

Wasserstoffbrücken in i-Motiv-DNA

Wasserstoffbrücken in Cytidin...H⁺...Cytidin-DNA-Basenpaaren**

Anna Lena Lieblein, Maximilian Krämer, Andreas Dreuw,* Boris Fürtig und Harald Schwalbe*

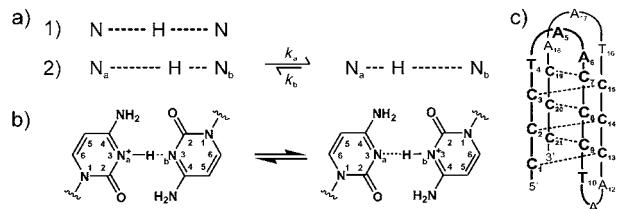
Professor Karl Hensen gewidmet

Die Bildung von Wasserstoffbrücken stellt einen wichtigen Stabilisierungsmechanismus bei der Faltung von Biomolekülen dar.^[1] Grundlegend für die Weitergabe der genetischen Information ist die spezifische Bildung von Wasserstoffbrücken in DNA. Die Geometrie der Wasserstoffbrücken in Watson-Crick-Basenpaaren ist wohlbekannt. Neben den kanonischen Watson-Crick-Basenpaaren ist DNA auch in der Lage, nichtkanonische Strukturen zu bilden, in denen ungewöhnliche Basenpaare beobachtet werden. Solche nichtkanonischen Basenpaare findet man für protonierte Cytidin-Nukleotide: Triplex-DNA zum Beispiel bildet C⁺-G-C-Basentripletts, in denen ein protoniertes Cytidin mit der Hoogsteen-Seite eines Guanosinnukleotids wechselwirkt.^[2] Hemiprotonierte Cytidin...H⁺...Cytidin-Basenpaare^[3] (abgekürzt C-C⁺) werden in i-Motiv-DNA im leicht sauren pH-Bereich gebildet.

In C-C⁺-Basenpaaren teilen sich die beiden Stickstoffatome in den 3-Positionen ein einzelnes Proton (Schema 1b). i-Motiv-DNA-Strukturen werden durch die Bildung von C-C⁺-Basenpaaren stabilisiert. Die Anordnung dieser viersträngigen Struktur wird durch die Interkalation der hemiprotonierten Basenpaare erzeugt. Das Cytidinbasenpaar verknüpft parallele DNA-Strängen (Schema 1c).

Im allgemeinen sind zwei Arten von N...H...N-Wasserstoffbrücken möglich: 1) eine symmetrische Wasserstoffbrücke in einem Einzelminimumspotential oder 2) eine Wasserstoffbrücke in einem Doppelminimumpotential mit delokalisierten Protonen, die mit den Transferraten k_a und k_b zwischen beiden Positionen oszillieren (Schema 1a).^[4]

C-C⁺-Basenpaare (Schema 1b) wurden das erste Mal in Kristallen der Cytosin-5-essigsäure beobachtet.^[5] Ihre Einführung in ein d(TC₅)-Tetramer führt bei pH ≈ 6 zur Bildung



Schema 1. a) Symmetrische (1) und unsymmetrische (2) N...H⁺...N-Wasserstoffbrücken. b) N...H⁺...N-Wasserstoffbrücken in hemiprotonierten C-C⁺-Basenpaaren. c) Die interkalierte viersträngige i-Motiv-DNA-Struktur.

eines DNA-i-Motivs. Dieses DNA-Strukturmotiv wurde ausführlich von Leroy et al. untersucht.^[6] Basierend auf Linienbreitenanalysen postulierten Leroy et al. eine Wasserstoffbrücke mit einem Doppelminimumpotential und 8×10^4 s⁻¹ als obere Grenze für die Protonentransferrate. In der NMR-basierten Struktur des intramolekularen i-Motivs (PDB-Eintrag: 1ELN)^[7] werden die C-C⁺-Basenpaare mit einer maximalen Abweichung von 18° von der Planarität und einem N-N-Abstand von 2.6–2.8 Å angegeben.^[7]

