

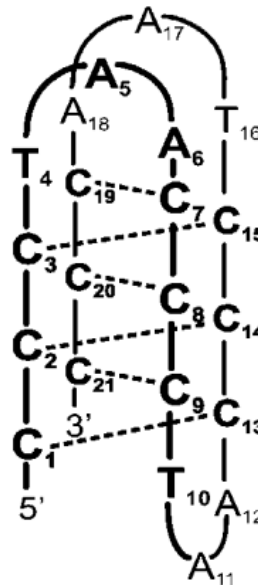
The Nature of Hydrogen Bonds in Cytidine...H⁺...Cytidine DNA Base Pairs

A. L. Lieblein, M. Krämer, A. Dreuw, B. Fürtig and H. Schwalbe

Sabine Weidlich

17.10.2014

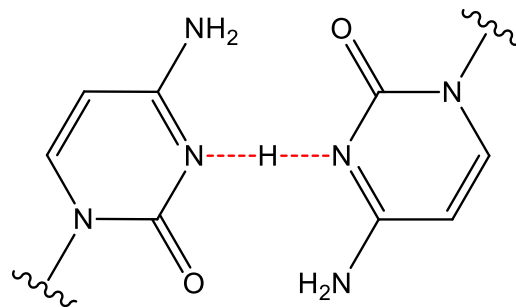
- H-Brückenbindungen in DNA essentiell
- Auch in nicht-kanonischen Strukturen von DNA
- Bsp. Hemiprotonierte Cytidin...H⁺...Cytidin Basenpaare im i-Motiv



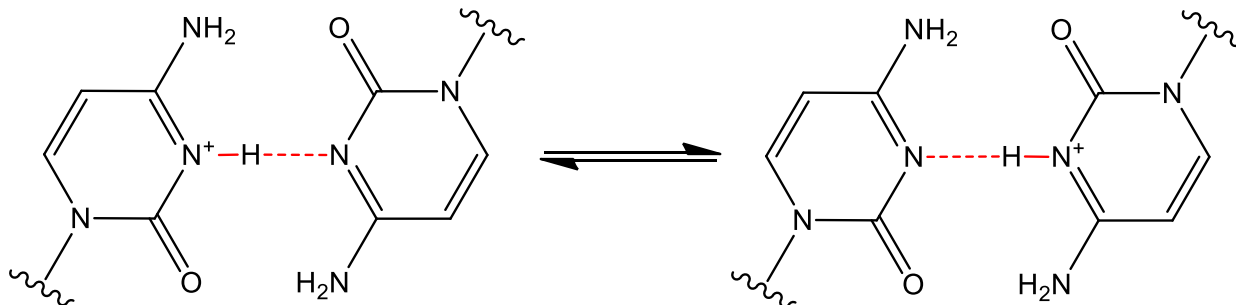
H-Brückenbindung in Cytidin...H⁺...Cytidin

