

1. Einleitung

Von der Postulation der doppelhelikalen DNA-Struktur 1953 durch Watson und Crick bis zur heute weitgehend entschlüsselten Primärstruktur der Genome des Menschen und einiger anderer Organismen beeinflussten die dabei gewonnenen biochemischen Erkenntnisse über die Struktur und Funktion von Genen grundlegend alle Bereiche der Biologie und Medizin. Die Funktion der Desoxyribonukleinsäure (DNA) besteht in der Speicherung der genetischen Information, die die Spezifität der Strukturen von Proteinen und Ribonukleinsäuren (RNA) bei allen Spezies von Organismen gewährleistet, den Ablauf der Biosynthese von Zell- und Gewebestandteilen steuert und die Aktivität bzw. Individualität der Organismen definiert. Die Kenntnis der Sequenz, mit der viele Tausend Desoxyribonukleotide zu einem DNA-Strang verknüpft sind, der meist mit einem komplementären DNA-Strang ein doppelsträngiges DNA-Molekül bildet, ist zum Verständnis der biologischen Funktion notwendig aber oft nicht hinreichend. Erst die räumliche Struktur sowie die Flexibilität und Dynamik der DNA ermöglichen bei der Transkription die spezifische Protein-DNA-Erkennung. Informationen über die Struktur und Dynamik der Komplexbildung von Nukleinsäuren mit Proteinen und Liganden tragen damit zu einem tieferen Verständnis biologischer Prozesse maßgeblich bei.

Die Konformation von Nukleinsäuren hat sich in röntgenkristallographischen, spektroskopischen und NMR-Untersuchungen als von der Basensequenz abhängig erwiesen. Die sequenzspezifische Struktur und Konformation der DNA ist zunehmend zum Gegenstand theoretischer Studien geworden, um die von den experimentellen Bedingungen beeinflussten oder nicht vollständig interpretierbaren Erkenntnisse experimenteller Studien zu ergänzen. Molekülmechanische Untersuchungen zielen auf die möglichst realitätsnahe Beschreibung molekularer Systeme durch Kraftfelder, die durch Energieminimierungen das Auffinden lokaler Minimum-Konformationen ermöglichen. Ein Verständnis der auf Wechselwirkungen von Makromolekülen beruhenden biologischen Prozesse erfordert aber neben der Kenntnis der sequenzspezifischen Struktur auch die Untersuchung der Flexibilität und Dynamik von Molekülen und Molekülverbänden. Neben experimentellen Untersuchungen der Strukturen in Abhängigkeit von Umgebungseinflüssen und der Dynamik von Konformationen trugen theoretische Studien wesentlich zur Aufklärung der ebenfalls sequenzspezifischen Flexibilität und Dynamik von Nukleinsäuren bei.

Theoretische Erkenntnisse über die Flexibilität und Dynamik biologischer Makromoleküle können durch Molekulardynamik(MD)-Simulationen gewonnen werden, die durch die Integration der Bewegungsgleichungen der Atome eines Moleküls unter Berücksichtigung aller Wechselwirkungen und Kräfte die Berechnung dynamischer Trajektorien ermöglichen. Die heutigen MD-Simulationen erreichen trotz sehr hoher Rechenzeiten oft nicht die für die Relevanz der Simulationsdaten notwendige Equilibrierung. Übergänge zwischen Substrukturen von Nukleinsäuren treten nur sehr vereinzelt auf und sind oft nicht reversibel. Symmetrien in den Basensequenzen von Nukleinsäuren