Wir haben NMR-spektroskopische und quantenchemische Untersuchungen der N...H⁺...N-Bindung in den C-C⁺-Basenpaaren einer 21 Nukleotide (nt) langen DNA mit der Sequenz d(CCCTAA)₃CCC durchgeführt. Dazu wurden an selektiv isotopenmarkierten DNA-Sequenzen die folgende NMR-Parameter bestimmt: Kopplungskonstanten ¹J(NH), ¹H- und ¹⁵N-chemische Verschiebungen sowie Austauschrate. Um weiterhin Informationen über die Geometrie der Wasserstoffbrücken und ihre Stärke in Lösung zu erhalten, wurden quantenchemische Rechnungen durchgeführt. Die kombinierten NMR/QM-Experimente zeigen, dass die N...H⁺...N-Bindung in C-C⁺-Basenpaaren als Wasserstoffbrücke in einem asymmetrischen Doppelminimumpotential beschrieben werden kann (gemäß (2) in Schema 1a). Die Struktur des DNA-i-Motivs bringt lokale Asymmetrien mit sich, was dazu führt, dass zwei unterschiedliche Potentiale sowie verschiedenen Wechselraten für den Hin- und Rücktransfer des Protons vorliegen. Das schnelle Hin- und Her-springen des Protons führt zu einer einzigen gemittelten ¹H-chemischen Verschiebung und zu zwei ¹⁵N-chemischen Verschiebung (Tabelle 1). Auch die Kopplungskonstanten ¹J(NH) sind gemittelt, und damit ist es möglich, die Populationen der beiden Konformationen zu bestimmen (Tabelle 2).

Für unsere Untersuchungen wurden 12 verschiedene selektiv markierte 21-mer-DNA-Sequenzen (d-(CCCTAA)₃CCC) verwendet, in denen jeweils nur ein einziges Cytidin zu 50 % ¹³C- und ¹⁵N-isotopenmarkiert war.

[*] Dipl.-Chem. A. L. Lieblein, Dr. B. Fürtig, Prof. Dr. H. Schwalbe
Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie
Biomolekulares Magnetresonanz Zentrum
Goethe-Universität Frankfurt/Main
Max-von-Laue-Straße 7, 60438 Frankfurt (Deutschland)
E-Mail: schwalbe@nmr.uni-frankfurt.de
Homepage: <http://schwalbe.org.chemie.uni-frankfurt.de>
M. Krämer, Prof. Dr. A. Dreuw
Interdisziplinäres Zentrum für Wissenschaftliches Rechnen
Ruprecht-Karls-Universität
Im Neuenheimer Feld 368, 69120 Heidelberg (Deutschland)
E-Mail: dreuw@uni-heidelberg.de

[**] Arbeiten in der Gruppe von H.S. werden durch die DFG und das Bundesland Hessen (BMRZ) unterstützt. H.S. ist Mitglied im DFG geförderten Exzellenzcluster „Makromolekulare Komplexe“. Wir danken Elke Stirnal für die HPLC-Aufreinigung der DNA-Proben.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201200549> zu finden.

Tabelle 1: ^1H - und ^{15}N -chemische Verschiebungen erhalten durch ^{15}N -HMQC- und ^{15}N -gefiliterte 1D-HMQC-Experimente.

Basenpaar	$\delta(^1\text{H})$ [ppm]	$\delta(^{15}\text{N})$ [ppm]	$\Delta\delta(^{15}\text{N})$ [ppm]
(^{15}N)C7-C19	15.31	193.40	
C7-(^{15}N)C19	15.32	190.48	2.92
(^{15}N)C3-C15	15.46	190.73	
C3-(^{15}N)C15	15.47	190.12	0.61
(^{15}N)C8-C20	15.73	191.11	
C8-(^{15}N)C20	15.74	191.56	0.45
(^{15}N)C2-C14	15.62	192.60	
C2-(^{15}N)C14	15.60	189.87	2.73
(^{15}N)C9-C21	15.53	191.51	
C9-(^{15}N)C21	n.b. ^[a]	n.b. ^[a]	n.b. ^[a]
(^{15}N)C13-C1	15.49	190.20	
C13-(^{15}N)C1 ^[b]	15.47	191.52	1.32

[a] n.b.: nicht bestimmt. [b] Die Sequenz von C1* wurde am 5'-Ende aufgrund von Syntheseproblemen durch ein Thymidin erweitert.