- Zwei Möglichkeiten wie die Bindung vorliegt

- Symmetrisch

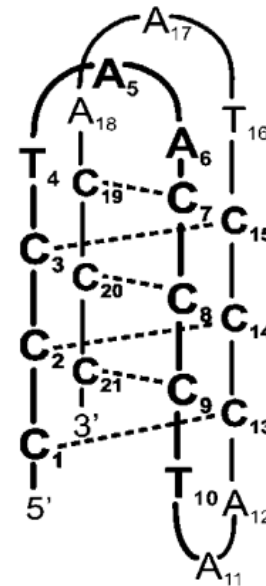


- Unsymmetrisch, fluktuierend

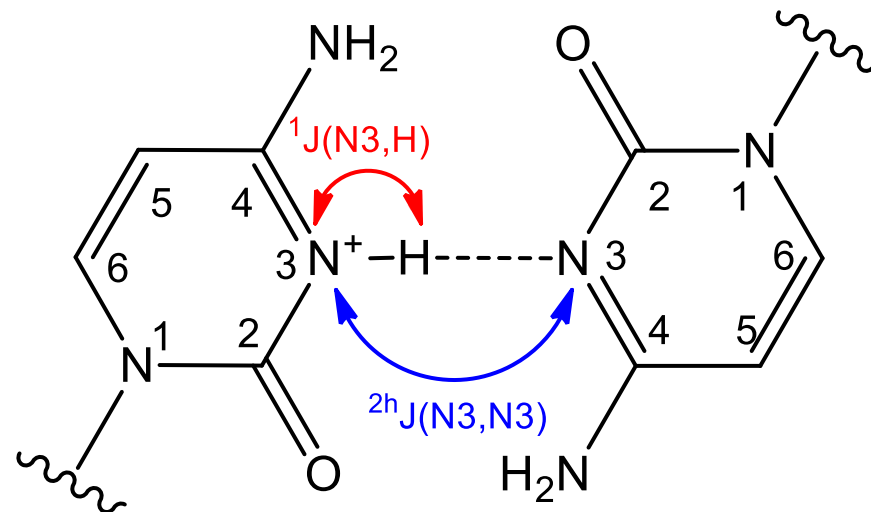


Untersuchte Sequenz

- 21nt-Sequenz: d(CCCTAA)₃CCC
- Faltet sich in Form des i-Motivs
- Selektiv Isotopen-gelabelt zur Messung der ¹J(N,H)-Kopplungen
 - Immer ein C zu 50 % ¹³C und ¹⁵N angereichert
 - Separate Messung der Kopplungskonstanten aller Cytidinreste

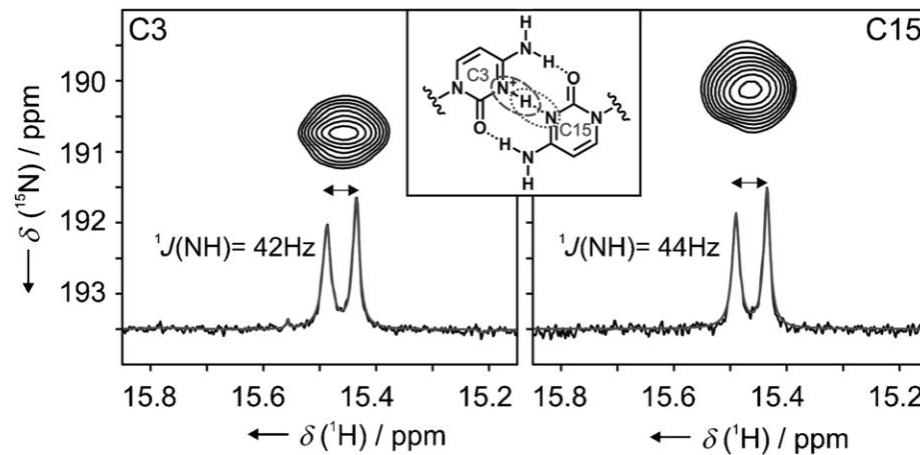


- Messbare Kopplungen $^1J(\text{N3}, \text{H})$ und $^2hJ(\text{N3}, \text{N3})$, wobei Zweitere durch selektives Labeling nicht sichtbar



2D-NMR-Experimente

- Imino-Protonen-Signale ermittelt über ω_2 - ^{15}N -gekoppelte heteronukleare ^1H - ^{15}N -Korrelationsexperimente