spiegelten sich bisher nicht in MD-Trajektorien wider. Der in MD-Simulationen berechnete strukturelle Parameter Twist liegt signifikant unter experimentell ermittelten Werten dieses Parameters. In dieser Arbeit wird ein Monte-Carlo(MC)-Algorithmus vorgestellt, der sich gegenüber den heute bekannten MD-Simulationen als überlegen erweist. Dieser MC-Algorithmus basiert auf Konformationsänderungen im Raum kollektiver und innerer Variablen. Das dem MC-Algorithmus zugrunde liegende molekulare Modell geht von rigiden Basen und fixierten Bindungslängen aus, so daß die Freiheitsgrade durch 12 Variablen pro Nukleotid beschrieben werden können. Mit diesen Variablen können lokale Konformationsänderungen durchgeführt werden, über deren Akzeptanz nach dem Metropolis-Algorithmus entschieden wird. Der MC-Algorithmus berücksichtigt Jacobi-Faktoren, benutzt das Kraftfeld AMBER und beschreibt das Lösungsmittel implizit. Die polyanionische Ladung der Nukleinsäuren wird durch explizite Gegenionen neutralisiert. In der vorliegenden Arbeit werden erste mit diesem MC-Algorithmus erzielte Resultate dargestellt und diskutiert. Diese ersten Resultate werden zudem zur Bewertung der Leistungsfähigkeit des vorgestellten MC-Algorithmus herangezogen. Die Bewertung schließt die Beurteilung der Effizienz des MC-Samplings und der Equilibrierung der MC-Simulationen, die Abschätzung der notwendigen Rechenzeiten im Vergleich zu MD-Simulationen und eine Diskussion der mittleren strukturellen Parameter im Vergleich mit experimentellen Daten ein.

Die sequenzspezifische Struktur und Flexibilität von Nukleinsäuren wird durch die MC-Simulationen von DNA-Dekameren mit alternierenden AT bzw. GC Basensequenzen untersucht. Diese beiden Modellsysteme enthalten alternierend die Nukleotidschritte 5'-RpY-3' und 5'-YpR-3'. Auch wenn Röntgenkristall- oder NMR-Strukturen dieser beiden Modellsysteme nicht vorliegen, können mit gewissen Einschränkungen experimentelle Daten über die unterschiedlichen Nukleotidschritte mit den Resultaten der MC-Simulationen verglichen werden. Anhand der mittleren Energien und mittlerer struktureller Parameter wird die Equilibrierung der MC-Simulationen des AT und GC alternierenden Dekamers diskutiert. Die sich im Verlauf der MC-Simulationen einstellende Equilibrierung wird der Effizienz des MC-Samplings gegenübergestellt. Außerdem wird der Einfluß der Startkonfiguration auf die Resultate untersucht, indem MC-Simulationen des GC alternierenden Dekamers miteinander verglichen werden, von denen die eine eine B-Form-Konfiguration und die andere eine extrem deformierte Konfiguration als Startstruktur benutzt. Die mittleren strukturellen Parameter der beiden Dekamere werden für den equilibrierten Bereich der MC-Simulationen berechnet und mit experimentellen Daten verglichen. Die mittleren strukturellen Parameter und mittleren Strukturen werden zusätzlich dahingehend bewertet, ob sie die palindrome Symmetrie der Basensequenzen der beiden Dekamere widerspiegeln. Die Sequenzspezifität der mittleren strukturellen Parameter wird einschließlich ihrer Fluktuationen diskutiert. Außerdem wird die Kondensation der expliziten Gegenionen an der DNA analysiert. Die Untersuchung der Wechselwirkung des Farbstoffs Methylenblau (MB) mit der DNA ist medizinisch von großem Interesse und darüberhinaus ein Modellsystem, das exemplarisch der Erweiterung des vorgestellten MC-Algorithmus auf Komplexe von Nukleinsäuren mit Liganden dient. Methylenblau ist ein Singulett-Sauerstoff generierender Farbstoff, der aufgrund seiner positiven Ladung eine Bindung mit der DNA eingeht. Die Fähigkeit der Generierung von Singulett-Sauerstoff durch DNA-bindende Farbstoffe liegt einem neuen gentherapeutischen Ansatz zugrunde, der darin besteht, in isolierten lebenden Zellen adressiert durch eine sequenzspezifische Bindung photochemisch

aktive Moleküle an „kranke“ Gene zu dirigieren. Als photochemisch aktive Moleküle sollen Farbstoffe wie Methylblau eingesetzt werden, die unter Belichtung Singulett-Sauerstoff generieren. Gezielte Laserbestrahlungen und die dadurch induzierten Photoreaktionen führen zu DNA-Strangbrüchen. Die Reparatur der gezielt geschädigten Gene soll durch die Mechanismen der homologen Rekombination erfolgen.