Diese Markierungsstrategie ermöglicht die separate Bestimmung von $^1J(\text{N}3_a, \text{H}3)$ und $^1J(\text{N}3_b, \text{H}3)$ für alle Cytidin-Nukleotide. Außerdem werden die durch den Raum vermittelten $^{2h}J(\text{N}3_a, \text{N}3_b)$ - und $^{1h}J(\text{H}3_a, \text{N}3_b)$ -Kopplung durch die Verwendung der selektiv markierten Probe unterdrückt. Die Zuordnung der Iminoprotonensignale dieser DNA-Sequenz wurde bereits veröffentlicht;^[8] alle Iminoprotonensignale der Nukleobasen konnten mithilfe von $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -Heterokernspektren in Kombination mit der selektiven Markierungsstrategie aufgelöst werden (Abbildung S1). Abbildung 1 zeigt die 2D-Darstellung sowie die extrahierten eindimensionalen Reihen des ω_2 - ^{15}N -gekoppelten $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -NMR-Korrelationsexperiments (^{15}N -HMQC, Abbildung S2). Hier sind exemplarisch zwei DNA-Proben der Nukleotide C3 bzw. C15 gezeigt. Die Spektren verdeutlichen, dass die ^1H -chemische Verschiebung des geteilten Protons in beiden Proben identisch ist (mit $\Delta\delta(^1\text{H}) \approx 0.01\text{--}0.02$ ppm, siehe Tabelle 1), während die ^{15}N -chemischen Verschiebungen unterschiedlich sind (mit $\Delta\delta(^{15}\text{N}) \approx 0.45\text{--}2.92$ ppm, Tabelle 1). Anhand der Aufspaltung in

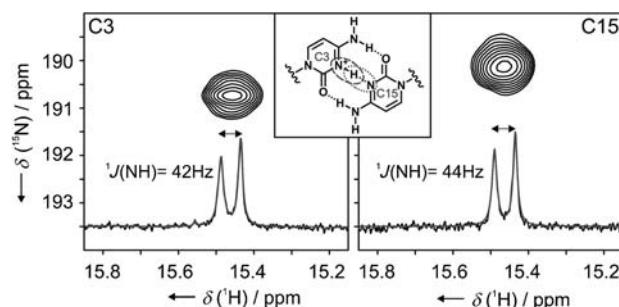


Abbildung 1: ^{15}N -HMQC-Spektren der DNA-Sequenzen C3 und C15 und ^{15}N -gefiliterte 1D-HMQC-Spektren mit Dekonvolution (graue Linien). Der Einschub zeigt das Schema eines C-C⁺-Basenpaares. Die Spektren wurden bei 288 K und 800 MHz aufgenommen.

ω_2 wurden die Kopplungskonstanten $^1J(\text{NH})$ durch Dekonvolution des Dupletts bestimmt; ihre Werte liegen zwischen 36 und 46 Hz (Tabelle 2).