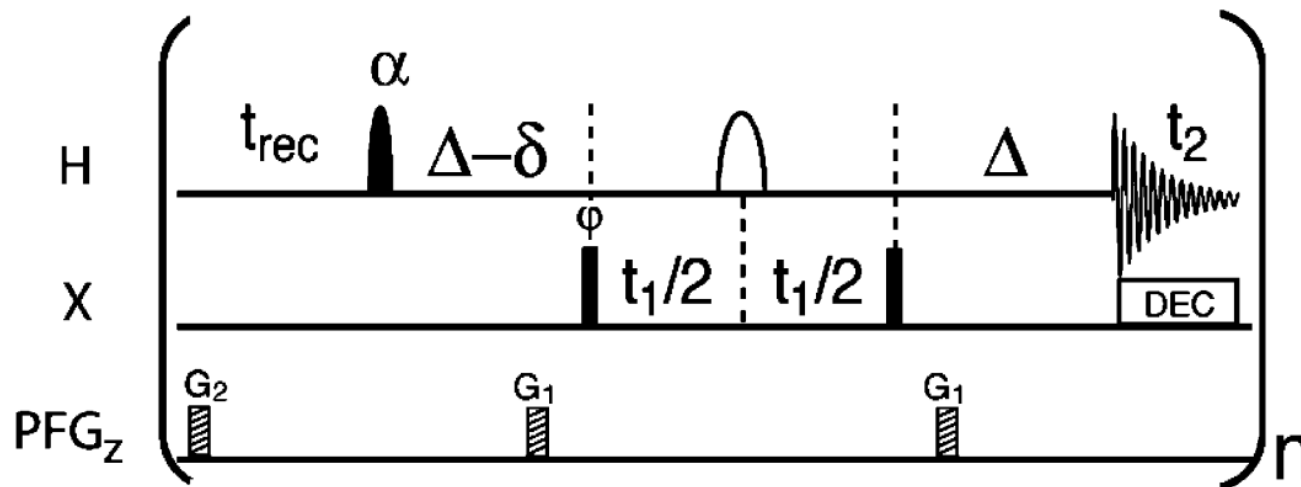


SOFAST-HMQC-Experiment

- Normalerweise dauern 2D-Experimente lange
- SOFAST-HMQC = band-Selective Optimized Flip-Angle Short-Transient heteronuclear multiple quantum coherence
 - Hohes Signal-Rausch-Verhältnis
- Erster Puls in direkter Dimension kein 90° Puls
 - Anregung im Ernst-Winkel
 - Relaxationszeit wird verkürzt
 - Kein Verlust an Signalintensität
 - Ermöglicht Erhöhung der Repetitionsrate des Experiments