Eine medizinische Anwendung von Farbstoffen zum Erzielen von DNA-Strangbrüchen erfordert eine detaillierte Kenntnis der sequenzspezifischen Methylblau-DNA-Bindung. In spektroskopischen Untersuchungen wurde gezeigt, daß die Singulett-Sauerstoffquantenausbeute stark von der Architektur der MB-DNA-Bindung abhängig ist. Methylblau kann mit der DNA eine Bindung in drei verschiedenen Bindungsmodi eingehen: MB kann zwischen zwei benachbarte Basenpaare interkalieren oder in der kleinen bzw. großen Furche der DNA gebunden werden. Für diese unterschiedlichen Bindungsmodi werden durch Energieminimierung Konformationen der MB-DNA-Komplexe gesucht, die lokalen Energieminima zugeordnet werden können. Elektrostatische Lösungsmittelleffekte werden in einer Kontinuumsbehandlung des Lösungsmittels berücksichtigt. Nach dem Kriterium niedrigster Gesamtenergien unter Einbeziehung der Kontinuumsbehandlung werden für jeden Bindungsmodus MB-DNA-Komplexe ausgewählt, die die Konformationen der Komplexe in dem jeweiligen Bindungsmodus repräsentieren. Um die Sequenzspezifität der MB-DNA-Bindung zu untersuchen, werden die Bindungsenergien der MB-DNA-Komplexe in den drei Bindungsmodi und bei Verwendung der beiden Dekamere mit alternierender AT und GC Basensequenz als Target-DNA abgeschätzt. Die einzelnen Beiträge zur Gesamtenergie werden für die unterschiedlichen Bindungsmodi und die beiden Dekamere vergleichend diskutiert. Die Wechselwirkungen zwischen den Nukleinsäuren und dem Liganden sowie die für die Bindung erforderliche Deformation der Nukleinsäuren werden energetisch bewertet. Die Bindungsenergien der MB-DNA-Komplexe werden auf ihre Salzabhängigkeit hin untersucht. Die unterschiedlichen Bindungsmodi repräsentierenden MB-DNA-Komplexe werden strukturell analysiert. Dabei werden Sequenzeffekte der MB-DNA-Bindung im Vergleich mit experimentellen Daten diskutiert.

Die Flexibilität der MB-DNA-Komplexe wird in MC-Simulationen mit dem in dieser Arbeit vorgestellten MC-Algorithmus untersucht. Dabei werden als Startkonfigurationen die bereits energetisch und strukturell analysierten, die drei Bindungsmodi repräsentierenden MB-DNA-Komplexe verwendet und die Flexibilität der Bindung des MB mit dem AT bzw. GC alternierenden Dekamer verglichen. Die Analyse der Flexibilität der MB-DNA-Komplexe umfaßt einerseits die Lage und Orientierung des MB relativ zu den Target-Dekameren und andererseits die Konformationsänderungen und Deformationen der Nukleinsäuren infolge der Bindung. Es werden Parameter definiert, die die Lage und Orientierung des MB in den Interkalationstaschen und den Furchen der DNA eindeutig charakterisieren. Auf der Grundlage dieser helikalen Parameter des Liganden wird die Flexibilität des MB in den jeweiligen Bindungsmodi und in Abhängigkeit von der Basensequenz diskutiert. Außerdem werden die durch die Bindung des MB verursachten Konformationsänderungen der Target-Dekamere mit den Konformationen der freien Dekamere verglichen. Diesem Vergleich werden Änderungen charakteristischer struktureller Parameter zugrunde gelegt. Anhand mittlerer struktureller Parameter und ihrer Fluktuationen sowie mittlerer Strukturen werden schließlich Sequenzeffekte der MB-DNA-Bindung analysiert.