Für die Sequenzen, bei denen C2, C14 und C20 isotonenmarkiert sind, sind zwei NMR-Signalsätze aufgrund des Vorliegens von zwei Konformationen der i-Motiv-DNA-Struktur zu beobachten (Abbildung S1).^[8] Die Kopplungskonstanten $^1J(\text{NH})$ beider Konformationen liegen in der gleichen Größenordnung. Die Kopplungskonstanten aller sechs C-C⁺-Basenpaare des i-Motivs liegen bei $^1J(\text{NH}) = 36$ bis 46 Hz und unterscheiden sich dadurch von $^1J(\text{NH}) \approx 90$ Hz, die bei Stickstoff-Donoratomen und deren kovalent gebundenen Wasserstoffatomen auftreten. Darüber hinaus werden für einige Basenpaare (C7-C19, C3-C15 und C2-C14) zwei verschiedene Kopplungskonstanten $^1J(\text{NH})$ beobachtet, eine für jedes Cytidin, wohingegen in den Basenpaaren C8-C20 und C1-C13 identische Kopplungskonstanten gefunden werden, unabhängig davon, welches der beiden Nukleotide ^{15}N -angereichert ist.

Zur weiteren Charakterisierung der ungewöhnlichen Basenpaarung wurden Austauschexperimente durchgeführt, um

Tabelle 2: Berechnete relative Energien und Kopplungskonstanten der unterschiedlichen Protonenbindung verschiedener C-C⁺-Basenpaare des i-Motivs verglichen mit den experimentell erhaltenen Werten.

Basenpaar	ΔE [kcal mol ⁻¹] ^[a]	relative Population ^[b]		$^1J(\text{NH})$ [Hz] Theorie ^[c] (c/h/m)	Expt.	$\Delta^1J(\text{NH})$ [Hz] Theorie ^[d] Expt.	
		Theorie	Expt.			Theorie ^[e]	Expt.
(^{15}N)C7-C19	0.278	0.62	0.78	54.3/4.6/23.8 55.1/5.1/35.8	36 46	12.0	10
C7-(^{15}N)C19				63.2/0.0/28.9 63.2/0.0/34.2	42 44	5.3	2
(^{15}N)C3-C15	0.099	0.85	0.95	63.6/0.1/31.1 63.5/0.1/32.5	42 42	1.4	0
C3-(^{15}N)C15				64.0/0.1/27.6 63.9/0.1/36.5	39 46	8.9	7
(^{15}N)C8-C20	0.027	0.96	1.00	64.3/0.2/29.9 64.3/0.3/34.7	41 n.b.	4.8	n.b.
C8-(^{15}N)C20				63.8/0.0/28.6 63.9/0.0/35.3	45 45*	6.7	0 ^[e]
(^{15}N)C2-C14	0.165	0.76	0.84				
C2-(^{15}N)C14							
(^{15}N)C9-C21	0.091	0.86	n.b.				
C9-(^{15}N)C21							
(^{15}N)C13-C1	0.123	0.82	1.00				
C13-(^{15}N)C1							

[a] DFT-basierte Energiedifferenzen der unterschiedlichen Protonierungszustände. Da alle untersuchten Nukleobasen gleich sind, zeigen ΔH und ΔG nur kleine Unterschiede, weil die Zustandsfunktionen praktisch identisch sind. [b] Der theoretische Wert der relative Populationen wurde berechnet gemäß $p1/p2 = \exp(\Delta E/kT)$ ($T = 300$ K), während die experimentellen Populationen aus den Kopplungskonstanten berechnet wurden ($J1/J2$). [c] Die berechneten Kopplungskonstanten sind angegeben für die entweder kovalent gebundenen (c) oder wasserstoffgebundenen (h) Protonen, bezogen auf die jeweilige Nucleobase; m bezeichnet den Mittelwert beider Populationen. [d] Unterschiede als Mittelwert der Populationen. [e] Die experimentellen Werte weisen einen großen Fehler aufgrund von experimenteller Ungenauigkeit auf (siehe die Hintergrundinformation). n.b.: nicht beobachtet.

die Stärke der Wasserstoffbrücke zu bestimmen. Der Austausch der Iminoprotonen und Freie Energien von C-C⁺-Basenpaaren wurden bereits für mehrere i-Motiv-Strukturen untersucht.^[7] In Übereinstimmung mit den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen beobachten wir in der hier untersuchten i-Motiv-Struktur Halbwertszeiten $t_{1/2}$ für den Austausch in der Größenordnung von Sekunden.^[8] Der Iminoprotonenaustausch in i-Motiven ist somit langsamer als in Duplex-DNA^[7] aufgrund der höheren Stabilität der C-C⁺-Basenpaare.

