



Doctoral Thesis

NMR studies and solution structure determination of 1:1 complexes formed between Hoechst 33258 and two dodecamer DNA duplexes

Author(s):

Fede, Agostino

Publication Date:

1992

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000668799> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

**NMR STUDIES AND SOLUTION STRUCTURE
DETERMINATION OF 1:1 COMPLEXES FORMED BETWEEN
HOECHST 33258 AND TWO DODECAMER DNA DUPLEXES**

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

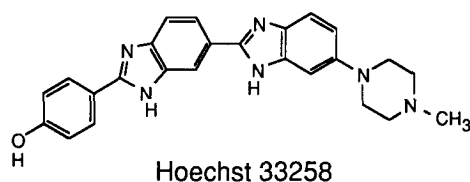
for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by
AGOSTINO FEDE
dipl. sc. nat. ETH
born July 6, 1964
citizen of Italy

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Kurt Wüthrich, examiner
Dr. Martin Billeter, co-examiner
Dr. Werner Leupin, co-examiner

ABSTRACT

The 1:1 complexes formed in solution between Hoechst 33258 and the following two deoxyribonucleotide duplexes were studied by proton nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy :



A first complex between Hoechst 33258 and d(GTGGAATTCCAC)₂ was prepared and studied by NMR in order to determine the binding mode in solution and to compare its results with those from single crystal X-ray studies of complexes between Hoechst 33258 and dodecanucleotide duplexes containing the same binding site for the ligand. In addition, the complex formed between Hoechst 33258 and d(CGCAAATTTGCG)₂ was studied in order to assess the influence of the size and the base pair sequence of the possible DNA binding site on complex stability and to determine if Hoechst 33258 is specifically binding to the d(AAAT)•d(ATTT), d(AATT)₂ or to the d(TAAA)•d(TTTA) segment. Furthermore, an X-ray study of the same complex is underway simultaneously providing the opportunity to compare the results of both studies in solution and in the crystal, respectively. One-dimensional and two-dimensional proton NMR experiments were used to study the static and dynamic properties of both Hoechst 33258: DNA complexes in solution.

The results of these studies can be summarised as follows : (i) Sequence-specific assignments for all protons of the ligand and most protons of the DNA fragments were obtained, thus providing a base for the detailed study. (ii) Drug induced chemical shifts changes are largest for protons of the central d(AATT)₂ segment in both dodecanucleotide duplexes, providing a first

Abstract

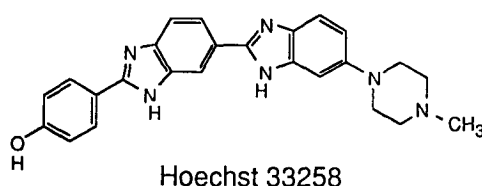
indication that the drug binds at the center of both DNA duplexes. (iii) Several intermolecular nuclear Overhauser enhancement (NOE) cross peaks between certain drug protons and deoxyribose H1' and adenine H2 protons in the d(AATT)₂ segments of both DNA dodecamers were identified. The intensities of these intermolecular NOE cross peak were converted into upper limits for proton-proton distances and used to generate models of the complexes. The models for both complexes show that Hoechst 33258 is binding into the minor groove at the central d(AATT)₂ segment of both dodecanucleotide duplexes. From the results of the study with d(CGCAAATTTGCG)₂ follows that Hoechst 33258 is binding preferentially to d(AATT)₂ compared to d(AAAT)•d(ATTT) or d(TAAA)•d(TTTA). (iv) The residence time of Hoechst 33258 on the two DNA duplexes is about 0.5 and 1.6 seconds, respectively, indicating that both complexes are long lived relative to the NMR chemical shift time scale. The observed loss of the inherent two-fold symmetry of the free DNA duplexes upon addition of the asymmetric drug as seen in the NMR spectra of the complexes further supports such long residence times.

