

Diss. ETH No. 18278

EPR studies of copper coordination to DNA and of supercooled water dynamics

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY
ZURICH

for the degree of
Doctor of Sciences

presented by
MARIA GRAZIA SANTANGELO
Laurea in Fisica, University of Palermo (Italy)
born July 5, 1976
citizen of Italy

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. G. Jeschke, examiner
Prof. Dr. R. Riek, co-examiner
Dr. B. Spingler, co-examiner

2009

Abstract

In the first part of this thesis pulse EPR spectroscopy has been used to determine electronic and geometric structure of a mononucleotide model system Cu(II)-guanosine 5'-monophosphate, and to develop an approach for more detailed structural characterization of specifically bound metal ions in a variety of nucleic acids of biological interest. In the second part this approach is extended to a study of the copper-polynucleotide interaction. Results of a pulse EPR study on Cu(II)-poly(dG-dC)·poly(dG-dC) complex are presented. In the last part, continuous wave EPR spectroscopy together with the spin probe technique has been used to characterize the dynamics of supercooled water encapsulated in silica hydrogel. Such an aqueous matrix in a supercooled or glassy state allows for low-temperature studies without the use of cryoprotectants.

Simple copper salts are known to denature poly(dG-dC), whereas copper in the form of an azamacrocyclic complex is able to convert the right-handed B form of the same DNA sequence to the corresponding left-handed Z form. Pulse EPR methods provide unique information about the electronic and geometric structure of the Cu(II)-5'-GMP model system through a detailed mapping of the hyperfine interactions between the unpaired electron of the Cu(II) ion and the magnetic nuclei of the nucleotide ligand, and nuclear quadrupole interactions. It was found that the Cu(II) ion is directly bound to N7 of 5'-guanosine monophosphate and indirectly bound via a water of hydration to a phosphate group.

Pulse EPR spectroscopy has been used to investigate the structural features of a copper ion coordinated to poly(dG-dC)·poly(dG-dC) and to predict the structural changes of the polynucleotide induced by the presence of the copper ion. It was found that the Cu(II)-poly(dG-dC)·poly(dG-dC) complex presents a Z-form and is characterized by two different copper species. A molecular model has been proposed to assign them. In this model one copper species is exclusively coordinated to the N7 of the guanine. In the other species, both guanine and cytosine are involved in the formation of the complex Cu(II)-poly(dG-dC)·poly(dG-dC). A copper crosslink between the N7 of guanine and the N3 of cytosine as the most probable coordination site is proposed. Moreover, no evidence was found for interaction of the copper species with the phosphate group and with equatorial water.

EPR spectroscopy on a nitroxide probe, in combination with differential scanning calorimetry (DSC), was used to characterize the structural and dynamic properties of water confined in silica hydrogels. In these silica hydrogels the major fraction of water remains in a supercooled state down to temperatures of at least 198 K, whereas the minor fraction crystallizes at about 236 K during the cooling and melts at 246 K during heating. The liquid domains are of sufficient size to solvate the nearly spherical paramagnetic probe molecule TEMPO with a diameter of about 6 Å. Analysis of EPR spectra provides the rotational correlation time of the probe that is further used to compare the viscosity of the supercooled water with the one of bulk water. In the temperature interval investigated the supercooled water behaves as a fragile liquid and eventually solidifies at 120 K to a glass that incorporates the probe molecules.

Sommario

Nella prima parte di questa tesi la spettroscopia di EPR pulsato è stata usata per determinare la struttura elettronica e geometrica di un sistema modello mononucleotide Cu(II)-guanosina 5'-monofosfato e per sviluppare un approccio per una più dettagliata caratterizzazione strutturale di ioni metallici in una varietà di acidi nucleici di interesse biologico. Nella seconda parte questo approccio è esteso allo studio dell'interazione rame-polinucleotide. I risultati dello studio tramite EPR pulsato del sistema Cu(II)-poly(dG-dC)·poly(dG-dC) sono presentati. Nell'ultima parte, la spettroscopia EPR in onda continua insieme con la tecnica della sonda di spin è stata usata per caratterizzare la dinamica dell'acqua sottoraffreddata incapsulata in gel di silice. Questa matrice acquosa, che si trova in uno stato di sottoraffreddamento o in uno stato vetroso, permette studi a basse temperature senza l'uso di crioprotettori.

E' noto che semplici sali di rame sono capaci di denaturare polimeri di deossiguanosina e deossicitidina, mentre complessi di rame sono in grado di convertire questi stessi polimeri dalla forma destrorsa del B-DNA alla corrispondente forma sinistrorsa del Z-DNA. Metodi di EPR pulsato forniscono informazioni sulla struttura elettronica e geometrica del sistema modello Cu(II)-5'-GMP attraverso una indagine dettagliata delle interazioni iperfine tra l'elettrone spaiato del Cu(II) e i nuclei magnetici del nucleotide, e dell'interazione quadrupolare nucleare. E' stato scoperto che lo ione Cu(II) è direttamente legato all'azoto N7 della guanosina 5'-monofosfato e indirettamente legato, attraverso una molecola d'acqua, al gruppo fosfatico.

La spettroscopia di EPR pulsato è stata usata per studiare le caratteristiche strutturali di un ione di rame legato al polinucleotide poly(dG-dC)·poly(dG-dC) e determinare i cambiamenti strutturali del polinucleotide indotti dalla presenza dello ione di rame. E' stato scoperto che il sistema Cu(II)-poly(dG-dC)·poly(dG-dC) ha una forma sinistrorsa come lo Z-DNA ed è caratterizzato a due differenti specie di rame. Noi abbiamo proposto un modello molecolare per distinguere queste due specie. In questo modello, una delle due specie è legata esclusivamente all'azoto N7 della guanina. Nell'altra specie, entrambe la guanina e la citosina sono coinvolte nella formazione del sistema Cu(II)-poly(dG-dC)·poly(dG-dC). Noi proponiamo un collegamento tra l'azoto N7 della guanina e l'azoto N3 della citosina tramite lo ione di rame. Inoltre non è stata ottenuta nessuna evi-

denza di coordinazione tra il rame e il gruppo fosfatico e tra il rame e l'acqua in posizione equatoriale.

La spettroscopia EPR applicata ad una sonda nitrossile, insieme con la calorimetria a scansione differenziale, è stata usata per caratterizzare le proprietà strutturali e dinamiche dell'acqua confinata in un gel di silice. In questi gel di silice la maggior parte dell'acqua viene sottoraffreddata fino ad una temperatura di 198 K, mentre la minor parte cristallizza a 236 K durante il raffreddamento e invece fonde a 246 K durante il riscaldamento. La larghezza dei pori è sufficiente da permettere lo scioglimento in acqua della TEMPO, una sonda paramagnetica quasi sferica, che presenta un diametro di circa 6 Å. L'analisi degli spettri EPR ci forniscono il tempo di rotazione della sonda, il quale è a sua volta usato per confrontare la viscosità dell'acqua sottoraffreddata con quella dell'acqua pura. Nell'intervallo di temperature analizzato, l'acqua sottoraffreddata si comporta come un liquido fragile e infine a 120 K diventa un vetro con incorporate le molecole della sonda.