Um ein Modell für die Dynamik sowie die elektronische Struktur der Wasserstoffbrückenbindung in C-C⁺-Basenpaaren entwickeln zu können, wurden quantenchemische Dichtefunktionaltheorie(DFT)-Rechnungen durchgeführt – ein Verfahren, das ausreichend präzise für eine qualitative Analyse ist (siehe die Hintergrundinformationen). Zuerst wurde ein symmetrisches C-C⁺-Basenpaar berechnet; es zeigt sich, dass die Barriere des Protonentransfers zwischen den beiden Cytidinen stark vom N-N-Abstand abhängt (Abbildung 2 a). Für Abstände unter 2.5 Å teilen sich die beiden Cytidine das Proton, und es ist genau in der Mitte beider Stickstoffatome platziert. Vergrößert man den N-N-Abstand, führt das zu einer Lokalisierung des Protons an einem Stickstoffatom: Das Proton fluktuiert in einem typischen Doppelminimum-potential. Die Barriere erhöht sich mit steigendem N-N-Abstand und bestimmt somit die Protonentransferrate (Abbildung 2 a). Für N-N-Abstände in einer Größenordnung von 2.6 bis 2.8 Å, wie sie in der PDB-Struktur (1ELN) berichtet werden, beträgt die Barriere maximal 6 kcal mol⁻¹. Dies entspricht einer Protonentransferrate von mindestens 10⁸ s⁻¹, was hier für das C-C⁺-Basenpaar C9-C21 mit dem größten N-N-Abstand unter Verwendung der Arrhenius-Gleichung bestimmt wurde. Ein möglicher Austausch der Protonen in einem Tunnelmechanismus würde diese Rate weiter erhöhen.

Die NMR-Parameter wurden für alle sechs C-C⁺-Basenpaare der i-Motiv-Struktur individuell in der Gasphase mithilfe von DFT berechnet. Das zugehörige Modell wurde erstellt, indem die Koordinaten aus der NMR-Struktur (PDB-Eintrag: 1ELN) extrahiert, nichtaufgelöste Wasserstoffatome ergänzt sowie alle intramolekularen Geometrieparameter optimiert wurden, während die relative Orientierung der Basenpaare beibehalten wurde. Analog zu diesem Vorgehen wurden ausschließlich die Effekte der Umgebung bezüglich der Orientierung der Nukleobasen in die Rechnung einbezogen, nicht aber die direkten Effekte der Umgebung auf die NMR-Parameter. Mit diesen Rechnungen wollen wir die beobachtete Asymmetrie verifizieren, zielen aber nicht auf eine quantitative Übereinstimmung ab, auch weil die genauen geometrischen Verhältnisse in den Wasserstoffbrücken aus der experimentellen Struktur wahrscheinlich abhängig vom Kraftfeld sind, das bei der Strukturrechnung verwendet wurde.

In Tabelle 2 sind die Energieunterschiede sowie Boltzmann-Populationen für die Protonierung jedes einzelnen Cytidins aufgeführt. Die Kopplungskonstanten $^1J(\text{NH})$ sind für jede einzelne Nukleobase angegeben, wenn das Proton kovalent (c) an die Nukleobase gebunden ist oder über eine Wasserstoffbrücke gebunden (h) ist, sowie der Mittelwert beider Populationen (m). In diesen Rechnungen erhalten wir

