Parameter	69
4.2.5. Erforderliche Rechenzeiten	71
5. Monte-Carlo-Simulationen von DNA-Dekameren mit alternierenden AT und GC Basensequenzen	72
5.1. Equilibrierung der MC-Simulationen	73
5.2. Unabhängigkeit von der Startkonfiguration	82
5.3. Sequenzspezifische Konformation und Flexibilität von DNA-Dekameren mit alternierenden AT und GC Basensequenzen	84
5.4. Kondensation der expliziten Gegenionen	89
5.5. Diskussion der Resultate, Teil I	91
6. Sequenz- und Salzeffekte der Methylenblau-DNA-Bindung	98
6.1. Sequenzspezifische Bindung von Methylenblau und DNA-Dekameren mit alternierenden AT und GC Basensequenzen	98
6.1.1. Energetische Analyse der Methylenblau-DNA-Komplexe	102
6.1.2. Strukturelle Analyse der Methylenblau-DNA-Komplexe	104
6.2. Salzabhängigkeit der Methylenblau-DNA-Bindung	107
6.3. Diskussion der Resultate, Teil II	110
7. Monte-Carlo-Simulationen von Methylenblau-DNA-Komplexen	113
7.1. Komplexbildung durch Interkalation des Methylenblau	114
7.1.1. Lage und Orientierung des Methylenblau in der Bindungstasche	114
7.1.2. Konformationsänderungen der Target-Dekamere	120
7.2. Komplexbildung durch Bindung des Methylenblau in den Furchen	128
7.2.1. Lage und Orientierung des Methylenblau in den Furchen	128
7.2.2. Konformationsänderungen der Target-Dekamere	135
7.3. Diskussion der Resultate, Teil III	137
8. Zusammenfassung	140
9. Summary	144

Abkürzungsverzeichnis

DNA	Desoxyribonukleinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
A, C, G, T	Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin
R, Y	Purinbase, Pyrimidinbase
MB	Methylenblau
YpR, RpY	5'-YpR-3'- bzw. 5'-RpY-3'-Bindungstasche
LD	Linearer Dichroismus
CD	Circularer Dichroismus
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
MD	Molekulardynamik
MC	Monte Carlo
JUMNA	Junction Minimisation of Nucleic Acids
FLEX	Kraftfeld des JUMNA-Algorithmus
AMBER	Assisted Model Building with Energy Refinement
CVFF	Consistent Valence Force Field
PB	Poisson-Boltzmann
DelPhi	Numerischer Algorithmus zur Lösung der PB-Gleichung
UHBD	Numerischer Algorithmus zur Lösung der PB-Gleichung
FDPB	Finite Difference Poisson Boltzmann
FEPB	Finite Element Poisson Boltzmann
FIESTA	Field Integrated Electrostatic Approach
GB	Generalized Born
PBSA	Poisson Boltzmann Solvent Accessible Surface Area
T_i, R_i	Translationen, Rotationen
P, A	Phase und Amplitude des Zuckers
χ	Glykosidwinkel
$\varepsilon, \zeta, \alpha, \beta, \gamma, \delta$	Torsionswinkel des Nukleinsäure-Rückgrats
ω_i	Valenzwinkel des Nukleinsäure-Rückgrats
J	Jacobi-Faktor

dx	X-Displacement
dy	Y-Displacement
Dz	Rise
η	Inclination
ϑ	Tip
Ω	Twist
σ	Fluktuation
d^m, d^M	Tiefe der kleinen bzw. großen Furche
w^m, w^M	Weite der kleinen bzw. großen Furche
$\varepsilon(r)$	Abstandsabhängige dielektrische Permittivität
E^{tot}	Gesamtenergie
E_{ne}	Summe der nichtelektrostatischen Energiebeiträge
E_{elec}	Elektrostatische Energie
E_{coul}	Coulomb-Energie
E_{react}	Reaktionsfeldenergie
E_{cont}	Elektrostatische Kontinuumsenergie
E_{def}	Deformationsenergie
E_{int}	Wechselwirkungsenergie
E_{bindg}	Bindungsenergie
1 kcal mol^{-1}	$= 6,951 \cdot 10^{-21} \text{ J}$
1 kcal	$= 4,187 \text{ kJ}$
k_B	$= 1,381 \cdot 10^{-23} \text{ J K}^{-1} \approx 1,987 \cdot 10^{-3} \text{ kcal mol}^{-1}\text{K}^{-1}$