In addition, the solution structure of the 1:1 complex between Hoechst 33258 and d(GTGGAATTCCAC)₂ was determined by a novel combination of docking (using an ellipsoid algorithm) and simulated annealing / restrained molecular dynamics (employing the program X-PLOR). The docking was driven by the 23 intermolecular distance constraints derived from two-dimensional NOE experiments. Starting from 50 different positions of the ligand relative to the fixed DNA duplex, 26 docked conformers were generated which displayed small residual violations of the intermolecular distance constraints. The 26 docked conformers were distributed in two well defined classes and used for subsequent refinement with the program X-PLOR. For the restrained molecular dynamics calculations, 148 upper bounds on proton-proton distances in the DNA duplex were added to the 23 intermolecular constraints between Hoechst 33258 and d(GTGGAATTCCAC)₂. Fourteen refined X-PLOR conformers were generated with small distance constraint violations and low total X-PLOR energies. In all conformers, the DNA binding site is identical, with the ligand covering the four central AT base pairs only. The oligonucleotide duplexes exhibit minor structural changes among the solution conformers and compared to the starting structure which was built up from co-ordinates proposed by Arnott for average B-type DNA. The fourteen refined conformers represent the solution structure of the 1:1 Hoechst 33258 : d(GTGGAATTCCAC)₂ complex.

Differences in intermolecular hydrogen bonding patterns and van der Waals interactions were observed in the solution structure. Based on these differences in intermolecular contacts among the conformers, two families were defined and separately analyzed. The solution structure is similar to the published X-ray crystal structures of Hoechst 33258 complexed to d(CGCGAATTCGCG)₂. In the crystal structures, the drug exhibits the same intermolecular hydrogen bonding patterns (to the 5'-AT-3' dinucleotide in the middle of the binding site) as in one family of solution conformers.

ZUSAMMENFASSUNG

Die 1:1 Komplexe in wässriger Lösung zwischen Hoechst 33258 und zwei Dodecadeoxyribonukleotid-Duplexen wurden mittels Proton Kernmagnetischer Resonanz Methoden (engl. nuclear magnetic resonance, NMR) untersucht :



d-(GTGGAATTCCAC)

(CACCTTAAGGTG)-d

d-(CGCAAATTTGCG)

(GCGTTTAAACGC)-d

Ein erster Komplex zwischen Hoechst 33258 und d(GTGGAATTCCAC)₂ wurde studiert, um den Bindungsmodus in Lösung zu bestimmen. Die Ergebnisse wurden dann mit Resultate verglichen aus Einkristall-Röntgenstrukturanalysen von Komplexen zwischen Hoechst 33258 und DNS-Fragmenten, die die gleiche potentielle Ligand-Bindungsstelle enthalten. Der Komplex zwischen Hoechst 33258 und d(CGCAAATTTGCG)₂ wurde zusätzlich untersucht, um die Einflüsse von Grösse und Basenpaar-Sequenz der möglichen Bindungsstelle auf die Komplexstabilität festzulegen, sowie die relative Bindungsspezifität des Liganden für die DNS-Segmente d(AAAT)•d(ATTT), d(AATT)₂ oder d(TAAA)•d(TTTA) zu bestimmen. Gleichzeitig läuft eine röntgenkristallographische Untersuchung des gleichen Komplexes, was erlauben wird, die Ergebnisse der beiden Studien in Lösung und im Kristall zu vergleichen. Ein- und zweidimensionale Proton NMR Experimente wurden benützt, um statische und dynamische Eigenschaften der beiden Hoechst 33258 :DNS Komplexe zu bestimmen.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen können folgendermassen zusammengefasst werden : (i) es wurden sequenz-spezifische Zuordnungen für alle Ligandprotonen und für die meisten DNS-Protonen erhalten, was die

