

## DNA structuur : revolutionaire ontwikkelingen

***Citation for published version (APA):***

Buck, H. M., Koole, L. H., & Genderen, van, M. H. P. (1986). DNA structuur : revolutionaire ontwikkelingen. *Chemisch Magazine*, 49(december), 895, 897-.

***Document status and date:***

Gepubliceerd: 01/01/1986

***Document Version:***

Uitgevers PDF, ook bekend als Version of Record

***Please check the document version of this publication:***

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

***General rights***

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.tue.nl/taverne](http://www.tue.nl/taverne)

***Take down policy***

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[openaccess@tue.nl](mailto:openaccess@tue.nl)

providing details and we will investigate your claim.

wikkeling is het gebruik van *synthetische* epitopen. Dit geldt met name voor Mab's gericht tegen produkten van nieuw geïsoleerde genen. Met behulp van recombinant-DNA technieken is het mogelijk om genen uit het zoogdier-genoom te cloneren en van die genen de nucleotide-volgorde te bepalen. Aannemende dat een genprodukt voorheen niet geïdentificeerd en/of geïsoleerd was, kan nu op basis van de nucleotide-volgorde een aminozuurvolgorde van het (mogelijke) produkt worden voorspeld. Korte peptiden (10-15 aminozuren) worden dan gesynthetiseerd aan de hand van een gerichte keuze uit de voorspelde volgorde. Deze korte peptiden (synthetische epitopen) dienen vervolgens voor het opwekken van Mab's. Op deze wijze is reeds een aantal Mab's tegen oncogenprodukten gemaakt.

Voor het aantonen van antigeen-antilichaam-interacties wordt het antilichaam veelal voorzien van een label. Op het gebied van de immunoassays gaan de ontwikkelingen snel. Te noemen zijn het invoeren van fosforescentie-labels in de serologie waardoor een sterke verbetering van de signaal-ruis verhouding en daarmee van de gevoeligheid kon worden verkregen en het steeds verder ontwikkelen van immunofluorescentietechnieken (labeling van antilichamen m.b.v. fluorescerende moleculen) zowel in de microscopie als de flowcytometrie. Een nieuwe microscoop waarin het objectvlak afgetast wordt met een laserstraal en waarmee zowel fluorescentie, fasecontrast als reflectie informatie kan worden verkregen belooft wat dit betreft veel. De flowcytometrie waarbij cellen één voor één door een laserbundel worden gevoerd, werd verder en verder verfijnd door het invoeren van nieuwe fluorochromen. Mab's maken zo het in detail analyseren van zeer complexe celmengsels mogelijk.

Elke handeling (conjugeren met een fluorescerende of radioactieve stof of met een enzym) die men met een Mab uitvoert leidt tot een zekere mate van denaturatie. Getracht wordt daarom om hybride antilichamen te construeren die met één antigeen-bindingsplaats een gewenst antigeen herkennen en met één bindingsplaats, bijvoorbeeld een enzym. Een variant op deze gedachte is het vervangen van de genetische informatie voor het constante gedeelte van het antilichaam door een gen dat codeert voor een enzym. Deze ontwikkelingen zien er veelbelovend uit maar behoren zeker nog niet tot de routine.

Samenvattend is in 1986 goede vooruitgang geboekt met de technieken op Mab-terrein waardoor diagnostiek op moleculair niveau mogelijk is geworden.

