

University of Groningen

Thymine Photodimers. Two-dimensional NMR and photo-CIDNP studies

Kemmink, Johan

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:

1987

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

Citation for published version (APA):

Kemmink, J. (1987). Thymine Photodimers. Two-dimensional NMR and photo-CIDNP studies 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).

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 erfelijke eigenschappen van levende organismen zijn vastgelegd in DNA molekulen in de vorm van een specifieke volgorde van de basen adenine, cytosine, guanine en thymine. Het is essentieel voor de ontwikkeling van levende organismen, dat de DNA molekulen zeer vaak gedupliceerd kunnen worden zonder dat de vastgelegde code noemenswaardig veranderd. Dit vereist een extreem hoge stabiliteit van het DNA molekuul. In schijnbare tegenspraak hiermee is het feit, dat het DNA wordt blootgesteld aan een groot aantal externe factoren, die de genetische code kunnen verminken. Een van die factoren is het ultraviolet licht. De belangrijkste schade veroorzaakt door ultraviolet licht is het thymine dimeer, dat op twee manieren gevormd kan worden:

- a. directe absorptie van ultraviolet licht ($\lambda \approx 260$ nm) door een thymine base
- b. absorptie van licht ($\lambda \approx 300$ nm) door een ander molekuul (een sensibilisator) waarna de energie wordt overgedragen aan een thymine base.

Er blijken echter een aantal natuurlijke reparatie mechanismen te bestaan, die de aangerichte schade kunnen herstellen. Een van deze mechanismen is de fotoreparatie, die wordt gekatalyseerd door fotoreactiverende enzymen. Deze enzymen fungeren in feite als sensibilisator in de splitsingsreactie van het thymine dimeer.

In dit proefschrift worden de resultaten gepubliceerd van een proton NMR onderzoek naar een aantal eigenschappen van thymine dimeren. Aan de orde komen het mechanisme van de splitsing van thymine dimeren, de chemische structuur van thymine dimeren en de veranderingen, die ze teweeg brengen in de conformatie van DNA.

In hoofdstuk I wordt het proefschrift ingeleid met een korte beschrijving van:

- a. de fotochemie van DNA met de nadruk op de thymine dimeren
- b. de natuurlijke mechanismen, die de fotochemische schade in DNA ongedaan kunnen maken

c. de NMR technieken, die toegepast zijn om de verschillende model systemen te onderzoeken.

Het mechanisme van de gesensibiliseerde splitsing van thymine dimeren wordt beschreven in hoofdstuk II. Als model systeem is de fotoreactie tussen de sensibilisator antrachinon (AQ) en *cis-syn* dimethylthymine dimeer (DMTD) gekozen. Verstoringen van de normale NMR lijnintensiteiten (het foto-CIDNP effect) op de resonantie posities van het monomeer dimethylthymine (DMT) tonen aan, dat de splitsingsreactie verloopt via een ion radikaal paar bestaande uit het kation radikaal $DMT^{\cdot+}$ en het anion radikaal $AQ^{\cdot-}$. Uit tijdsafhankelijke foto-CIDNP metingen blijkt, dat de CIDNP effecten binnen $0.2 \mu s$ na initiatie van de fotoreactie ontstaan, hetgeen een indicatie geeft voor de snelheid van het splitsingsproces. Vrij in de oplossing bewegende kation radicalen $DMT^{\cdot+}$ compenseren het CIDNP effect weer gedeeltelijk door disproportioneerings reacties.

In hoofdstuk III komt het belangrijkste model systeem, dat in dit proefschrift wordt beschreven, aan de orde: Een duplex bestaande uit de twee komplementaire DNA strengen d(GCGTTGCG) en d(CGCAACGC). Bestraling van dit duplex met ultraviolet licht heeft dimerisatie van ca. 3% van de thymines tot gevolg. Hetzelfde thymine dimeer, dat in DNA in principe in vier isomere vormen voor kan komen, wordt gevormd na bestraling van de enkele streng d(GCGTTGCG) met een opbrengst van ca. 20%. Na scheiding van het gedimeriseerde en niet-gedimeriseerde enkel strengs materiaal wordt de komplementaire streng d(CGCAACGC) in een 1:1 verhouding aan de thymine dimeer streng d(GCGTTGCG) toegevoegd. Om aan te tonen, dat een dergelijk duplex representatief is voor natuurlijk DNA met stralingsschade, wordt het thymine dimeer duplex samengebracht met een fotoreactiverend enzym verkregen uit de cyanobacterie *Anacystis Nidulans* en bestraald met zichtbaar licht. Met optische en NMR spectroscopie wordt aangetoond, dat het oorspronkelijke duplex weer teruggevormd wordt.