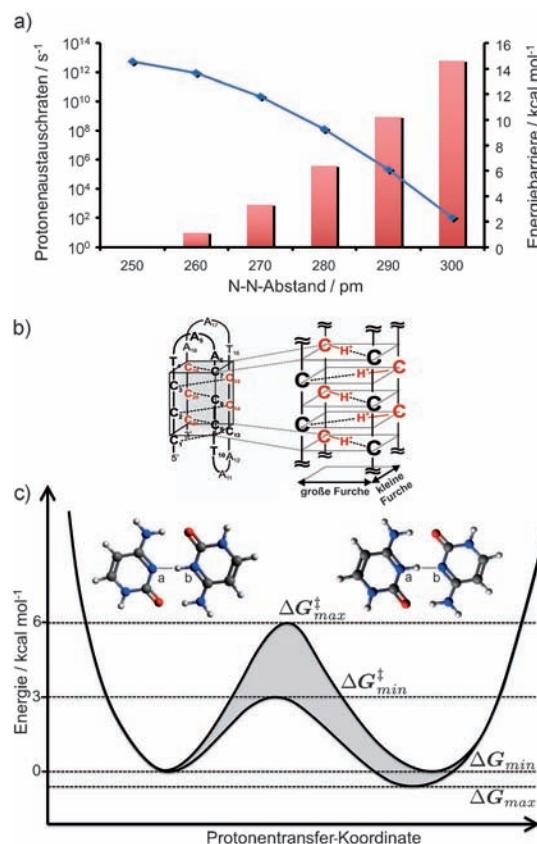


Abbildung 2. a) Abhängigkeit der Barrierenhöhe und der Protonenaustauschraten vom N-N-Abstand in einem C-C⁺-Basenpaar innerhalb des DNA-i-Motivs. b) Darstellung der geringfügig erhöhten Population eines Protons an einem ausgewählten Cytidin (markiert in rot). c) Energiediagramm der N...H⁺...N-Wasserstoffbrücke im C-C⁺-Basenpaar. Die Potentiale der sechs untersuchten Basenpaare befinden sich innerhalb des grau unterlegten Bereichs, was einer maximalen Barriere von 6 kcal mol⁻¹ und einer minimalen Protonentransferrate von 10⁸ s⁻¹ entspricht.

für alle Basenpaare unterschiedliche Kopplungskonstanten. Die Unterschiede sind klein und sehr ähnlich für alle Basenpaare und folgen dem experimentellen Trend.

Im Experiment werden $^1J(\text{NH})$ -Werte in der Größenordnung von 45 Hz beobachtet, die ungefähr halb so groß sind wie die Kopplungskonstanten für kovalente N-H-Bindungen in Nukleobasen. Das Proton ist somit nicht permanent an eines der beiden Stickstoffatome gebunden. Zudem variieren neben den Kopplungskonstanten $^1J(\text{NH})$, die für beide Stickstoffatome in 3-Position in jedem C-C⁺-Basenpaar gemessen wurden, auch die ^{15}N -chemischen Verschiebungen der beiden Stickstoffatome innerhalb eines Basenpaares entlang des i-Motiv-Kerns. Bemerkenswert ist, dass der relative Unterschied der ^{15}N -chemischen Verschiebungen innerhalb eines C-C⁺-Basenpaares mit den Unterschieden in $^1J(\text{NH})$ korreliert. Diese kleinen Unterschiede werden durch die quantenchemischen Rechnungen bestätigt. Sequenzabhängige Effekte, die auf der Basis der Strukturbestimmung in Lösung erhalten wurden, können für alle sechs Basenpaare detektiert werden. Sowohl die experimentellen NMR-Daten als auch die quantenchemischen Rechnungen zeigen, dass die

Population des Protons in den Cytidinen C14, C15, C19, C20 und C21 etwas erhöht ist (Abbildung 2b). Wir führen diese Unterschiede auf eine minimale strukturelle Asymmetrie in der π -Stapelung der sechs C-C⁺-Basenpaare sowie auf die elektrostatische Abstoßung zurück. Generell kann man sagen, dass ein Proton in einem C-C⁺-Basenpaar bevorzugt die Position einnimmt, in der es den größtmöglichen Abstand zum Proton im nächsten C-C⁺-Basenpaar hat. Diese Situation liegt vor, wenn das nächste Proton an dem Cytidin lokalisiert ist, das sich quer über der großen Furche befindet (Abbildung 2b). Interessanterweise würde solch eine Präferenz der Protonenposition auf eine Art von Kooperativität des Protonensprungs hinweisen; allerdings kann diese Hypothese hier nicht verifiziert werden.