## DNA-STRUCTUUR

# Revolutionaire ontwikkelingen



DR. H.M. BUCK

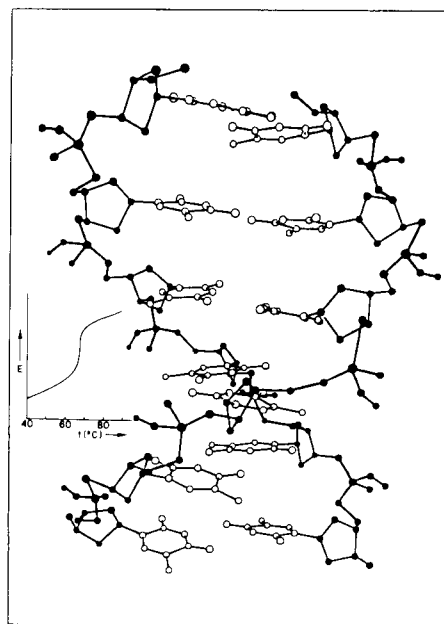
is hoogleraar in de organische chemie aan de Technische Universiteit Eindhoven. Zijn onderzoeksgebied omvat de fysisch-organische en de bio-organische chemie. Deze bijdrage werd samengesteld met medewerking van dr. ir. L.H. Koole en ir. M.H.P. van Genderen, die beiden ten nauwste bij het DNA-structuuronderzoek betrokken zijn.

Op het gebied van het DNA-structuuronderzoek doen zich revolutionaire ontwikkelingen voor.

Concentreerden aanvankelijk de structuurstudies zich op de rechtshandige dubbele helix (B-DNA) van Watson en Crick (1), in de 70-er jaren is men zich meer gaan richten op de diverse secundaire structuren die het DNA kan aannemen. De ontdekking van het linkshandige Z-DNA in 1979 is hier wel het meest markante voorbeeld van (2). De Z-structuur kan alleen uit het B-DNA gevormd worden voor alternerende  $d(G-C)_n$  duplex sequenties. Voor zowel de B als Z structuren loopt de atoomvolgorde in de strengen in tegengestelde richtingen (antiparallel) en zijn altijd complementaire basen gekoppeld: adenine (A) met thymine (T) en guanine (G) met cytosine (C). De biologische betekenis van het Z-DNA is nog volop in discussie. Uit recent onderzoek is gebleken, dat plaatselijke vorming van Z-fragmenten in DNA een negatieve supercoiling induceert, waardoor ontwindning van de duplexstructuur tot stand gebracht kan worden (3). Bovendien heeft de ontdekking van deze structuur veel onderzoek naar de moleculaire dynamica van de overgang van rechtshandig naar linkshandig DNA geïnitieerd (4-6).

In het huidige DNA structuuronderzoek richt de aandacht zich ook op duplexstructuren waarin afgeweken wordt van het principe van complementaire basenparing.

Zo is vastgesteld, dat A-G en G-T mismatches gemakkelijk ingebouwd kunnen worden in B-DNA (7). Een zeer recente ontwikkeling vormt het onderzoek aan parallelle dubbele helixstructuren, waarin C-C of T-T basenparing optreedt. Zo is door Sarma gevonden, dat het hexanucleotide  $d(CTCTCT)$  bij pH 3 een parallelle duplex vormt (8) doordat C wordt geprotoneerd ( $C^+$ ), waardoor stabiele  $C^+-C$  basenparen worden gevormd. Het vermoeden bestaat, dat deze structuur ook voorkomt in de supercoiled toestand van plasmiden (circular extrachromosomaal DNA), waarin  $d(CT)_n$  fragmenten zijn geïnserteerd. Het enzym S1 nuclease, dat enkelstrengs DNA splitst, vertoont een duidelijk verhoogde sensitiviteit voor deze plasmiden bij lage pH waarde. In onze groep is vastgesteld, dat het hexanucleotide  $d(T_p T_p T_p T_p T_p T)$  (gesynthetiseerd met behulp van automatische DNA-synthesizer) een rechtshandige duplex vormt, mits de fosfaatgroepen geneutraliseerd worden door methylering (9, 10). Uit de high resolution  $^1H$ -NMR spectra (11) van de duplex blijkt dat de structuur symmetrisch en derhalve parallel is. Bij verhoging van de temperatuur treedt reversibel dissociatie ('smelten') op bij 64 °C, zoals onder meer werd vastgesteld met UV hyperchro-