Zusammenfassung

Grundlage für detaillierte Studien darstellt. (ii) Die durch die Ligand-Bindung induzierten Änderungen der chemischen Verschiebungen von DNS-Protonen sind maximal für Protonen des zentralen d(AATT)₂ Segmentes in beiden Dodecanukleotid-Duplexen, und geben damit einen ersten Hinweis zur Bindung des Liganden im Zentrum beider DNS-Duplexe. (iii) Mehrere intermolekulare Nuklear-Overhauser-Effekt (NOE) Kreuzsignale zwischen Ligandprotonen und Deoxyribose H1' und Adenin H2 Protonen im d(AATT)₂ Segment beider DNS-Dodecamere wurden identifiziert. Die Intensitäten dieser intermolekularen NOE-Kreuzsignale wurden in obere Grenzwerte für Proton-Proton Abstände übersetzt, die zur Bestimmung von Molekülmodellen beider Komplexe benützt wurden. Diese Modelle zeigen, dass Hoechst 33258 am zentralen d(AATT)₂ Segment in der kleinen Furche beider Dodecanukleotid-Duplexe bindet. Aus den Studien des Komplexes von Hoechst 33258 mit d(CGCAAATTTGCG)₂ folgt, dass der Ligand vorzugsweise an das Segment d(AATT)₂ bindet und nicht an die weiteren möglichen Segmente d(AAAT)•d(ATTT), respektive d(TAAA)•d(TTTA). (iv) Die Aufenthaltsdauer von Hoechst 33258 auf den zwei DNS-Duplexen wurde zu etwa 0.5 respektive 1.6 Sekunden bestimmt. Dies bedeutet, dass der Komplex langlebig ist verglichen mit der Zeitskala der NMR chemischen Verschiebung. Der in den NMR Spektren beobachtete Verlust der inherenten zweifachen Symmetrie der freien Duplexe durch Ligandzugabe weist auch auf solche langen Aufenthaltszeiten hin.

Zusätzlich wurde die Struktur des 1:1 Hoechst 33258 : d(GTGGAATTCCAC)₂ Komplexes in Lösung mittels einer neuartigen Kombination von Docking (mit einem Ellipsoid-Algorithmus) und simuliertem "annealing" / eingeschränkter Moleküldynamik berechnet. Für das Docking wurden alle 23 in den Spektren beobachteten intermolekularen NOEs berücksichtigt. Ausgehend von 50 verschiedenen Positionen des Liganden relativ zum starr gehaltenen DNS-Duplex wurden 26 angedockten Konformere mit geringen Verletzungen der intermolekularen Distanz-Einschränkungen generiert. Die 26 angedockten Konformere lassen sich in zwei wohl definierte Klassen aufteilen. Vertreter beider Klassen wurden anschliessend einer weiteren Strukturverfeinerung unterworfen. Für die eingeschränkten Moleküldynamik-Rechnungen wurden 148 obere Grenzen für Proton-Proton Abstände im DNS-Duplex verwendet, zusätzlich zu den 23 intermolekularen Distanz-Einschränkungen zwischen Hoechst 33258 und d(GTGGAATTCCAC)₂. Vierzehn verfeinerte X-PLOR Konformere mit kleinen Verletzungen der Distanz-Einschränkungen und

niedrigen X-PLOR Gesamt-Energien wurden generiert. Die Bindungsstelle auf dem DNS-Duplex ist in allen Konformeren gleich, wobei der Ligand jeweils nur die vier zentralen Basenpaare überdeckt. Die Oligonukleotid-Duplexe weisen geringe strukturelle Abweichungen auf, sowohl in Bezug auf die Lösungskonformationen wie auch gegenüber der Anfangsstruktur, die mit den von Arnott vorgeschlagenen Koordinaten für Standard B-Typ DNS aufgebaut worden war. Die vierzehn verfeinerten Konformeren repräsentieren die Lösungsstruktur des 1:1 Komplexes zwischen Hoechst 33258 und $d(\text{GTGGAATTCCAC})_2$. In der Lösungsstruktur wurden Unterschiede in intermolekularen Wasserstoffbrücken und van der Waals Wechselwirkungen beobachtet. Basierend auf diesen Unterschieden in intermolekularen Wechselwirkungen konnten die vierzehn Konformeren in zwei Familien aufgeteilt werden, die dann auch getrennt analysiert worden sind. Die gefundene Struktur in Lösung ist ähnlich zu publizierten Kristall-Strukturen von 1:1 Komplexen zwischen Hoechst 33258 und $d(\text{CGCGAATTCGCG})_2$. In den Kristall-Strukturen weist der Ligand ähnliche intermolekulare Wasserstoffbrücken auf (zum 5'-AT-3' Dinukleotid in der Mitte der Bindungsstelle) wie in einer der beiden Familien von Lösungskonformeren.