

PROGRAMMA DI RICERCA STM RELAZIONE SCIENTIFICA FINALE

Fruitore: Roberto Improta

Istituto di afferenza : Istituto Biostrutture e Bioimmagini

con qualifica...I Ricercatore.....livello.....II.....

Istituzione ospitante: Laboratoire Francis Perrin, - CNRS/CEA CEA Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette, France

Titolo del programma: Effect of cytosine methylation on the photoexcited behavior of oligonucleotides

Relazione Scientifica

L'attività di ricerca svolta durante il periodo di permanenza al CNRS finanziato con la STM è stata rivolta allo studio di oligonucleotidi contenenti Citosina, al fine di verificare e comprendere l'effetto che la metilazione della citosina in posizione 5 ha sulle proprietà fotofisiche e fotochimiche del DNA. La metilazione della citosina (5metil-citosina) è infatti spesso associata a hot-spot mutagenici, ma le cause di questo fenomeno non sono ancora chiare.

Una parte dell'attività di ricerca è consistita nella definizione dei modelli oligonucleotidici da studiare, sperimentalmente e con metodi di calcolo. In collaborazione con i ricercatori dell'istituzione ospitante ci siamo concentrati su sequenze del tipo T-C-G (timina-citosina-guanina), da confrontare con le corrispondenti contenenti 5-metil-citosina (5MC), cioè (T-5MC-G). Infatti, il dinucleotide TC (e T5MC) è critico per la giudicare la fotoreattività di una sequenza, poiché il foto-prodotto principale dell'interazione tra raggi UV a DNA è il dimero ciclico coinvolgenti due pirimidine (CPD). Il dimero CG è invece frequentemente metilato, molto diffuso in particolari regioni di controllo del DNA, e frequentemente associato a mutazioni cancerogene. Si è poi partiti in parallelo con la caratterizzazione sperimentale e teorica di queste sequenze. Gli esperimenti su trimeri T-C-G e T-5MC-G hanno mostrato che la metilazione induce ad un aumento della popolazione di CPD e a una diminuzione di quella dei dimeri 6-4, il secondo fotoprodotto più diffuso nel DNA. Abbiamo quindi svolto calcoli quantomeccanici (utilizzando soprattutto calcoli PCM/TD-DFT e funzionali 'long range corrected') su tali trimeri ed i più semplici dinucleotidi TC e T5MC. La nostra analisi è basata principalmente sui risultati ottenuti con il funzionale M052X, che ha dimostrato di fornire una descrizione accurata di sistemi π stacked e stime affidabili dell'energia relative degli stati elettronici coinvolti, compresi quelli a Trasferimento di Carica (CT). I primi risultati sono riassunti in Tabella 1:



Tabella 1: Energia relativa (in eV) dei differenti conformeri, a seconda del puckering assunto dallo zucchero deossiribosio) del dinucleotide TC e T5MC. Risultati PCM/M052X/6-31G(d).

	C3C3	C2C2	C2C1	C2O4	C2C3
TC	0.0	-0.23	-0.05	-0.62	4.61
T5MC	0.0	0.99	0.73	0.60	5.40

L'esame dei dati in Tabella 1 evidenzia che la presenza del sostituito 5Metile stabilizza notevolmente il conformero C3C3 rispetto a quello C2C2. I nostri studi precedenti sul dimero TT [1] hanno mostrato che il conformero C3C3 è quello per cui, per struttura geometrica ed elettronica, la reazione che conduce CPD è favorita, mentre per la citosina il puckering C2, che favorisce la formazione di dimero 6-4, è relativamente più stabile. In questo modo i calcoli permettono di razionalizzare i risultati sperimentali, e forniscono nuove informazioni sul ruolo della metilazione. Un articolo che discute questi risultati è adesso in fase di redazione.

Lo studio dei trimeri TCG a T5MG (vedi Figura 1), iniziato durante il mio soggiorno e non ancora terminato, ha mostrato che per entrambi i sistemi, la formazione di stato eccitato a trasferimento di carica $G^+ \rightarrow C^-/5MC^-$ è quello più stabile, specialmente per C. La presenza del metile potrebbe quindi sfavorire, in relativo, la formazione dello stato CT coinvolgente la guanina e, in questo modo, indurre una maggiore reattività nei confronti della timina.

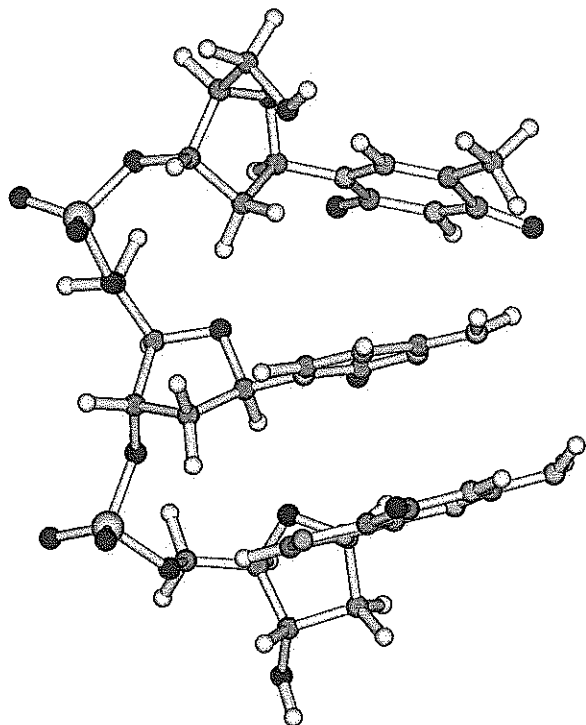


Figura 1: Modello di trimero TCG a singolo filamento studiato durante il soggiorno di ricerca.

A partire di questi risultati, durante il soggiorno di ricerca è stato concordato e iniziato anche lo studio delle sequenze $(CG)_n$, che, come già detto, rivestono particolare interesse. In questo caso, sono stati progettati degli esperimenti di spettroscopia risolta nel tempo su composti a



doppia elica contenenti un numero differente di passi (CG) (da 1 a 6) e, contemporaneamente, abbiamo iniziato lo studio teorico di tetrameri CG*GC. I risultati degli esperimenti mostrano una drastica riduzione dell'intensità di fluorescenza attesa, suggerendo un trasferimento veloce ed efficace a stati elettronici di tipo dark. I calcoli mostrano che, in presenza della doppia elica, gli stati a trasferimento di carica $G^+ \rightarrow C^-$ (sia intra-strand che inter-strand) risultano particolarmente stabili, suggerendo una possibile spiegazione dei risultati sperimentali.

Durante il soggiorno infine, sono stati pianificati tutti i futuri stadi della attività di ricerca. Tra gli altri passi, ricordiamo lo studio, già intrapreso, di sequenze di doppia elica contenenti 3 passi TCG e T5MCG, tramite simulazioni di dinamica molecolare, al fine di studiare l'effetto del metile sulle proprietà strutturali del DNA.

Bibliografia

[1] R. Improta J. Phys. Chem. B 2012, 116, 14261-14274

Firma del Fruitore