Rechts: Zij-aanzicht van de parallelle duplex van fosfaatgemethyleerd  $d(T_p T_p T_p T_p T_p T)$ . De structuur is hoogsymmetrisch en heeft een veel kleinere diameter (15 Å) dan B-DNA (21 Å). Per slag komen 8 basenparen voor. Links: UV hyperchromiciteitscurve. Duidelijk is de smeltovergang tussen 60 en 80 °C te zien. Het buigpunt in de curve correspondeert met 50% dissociatie van de duplex.

miciteitsmetingen. Bij deze techniek wordt gebruik gemaakt van het gegeven, dat de UV absorptie van de T-basen (bij 265 nm) sterk toeneemt bij de smeltovergang. Tevens kon deze overgang gevolgd worden met  $^1H$ -NMR, omdat de resonanties van de iminoprotone en de base-methylprotonen bij de smeltovergang sterk naar hoger veld

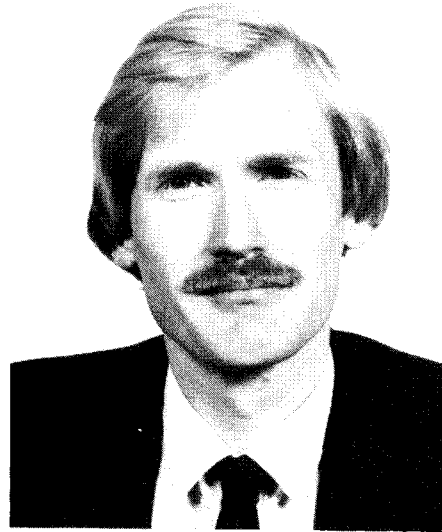
verschuiven. De conformatie-analyse van deze structuur wordt onmogelijk gemaakt door het feit dat bij de methylering chiraliteit in de fosfaatgroepen wordt geïntroduceerd. Daarom is gebruik gemaakt van het dinucleotide  $d(T_pT)$  dat ook een duplex vormt na methyleren (smelttemperatuur 30 °C). De precieze conformatieanalyse van de gevormde twee diastereomeren, die met HPLC van elkaar gescheiden werden, diende als basis voor het structuurmodel voor de duplex van het fosfaatgemethyleerd  $d(T_pT_pT_pT_pT)$ , zoals in de Figuur is aangegeven.

Dit structuurmodel wordt ondersteund door molecular mechanics berekeningen. Fosfaat-gemethyleerde, neutrale nucleïezuren vormen ongetwijfeld een nieuwe uitdaging voor het DNA onderzoek. Mogelijk kan deze systemen als probes gebruikt worden om de functie van nucleïezuren in de cel beter te bestuderen (12). Daarnaast kan dit type DNA ons belangrijke nieuwe inzichten verschaffen in DNA-eiwit interacties en de site-herkenning die daarbij plaatsvindt. Neutralisatie van de fosfaatgroep gebeurt dan niet door methylering, maar door elektrostatische associatie met een positieve aminozuur-site.

- (1) J.D. Watson, F.H. Crick: Nature 171 (1953) 737
- (2) A.H.-J. Wang, G.J. Quigley, F.J. Kolpak, J.L. Crawford, J.H. van Boom, G. van der Marel, A. Rich: Nature 282 (1979) 5740
- (3) G. Felsenfeld: Scientific American 253 (1985) 44
- (4) L.H. Koole, E.J. Lanter, H.M. Buck: J. Am. Chem. Soc. 106 (1984) 5451
- (5) S.C. Harvey: Nucleic Acids Res. 11 (1983) 4867
- (6) A. Rich, A. Nordheim, A.H.-J. Wang: Annu. Rev. Biochem. 53 (1984) 761
- (7) O. Kennard: J. Biomol. Struct. Dyn. 3 (1983) 205
- (8) M.H. Sarma, G. Gupta, R.H. Sarma: FEBS Letters 205 (1986) 223
- (9) L.H. Koole, M.H.P. van Genderen, H. Frankena, H.M.J. Kocken, J.A. Kanters, H.M. Buck: Proc. Kon. Ned. Akad. van Wetensch. B89 (1986) 51
- (10) L. H. Koole, M.H.P. van Genderen, H.M. Buck: J. Am. Chem. Soc. in druk
- (11) Gemeten bij 200 en 300 MHz (Bruker spectrometers, Laboratorium voor Organische Chemie, TUE) en 500 MHz (SON-faciliteit, KUN)
- (12) K.K. Chacko, K. Lindler, W. Saenger: Nucleic Acids Res. 11 (1983) 2801