Bestraling van het dinucleotide d(TpT) in aanwezigheid van de sensibilisator acetofenon levert twee isomere thymine dimeren op in een verhouding van 6:1 (hoofdstuk IV). Na zuivering kunnen beide produkten met behulp van 2D NMR technieken (2D NOE en COSY) geïdentificeerd worden. Het fotoprodukt met de hoogste opbrengst blijkt het *cis-syn* isomeer te zijn met beide *N*-glycosidische bindingen in de ANTI conformatie. Het andere fotoprodukt is het *trans-syn* isomeer met de *N*-glycosidische binding van het nucleotide aan de 5' kant in de

SYN conformatie en de *N*-glycosidische binding aan de 3' kant in de ANTI conformatie. Uit een analyse van de *J* koppelings-konstanten van de desoxyribose protonen in het *cis-syn* d(TpT) blijkt, dat de voornaamste conformatie van de desoxyribose behorend bij het nucleotide aan de 3' kant sterk veranderd is ten opzichte van het niet-gedimeriseerde dinucleotide (1'-exo in plaats van 2'-endo). De conformaties van de desoxyribose van het 5' nucleotide zijn vergelijkbaar met die in het niet-dimeriseerde dinucleotide. In het *trans-syn* isomeer vertonen beide desoxyriboses een afwijkend gedrag: Een voorkeur voor een pure 2'-endo conformatie wordt waargenomen.

De hoofdstukken V, VI en VII zijn gewijd aan een nadere analyse van het dubbel strengs octameer d(GCGT^ΔTGCG). d(CGCAACGC). De eerste stap is een zo volledig mogelijke spectrale toekenning van de protonen. In hoofdstuk V wordt de toekenning van de niet-uitwisselbare protonen beschreven. Met behulp van 2D homonucleaire Hartmann-Hahn en 2D NOE spectroscopie worden alle base-protonen en de meeste desoxyribose protonen toegekend. Ter vergelijking wordt dit ook met het dubbel strengs octameer zonder thymine dimeer gedaan. Hieruit blijkt dat het bestraalde octameer een *cis-syn* thymine dimeer bevat van het cyclobutaan type. Een vergelijking van de 2D NOE spectra en de proton chemical shifts van beide dubbel strengs octameren toont aan, dat thymine dimeer vorming niet veel invloed heeft op de normale B-DNA structuur: Verstoring van de structuur blijft beperkt tot een gebied van ten hoogste vier base-paren.

De dubbele helix structuur van DNA wordt gestabiliseerd door waterbruggen tussen de basen adenine en thymine enerzijds en cytosine en guanine anderzijds. In hoofdstuk VI wordt de invloed van thymine dimeer vorming op de stabiliteit van de dubbele helix besproken. Uitstekende probes hiervoor zijn de uitwisselbare imino-protonen van thymine en guanine, die normaliter betrokken zijn in de waterstofbruggen. Op de imino-protonen van de eindstandige base-paren na kunnen alle imino-protonen in het thymine dimeer duplex worden gedetecteerd en toegekend. Uit een vergelijking met het imino-proton spectrum van het duplex zonder thymine dimeer volgt, dat de GC base-paren volledig intact blijven. De twee AT base-paren worden echter aanzienlijk verzwakt door thymine dimeer vorming. Het gevolg is een daling in de smelttemperatuur van de dubbele helix van 13° C. In hoofdstuk VII worden NMR spectroscopie en theoretische methoden gecombineerd om de structuur van het thymine dimeer duplex te

berekenen. Uit een serie 2D NOE spectra opgenomen met verschillende mengtijden konden met een redelijke nauwkeurigheid ($\pm 10\%$) 113 proton-proton afstanden in het thymine dimeer duplex worden opgemeten. In energie-minimalisatie (EM) en moleculaire dynamica (MD) berekeningen werden deze afstanden als randvoorwaarden meegenomen. Het resultaat van de berekeningen is een structuur, die gemiddeld genomen van het B-type is. Sommige lokale conformatie parameters vertonen echter behoorlijke afwijkingen ten opzichte van hun waarden in normaal B-DNA. De belangrijkste afwijking is de grote toename van de *N*-glycosidische hoek van residu T4 hetgeen consequenties heeft voor de base-paring en de stacking-interacties met respectievelijk de residuen A13 en G3. Een andere belangrijke afwijking ten opzichte van de B-DNA structuur is de buiging van de helix-as van ca. 40° . Voor de herkenning van thymine dimeren door reparatie enzymen zouden deze verstoringen van de structuur een belangrijke rol kunnen spelen.

59.024
1989