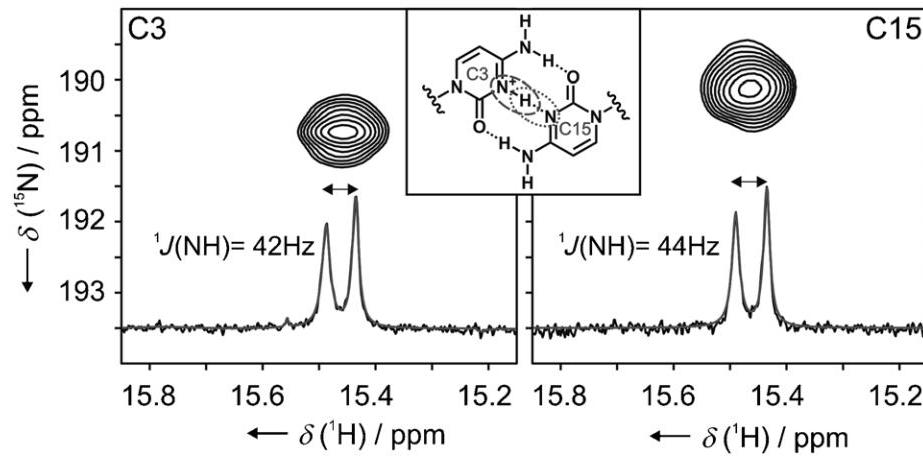
SOFAST-HMQC-Experiment

- Pulssequenz für das SOFAST-HMQC-Experiment



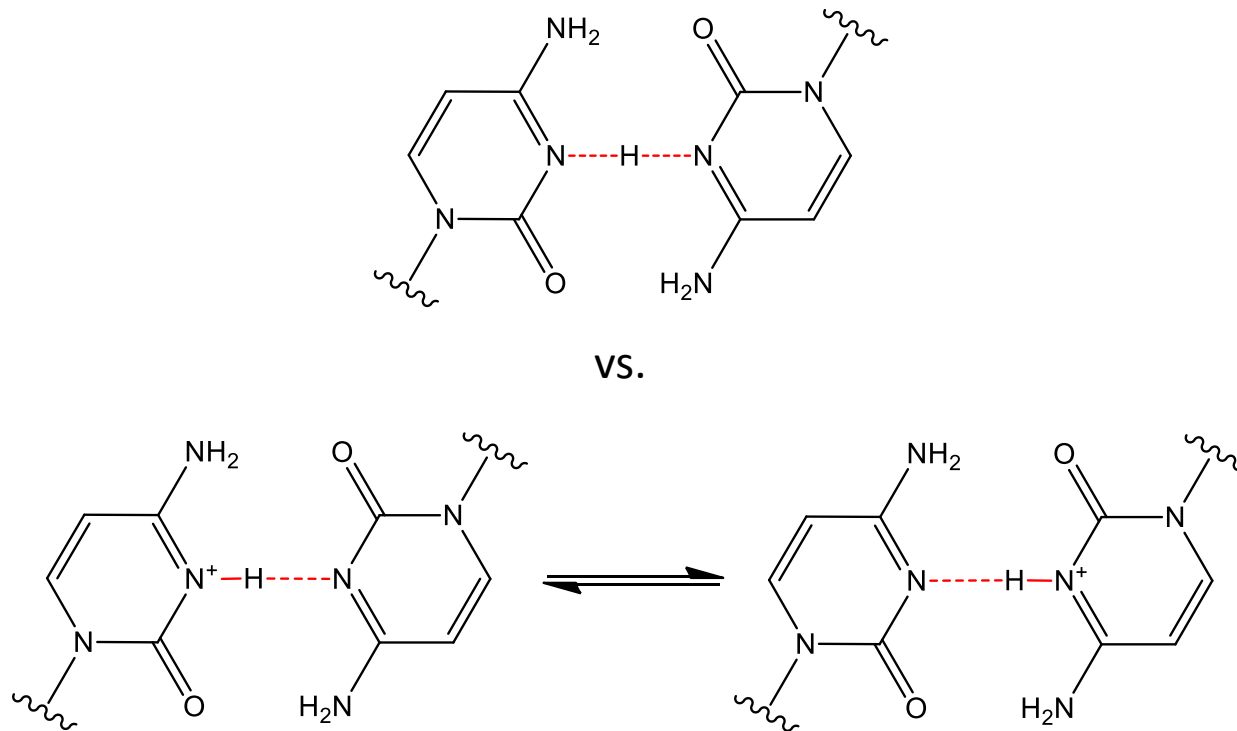
SOFAST-HMQC-Experiment

- Verwendung des SOFAST-HMQC-Experiments um schneller mehr Daten zu erhalten
- Aufspaltung in der ^{15}N -Dimension führt zu sichtbarer $^1\text{J}(\text{N3,H})$ -Kopplung
 - Keine Entkopplung in der t_2 -Zeit in der indirekten Dimension



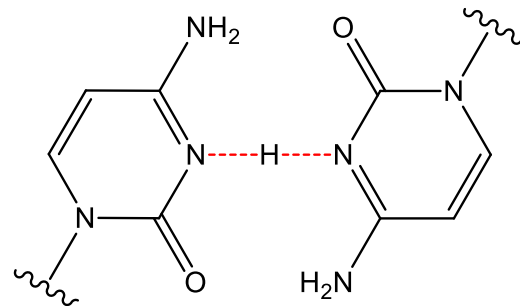
$^1J(\text{N,H})$ -Kopplung

- Kovalente N-H-Bindung: $^1J(\text{N,H}) \approx 90 \text{ Hz}$
 - Gemessene Kopplungskonstanten: 36-46 Hz