## DUNNE LAGEN

# Sleutelrol voor diffractietechnieken



DR. E.J. MITTEMEIJER

is volgend op zijn benoeming tot hoogleraar, sinds medio 1986 verantwoordelijk voor de sectie Fysische Chemie van de Vaste Stof van het Laboratorium voor Metaalkunde van de Technische Universiteit Delft, waar een accent van onderzoek op 'oppervlaktelagen en grensvlakken' bestaat.

**SCHEMATISCHE WEERGAVE VAN EEN MULTILAAG** opgebouwd uit een alternerende stapeling van Mo- en Si-sublagen die ieder voor zich amorf zijn. Door de compositie-modulatie met periode  $\Lambda = 8 \text{ \AA}$  kan de multilaag opgevat worden als een ééndimensionaal kristal en in een (röntgen)diffractie-experiment met de geschikte configuratie (zie aangegeven stralengang) treedt een diffractiepiek op indien  $\sin \theta = \lambda / 2\Lambda$  [de (000) 1<sup>o</sup>-orde satellietreflectie] waarbij  $\theta$  de invalshoek en  $\lambda$  de golflengte van de gebruikte (röntgen)straling voorstellen (figuur 1a)

” Het onderzoek aan dunne lagen is de laatste jaren in een stroomversnelling terechtgekomen. Een oorzaak van fundamenteel wetenschappelijk karakter behelst de behoefte aan kennis over de gevolgen van *heterogeniteit*, zoals bijvoorbeeld tweegebracht door verlopen in concentratie en inwendige spanningen, voor de eigenschappen van een systeem. Daarnaast spelen impulsen vanuit 'de praktijk' een grote rol: kwaliteitsverbetering van het oppervlak van werkstukken, zoals bijvoorbeeld verkregen door thermochemische oppervlaktebehandeling en inherente eigenschappen van dunne lagen geassocieerd met elektrische, magnetische en diffusiekarakteristieken. Echter, de beschikbaarheid van krachtige analyse-instrumenten, waarmee de microstructuur op steeds kleinere (atomaire) schaal doorvorst kan worden, is van doorslaggevend belang. Een recent voorbeeld van de mogelijkheden geboden door toenemend oplossend vermogen verschaft het onderzoek aan *oxidehuiden op metaallegeringen* waaraan sinds lang studie verricht wordt, mede gezien hun betekenis voor de corrosieweerstand. De dunne (enkele tientallen Ångströms dikke) oxidehuid die op aluminium kan ontstaan bij relatief lage (o.a. kamer-) temperatuur werd tot voor kort als geheel amorf, d.w.z. met een min of meer regellose rangschikking van zuurstof- en aluminiumatomen, beschouwd. Met een moderne transmissie-elektronenmicroscop kon niet alleen vastgesteld worden dat zeer lo-

**RÖNTGENDIFFRACTOGRAM** (CuK $\alpha$  straling) van een multilaag, als geschetst in figuur 1a.

- a. de (000) 1<sup>o</sup>-orde satellietreflectie;
- b. de (000) 2<sup>o</sup>-orde satellietreflectie wordt niet aangetroffen, wat geweten kan worden aan een sinusvormige compositiemodulatie en/of variaties van  $\Lambda$  in de multilaag;
- c. reflecties van kristallijn Mo en Si treden niet op; de brede intensiteitsband bij ca.  $42^\circ 2\theta$  is typisch voor de amorfe structuur van de sublagen (figuur 1b) (Loopstra, Sloof, De Keijser, Mittemeijer, 1986).