Die in DNA-i-Motiven vorliegenden hemiprotonierten Basenpaare sind vergleichbar mit kationischen Wasserstoffbrücken, die bereits in kleinen Molekülen beobachtet werden konnten. Schah-Mohammedi et al. beobachteten eine Kopplungskonstante $^1J(\text{NH})$ von 40 Hz im symmetrischen Bis(collidinium)-Kation.^[4] Zudem fanden Pietrzak et al. kationische Wasserstoffbrücken in einfach protonierten 1,8-Bis-(amino)naphthalinen; die Bindung in solchen organischen Modellsystemen beruht auf einer schnellen intramolekularen Tautomerie.^[9] Im DNA-i-Motiv liegt das Proton in einem Doppelminimumpotential vor und ist somit alternierend an einem der beiden beteiligten Cytidine mit einem kurzen N-H-Abstand lokalisiert (Abbildung 2c). Zudem liefern Berechnungen der Aktivierungsenergie ΔG^\ddagger eine untere Grenze für die Protonentransferrate, welche für den Transfer zwischen den Nukleobasen eines C-C⁺-Basenpaares bei mindestens 10^8 s^{-1} liegt.

Zusammenfassend analysieren wir nichtkanonische Wasserstoffbrücken in DNA, die denen in organischen Molekülen

wie dem Bis(collidinium)-Kation ähneln. Schnelles Springen des Protons bei geringer Barriereförde, potenziell unter Ausnutzung eines Tunnelmechanismus, bietet die Möglichkeit, nichtkanonische Wasserstoffbrücken sowohl in natürlichen als auch in nichtkanonischen DNA-Oligomeren einzubauen und N-N-Abstände durch Modulation der Gesamtstruktur des biomolekularen Komplexes zu optimieren.

Eingegangen am 19. Januar 2012
Online veröffentlicht am 12. März 2012

Stichwörter: i-Motiv-DNA · Kationische Wasserstoffbrücken · NMR-Spektroskopie · Quantenchemische Rechnungen

- [1] T. S. Moore, T. F. Winmill, *J. Chem. Soc.* **1912**, 101, 1635–1676.
- [2] a) M. D. Frank-Kamenetskii, S. M. Mirkin, *Annu. Rev. Biochem.* **1995**, 64, 65–95; b) P. Rajagopal, J. Feigon, *Biochemistry* **1989**, 28, 7859–7870.
- [3] K. Gehring, J. L. Leroy, M. Gueron, *Nature* **1993**, 363, 561–565.
- [4] P. Schah-Mohammedi, I. G. Shenderovich, C. Detering, H. H. Limbach, P. M. Tolstoy, S. N. Smirnov, G. S. Denisov, N. S. Golubev, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 12878–12879.
- [5] R. E. Marsh, R. Bierstedt, E. L. Eichhorn, *Acta Crystallogr.* **1962**, 15, 310–316.
- [6] J. L. Leroy, K. Gehring, A. Kettani, M. Gueron, *Biochemistry* **1993**, 32, 6019–6031.
- [7] A. T. Phan, M. Gueron, J. L. Leroy, *J. Mol. Biol.* **2000**, 299, 123–144.
- [8] A. L. Lieblein, J. Buck, K. Schlepckow, B. Fürtig, H. Schwalbe, *Angew. Chem.* **2012**, 124, 255–259; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 250–253.
- [9] M. Pietrzak, J. P. Wehling, S. Kong, P. M. Tolstoy, I. G. Shenderovich, C. Lopez, R. M. Claramunt, J. Elguero, G. S. Denisov, H. H. Limbach, *Chem. Eur. J.* **2010**, 16, 1679–1690.