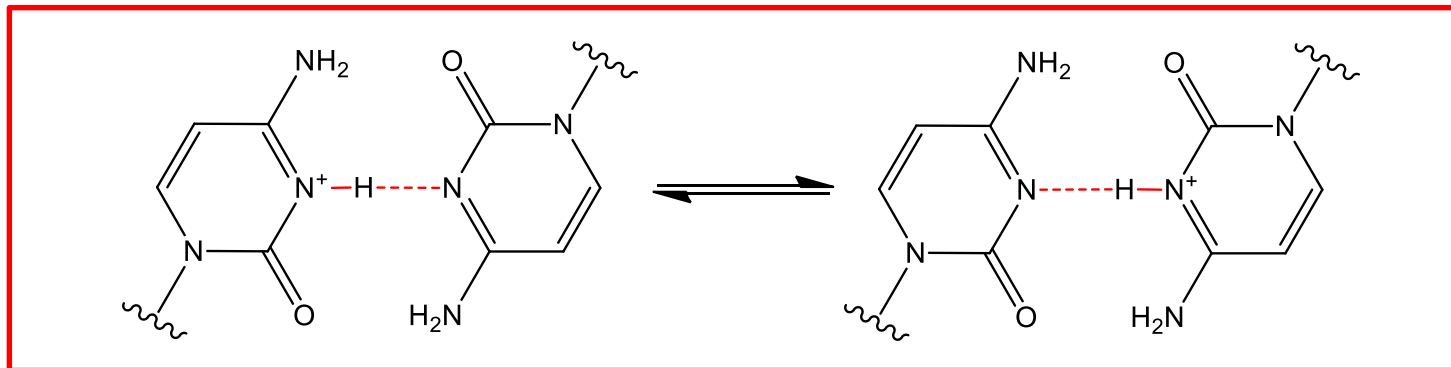


$^1J(\text{N,H})$ -Kopplung

- Kovalente N-H-Bindung: $^1J(\text{N,H}) \approx 90 \text{ Hz}$
- Gemessene Kopplungskonstanten: 36-46 Hz



VS.

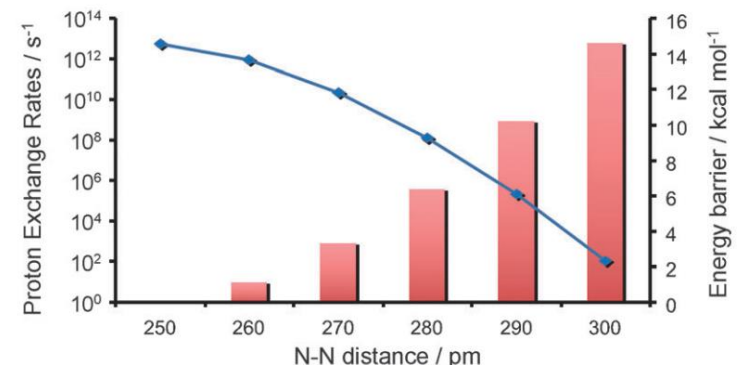


H-Austausch-Experimente

- Magnetisierungstransfer von H_2O auf H^+
- Zur Ermittlung Stärke der H-Brücken
- Austausch in i-Motiven langsamer als in DNA-Duplexen
 - Weniger freie Drehbarkeit
 - Höhere Basenpaarstabilität im i-Motiv