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Heinz Sklenar für die immer engagierte und enge Betreuung des Dissertationsvorhabens. Ich bin Dr. Heinz Sklenar dankbar für ein interessantes Promotionsthema, exzellente Arbeitsbedingungen und dafür, daß er bei Fragen und Problemen jederzeit mit kompetentem Rat zur Verfügung stand, mir in vielen Situationen seine volle Unterstützung entgegenbrachte und mich dabei zunehmend für die theoretische Strukturbiologie zu begeistern vermochte.

Prof. Ernst-Walter Knapp danke ich für lehrreiche und interessante Diskussionen, für seine fördernde Unterstützung und eine stets aufgeschlossene und interessierte Begleitung des Dissertationsvorhabens.

Für eine Einführung in die Methoden und Probleme der theoretischen Biochemie danke ich neben Dr. Heinz Sklenar auch Frau Prof. Catherine Etchebest, Dr. Richard Lavery und Dr. Martin Zacharias.

Darüberhinaus bin ich Frau Prof. Zippora Shakked, Prof. B. Jayaram, Prof. Barry Honig und Prof. Steve Harvey dankbar für anregende, motivierende und lehrreiche Diskussionen, die mit einem andauernden Interesse am Fortgang der Arbeit verbunden waren. In einer in diesem Sinne geprägten Dankbarkeit werde ich Prof. Peter Kollman in Erinnerung behalten.

Für wichtige Hinweise zum Manuskript der Dissertation danke ich Dr. Heinz Sklenar, Werner Leistner und Frau Prof. Zippora Shakked.

Die Finanzierung des Promotionsvorhabens verdanke ich dem Helmholtz-Netzwerk für Bioinformatik und dem Graduiertenkolleg „Modellstudien“ der DFG, dessen Sprecher, Prof. Wolfgang Höhne, ich für seine engagierte Förderung danken möchte.

Ein Dank, der sich nicht in Worte fassen läßt, gilt meinen lieben Eltern für alles, was so entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Für viele schöne Stunden aber auch wichtige Unterstützung danke ich meinen Freunden.

Curriculum vitae

Dipl.-Phys. Remo Rohs

geb. am 17.05.1972 in Perleberg als Sohn von Walter und Erika Rohs

Ausbildung

- 1990 Abitur am heutigen Marie-Curie-Gymnasium in Wittenberge (Gesamtnote 1,0)
- 1997 Diplom in Physik an der Humboldt-Universität zu Berlin (Gesamtnote 1,1)

Wissenschaftliche Arbeit

- 1996/97 Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe Photobiophysik des Instituts für Physik der Humboldt-Universität zu Berlin
- 1997/98 Predoc in der Arbeitsgruppe Theoretische Biochemie des Institut de Biologie Physico-Chimique (C.N.R.S.) in Paris, Frankreich
- seit 1998 Doktorand in der Arbeitsgruppe Theoretische Biophysik des Max-Delbrück-Centrums für Molekulare Medizin und der Arbeitsgruppe Macromolecular Modeling des Instituts für Chemie der Freien Universität Berlin

Lehrtätigkeit

- 1995/96 Übungen in Theoretischer Physik für Vorlesungen von Prof. R. Keiper
- 1996/97 Übungen im integrierten Kurs Physik für Vorlesungen von Prof. T. Lohse (Experimentalphysik) und Prof. R. Keiper (Theoretische Physik)
- 1998 Übungen in Molekularer Biophysik für Vorlesungen von Prof. B. Röder
- 2000 Organisationskomitee der Berlin Humboldt School on Structural Biology (Sprecher: M. Karplus, P. Kollman, A. Fersht, K. Wüthrich u. a.)
- 2000/02 Praktika in Biomolecular Modeling mit Dr. H. Sklenar

