

University of Groningen

Photo-CIDNP study of biological molecules

Stob, Sijtze

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

1989

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Stob, S. (1989). *Photo-CIDNP study of biological molecules*. s.n.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Samenvatting

De versterkte absorptie- en emissielijnen, die kunnen worden waargenomen in NMR spectra van oplossingen waar radicaalreacties plaatsvinden, worden aangeduid met de naam CIDNP (chemically induced dynamic nuclear polarisation). De meeste van de waargenomen effecten kunnen m.b.v. de radicaalpaar theorie worden verklaard. Radicaalreacties kan men induceren door de temperatuur te veranderen of door te werken met lichtgevoelige verbindingen die na excitatie reageren met substraatmoleculen. Delaatst genoemde methode wordt foto-CIDNP genoemd en is zeer belangrijk gebleken bij het bestuderen van eiwitten, omdat de lichtgevoelige verbinding (flavine) selectief reageert met aromatische aminozuren (bv. histidine, tyrosine en tryptofaan) wanneer deze aan het oppervlak liggen. Ook is deze methode toegepast bij nucleinezuren (t-RNA), waarbij adenine en guanine gepolariseerd worden.

In dit proefschrift wordt de foto-CIDNP methode gebruikt voor de studie van de bouwstenen van biomoleculen, de aminozuren en nucleotiden (Hfdst. 2-5), en voor de bestudering van een DNA-bindend eiwit (*lac* repressor, Hfdst. 6). De toepassing van 2D NMR methoden bij foto-CIDNP wordt in Hfdst. 7 besproken.

Het in Hfdst. 2 bestudeerde 5'-adenosine-monofosfaat (5'-AMP) blijkt foto-CIDNP effecten te vertonen, die afhankelijk van de pH van teken wisselen. Deze kunnen worden verklaard door een electronoverdracht als radicaalpaar-vormende stap te veronderstellen, gevolgd door een base-gekatalyseerde deprotonering van het 5'-AMP radicaal cation. Voor het dinucleotide pdApdA kon worden vastgesteld dat interne deprotonering langs twee routes plaatsvindt: via de eindstandige fosfaatgroep en via de N₁ atomen van beide adenine ringen.

In hoofdstuk 3 wordt de studie van de guaninebase en derivaten daarvan beschreven. Bij 5'-GMP wordt ook een tekenwisseling vastgesteld als de pH wordt gevarieerd. Het effect van buffer, dat bij 5'-AMP sterk was, is hier slechts gering. Ook hier wordt electronoverdracht van base naar triplet flavine beschouwd als oorzaak van radicaalpaarvorming.

In Hfdst. 4 wordt het molecuul FAD beschreven, dat niet alleen uit biologisch oogpunt, maar ook voor de foto-CIDNP methode, interessant is. Het bevat zowel het exciteerbare flavine als het electron donerende adenine, waardoor het bij interne reactie biradicalen kan vormen. Het foto-CIDNP is zowel bij hoge als lage magneetvelden gegenereerd. Bij hoge magneetvelden vertoont het FAD foto-CIDNP effecten, welke men ook waarneemt bij vrij flavine en 5'-AMP (Hfdst. 2), terwijl bij lage magneetvelden het biradicaalkarakter van FAD blijkt: alle polariseerbare resonanties zijn in emissie. In het FAD biradicaal speelt de quantummechanische exchange interactie een belangrijke rol bij het onderdrukken van het CIDNP effect bij neutrale pH, waar een structurele verandering – het stapelen van de flavine en adenine ringen

– van het molecuul optreedt. Uit de bij lage veldsterktes gevonden magneetveldafhankelijkheid van het foto-CIDNP effect kon het bestaan van twee verschillende conformaties van het FAD biradicaal worden vastgesteld. De afstand tussen de ongepaarde electronen in het biradicaal kon worden geschat.

In Hfdst. 5 worden de resultaten van foto-CIDNP experimenten met aminozuren beschreven. Behalve de aromatische aminozuren histidine, tyrosine en tryptofaan blijken ook methionine en gemethyleerde lysines gepolariseerd te kunnen worden. Door pH titraties, concentratie afhankelijkheid en effect van chemische modificatie op het foto-CIDNP effect te bestuderen kon mechanistische informatie worden verkregen over radicaalpaarvorming. Voor tyrosine en tryptofaan konden de foto-CIDNP effecten kwantitatief worden verklaard. H-abstractie is belangrijk voor het genereren van radicaalparen bij tyrosine en histidine, terwijl bij tryptofaan, methionine en methyllysines electronoverdracht domineert.

In Hfdst. 6 wordt foto-CIDNP toegepast op het DNA bindende eiwit *lac* repressor en N-terminale fragmenten ervan (*lac* headpiece 51 en 59). Bij neutrale pH zijn histidine 29, tyrosines 7, 12 en 17 en methionine 1 gepolariseerd. De foto-CIDNP spectra van *lac* repressor en HP51 laten zien dat dezelfde residuen toegankelijk zijn voor het geëxciteerde flavine. Wanneer men HP51 en een *lac* operator-DNA fragment bij elkaar voegt worden de polarisaties van histidine 29 en tyrosines 7 en 17 onderdrukt. De resultaten van de metingen worden vergeleken met een drie-dimensionaal model van *lac* operator en *lac* headpiece verkregen uit 2D NOE experimenten gecombineerd met MD berekeningen.

2D NMR methoden hebben het oplossen van eiwit- en DNA-structuren aanzienlijk versneld. In Hfdst. 7 wordt de toepassing van 2D NMR methoden bij foto-CIDNP beschreven. Hierdoor wordt de resolutie van de foto-CIDNP methode vergroot. Bovendien zijn 2D CIDNP experimenten buitengewoon geschikt voor het bestuderen van overdracht van polarisatie naar andere kernen dan de primair gepolariseerde. De toepassing van 2D NMR bij foto-CIDNP wordt geïllustreerd aan de hand van het eiwit lysozyme, dat zowel met als zonder N-acetylglucosamine (NAG) is bestudeerd.

~~19292/89~~

94020554