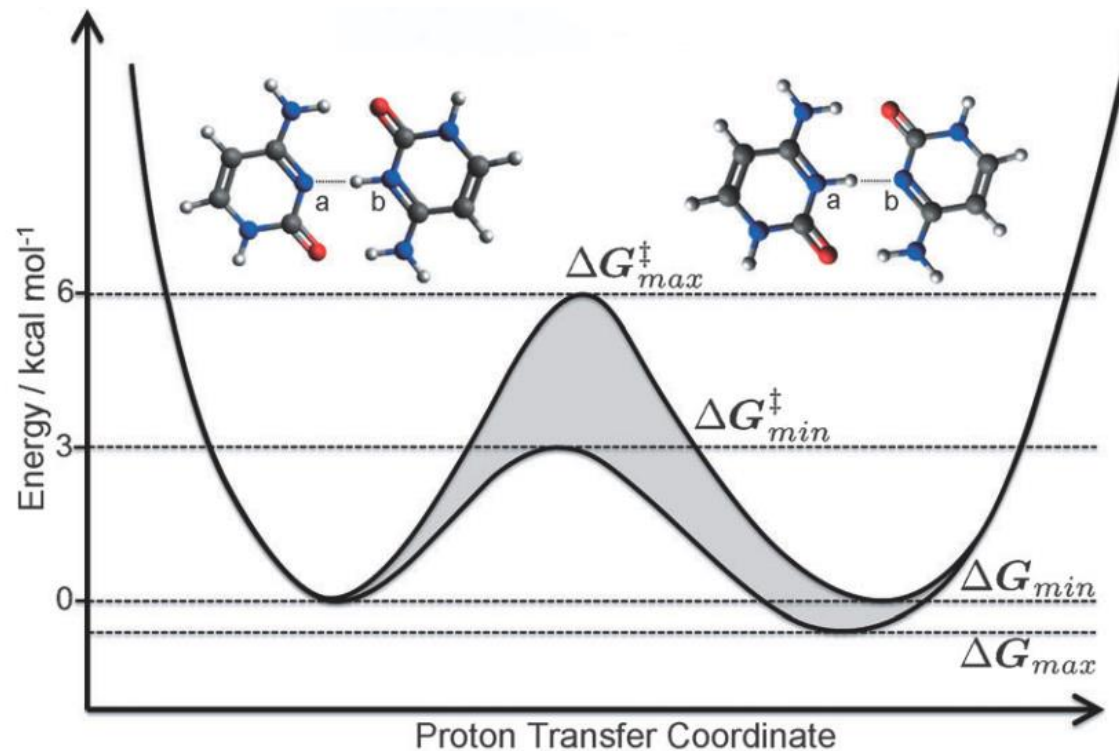
DFT-Rechnungen

- Berechnung der Resonanzen und Übergangsenergien in der Gasphase
- Konsistent mit den ermittelten Kopplungen
 - Im Durchschnitt 45 Hz (90 Hz in kovalenter N-H-Bindung)
 - Keine Lokalisation der Protonen an einem N-Atom, sondern „geteiltes“ Proton
- Protonentransfer ist abhängig vom N-N-Abstand
 - $< 2.5 \text{ \AA}$ Proton in der Mitte lokalisiert
 - Bei Abstandsvergrößerung Fluktuation



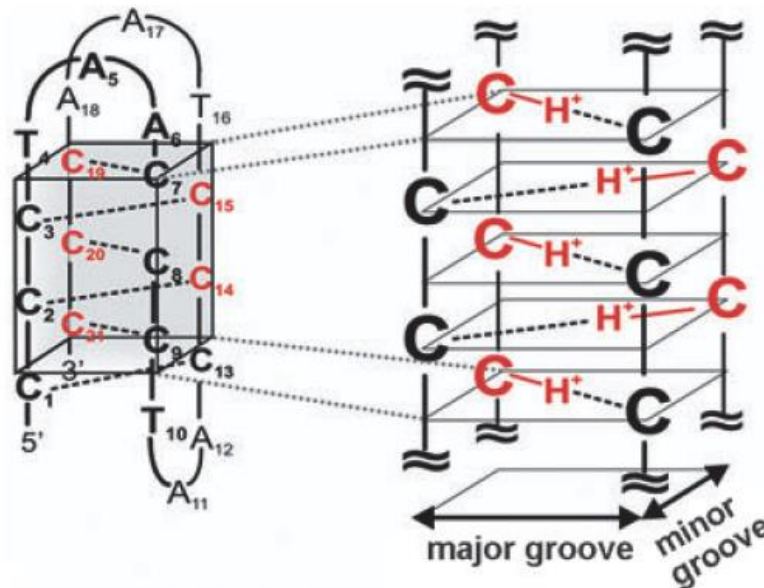
DFT-Rechnungen

- Fluktuation des Protons zwischen den Doppel-Potentialtöpfen
 - Rate von mindestens 10^8 s^{-1} mit einer Barriere von bis zu 6 kcal/mol



Hypothese

- Proton will größtmöglichen Abstand zu Proton in nächster „Schicht“ haben
- Protonenfluktuationen müssten also in Abhängigkeit voneinander ablaufen, wurde jedoch nicht nachgewiesen



Zusammenfassung

- Geteiltes oder fluktuierendes Proton im Cytidin...H⁺...Cytidin Basenpaar
 - Messung von ω_2 -¹⁵N-gekoppelte heteronukleare ¹H-¹⁵N-Korrelationsexperimenten mit der SOFAST-HMQC-Sequenz
 - Schnell, gutes S/N-Verhältnis, ¹H-¹⁵N-Kopplungskonstanten ermittelbar
 - H-Brücken-Stärke über H-Austausch-Experimente
 - proof-of-principle durch DFT-Rechnungen
 - Fluktuation des Protons in Doppelpotentialtöpfen mit Übergangsrate von mind. 10^8 s^{-1}
 - Hypothese von Abhängigkeit der Protonenfluktuation
-