Auszeichnungen

- 1997 Predoc-Stipendium des DAAD für einen Arbeitsaufenthalt 1997/98 in der Arbeitsgruppe von Dr. R. Lavery am Institut de Biologie Physico-Chimique in Paris, Frankreich
- 1998 Humboldt-Preis 1998 für eine „herausragende Diplomarbeit“
- 1999 Stipendium der IUPAB und der UNESCO zur Teilnahme am XIII. International Biophysics Congress in New Delhi, Indien
- 2002 Postdoc-Stipendium der Minerva-Stiftung (Max-Planck-Gesellschaft) für einen Arbeitsaufenthalt ab 2003 in der Arbeitsgruppe von Prof. Z. Shaked am Weizmann Institute of Science in Rehovot, Israel

Publikationsliste

Wissenschaftliche Publikationen

1. R. Rohs, C. Etchebest, and R. Lavery. Unraveling proteins: a molecular mechanics study. *Biophys. J.* **1999**, 76:2760-2768.
2. R. Rohs, H. Sklenar, R. Lavery, and B. Röder. Methylene blue binding to DNA with alternating GC base sequence: a modeling study. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122:2860-2866.
3. R. Rohs and H. Sklenar. Methylene blue binding to DNA with alternating GC base sequence: continuum treatment of salt effects. *Indian J. Biochem. Biophys.* **2001**, 38:1-6 (invited paper).
4. R. Rohs and H. Sklenar. Methylene blue binding to DNA with alternating AT base sequence: minor groove binding is favored over intercalation. **2002** (to be submitted).
5. R. Rohs and H. Sklenar. Conformational dynamics of nucleic acids: Monte Carlo sampling in the space of rigid body and sugar pucker variables **2003** (in preparation).

Internationale Präsentationen und Konferenzbeiträge

1. R. Rohs. Mechanical properties of protein secondary structure. *Institut de Biologie Physico-Chimique* (Vortrag) **1998**, Paris, Frankreich.
2. R. Rohs. Molecular interactions between methylene blue and DNA fragments. *Institut de Biologie Physico-Chimique* (Vortrag) **1998**, Paris, Frankreich.
3. R. Rohs, H. Sklenar und R. Lavery. Investigations of molecular interactions between methylene blue and DNA fragments in aqueous solution. *Conference "Computational Chemistry and the Living World: From Sequence to Function"* (Poster) **1998**, Chambéry, Frankreich.
4. R. Rohs, H. Sklenar und R. Lavery: Theoretical studies of methylene blue binding to DNA with a GC alternating base sequence. *XIII. International Biophysics Congress* (Poster) **1999**, New Delhi, Indien.
5. R. Rohs: Theoretical studies of methylene blue binding to DNA with a GC alternating base sequence. *Conference on "Structural Biology and Molecular Recognition"* (Vortrag und Poster) **1999**, Calcutta, Indien.

6. R. Rohs: Methylene blue binding to DNA with alternating GC base sequence: continuum treatment of salt effects. *Université Denis Diderot* (Vortrag) **2000**, Paris, Frankreich.
7. R. Rohs und H. Sklenar. Intercalation and groove binding of methylene blue to DNA with alternating GC and AT base sequences. *Computational Biophysics Conference "From Macromolecules to Drugs"* (Poster) **2000**, Nice, Frankreich.
8. R. Rohs und H. Sklenar. Sequence and salt effects on methylene blue binding to DNA with alternating AT and GC base sequences. *The 12th Conversation in Biomolecular Stereodynamics* (Poster) **2001**, Albany, New York, USA.
9. R. Rohs und H. Sklenar. Conformational dynamics of nucleic acids: Monte Carlo sampling in the space of rigid body and sugar pucker variables. *The 12th Conversation in Biomolecular Stereodynamics* (Poster) **2001**, Albany, New York, USA.
10. R. Rohs und H. Sklenar. Monte Carlo simulation of nucleic acid structures. *Conference on "Computer Simulation and Theory of Macromolecules"* (Vortrag und Poster) **2002**, Hünfeld, Deutschland.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, Remo Rohs, geb. am 17.05.1972 in Perleberg, die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe verfaßt zu haben.

Mit der Auslage meiner Dissertation in der Bibliothek der Freien Universität Berlin bin ich einverstanden.

Berlin, den 21. November 2002