

Mgr Anna Goral  
Pracownia Krystalochemii  
Wydział Chemii, Uniwersytet Warszawski  
Międzywydziałowe Interdyscyplinarne Studia Doktoranckie  
w zakresie nauk Matematyczno- Przyrodniczych

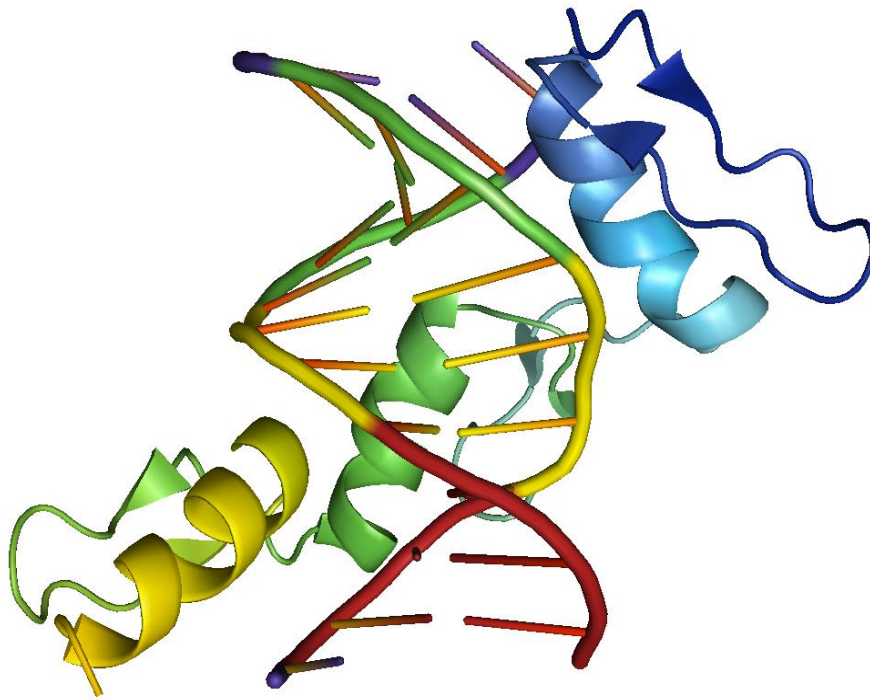
Autoreferat rozprawy doktorskiej pod tytułem:  
**Zastosowanie banku asferycznych pseudoatomów w badaniach oddziaływań elektrostatycznych  
palców cynkowych z DNA**

Promotorzy:  
prof. dr hab. Krzysztof Woźniak, Wydział Chemii, Uniwersytet Warszawski  
prof. dr hab. Janusz Bujnicki

Moja rozprawa doktorska dotyczy elektrostatycznego aspektu oddziaływań pomiędzy domenami palców cynkowych a rozpoznawanymi przez nie sekwencjami DNA. Wybór modelu biologicznego podyktowany był znaczeniem poprawnego rozpoznawania konkretnych sekwencji DNA, dzięki czemu możliwa jest precyzyjna edycja genomów. Jedną z metod stosowanych do przecinania nici DNA w zdefiniowanym miejscu (tak zwanych „molekularnych nożyczek”) są białka fuzyjne, w skład których wchodzi kilka domen palców cynkowych połączonych z domeną nukleazową Fok1. Wybór narzędzia do przeprowadzenia badań podyktowany był faktem, że właśnie elektrostatyka ma decydujący wpływ na oddziaływania pomiędzy makrocząsteczkami. W związku z tym zdecydowałam się na wykonanie obliczeń energii oddziaływań elektrostatycznych przy użyciu banku asferycznych pseudoatomów UBDB (*ang.* University of Buffalo Databank). Jest to metoda hybrydowa, która z jednej strony łączy szybkość potrzebną do przeprowadzania obliczeń dla makrocząsteczek, a z drugiej strony dostarcza wyników o dużej dokładności. Związane jest to z wysoką jakością danych wejściowych, które pochodzą z bazy UBDB. Dzięki temu możliwe jest odtworzenie rozkładu gęstości elektronowej dla badanych układów. Prezentowane obliczenia wykonane zostały na podstawie trójwymiarowych struktur zdeponowanych w bazie struktur białkowych PDB.

W trakcie przeprowadzonych badań uzyskałam następujące wyniki:

- (a) Poszerzyłam bank UBDB o nowe typy atomowe. Po przeprowadzeniu testów wybrałam poziom teorii, przy użyciu którego uzyskałam geometrię czteroosobniczą kompleksów cynku najbardziej podobną do tej spotykanej w strukturach zdeponowanych w PDB. W ramach kolejnych czynności prowadzących do przygotowania danych wejściowych do banku UBDB przeprowadziłam testy pozwalające na dokonanie wyboru właściwego czynnika rozpraszania dla atomów cynku w badanych kompleksach oraz poprawnego rozkładu elektronów na powłokach walencyjnych. W wyniku całej procedury dodałam do banku UBDB sześć nowych typów atomowych: jeden dla atomu cynku, jeden dla atomu azotu, jeden dla atomu siarki oraz trzy dla atomów węgla, które połączone są ze wspomnianymi atomami azotu i siarki.



**Rysunek 1.** Trzy motywy strukturalne palców cynkowych związane z dodekamerem DNA (kod PDB: 1AAY).

- (b) Zoptymalizowałam metodę uzyskiwania i interpretacji wyników energii oddziaływania elektrostatycznego między innymi poprzez zdefiniowanie fragmentów molekularnych najbardziej istotnych z punktu widzenia specyficzności oddziaływań. Okazało się, że uzyskane wartości energii oddziaływań elektrostatycznych zdominowane zostały przez ujemnie naładowane reszty fosforanowe. Utrudniało to wgląd w subtelne detale oddziaływań. Zatem za najlepiej odzwierciedlające specyfikę badanych oddziaływań uznałam wartości energii obliczone dla oddziaływań reszt aminokwasowych tylko z zasadami nukleotydowymi, z pominięciem wkładu od pozostałych części reszt nukleotydowych, czyli grupy fosforanowej połączonej z deoksyrybozą.
- (c) Potwierdziłam występowanie modelu kanonicznego i wykonałam ilościowy opis oddziaływań dla pierwszej serii struktur, a następnie wysunęłam hipotezę, że nawet na podstawie ograniczonych danych można zaproponować kombinacje kluczowych reszt aminokwasowych i rozpoznawanych przez nie zasad nukleotydowych, które silnie ze sobą oddziałują. Punktem wyjściowym była analiza wykonana dla dziewięciu różnych kombinacji kluczowych reszt aminokwasowych i rozpoznawanych przez nie sekwencji czterech zasad nukleotydowych. Zauważyłam wtedy, że wartość energii oddziaływania elektrostatycznego w większości przypadków powtarza się dla konkretnej pary reszta aminokwasowa – zasada nukleotydowa, czyli jest przenoszalna niezależnie od sąsiedztwa innych reszt aminokwasowych i innych zasad azotowych. W celu weryfikacji opisanej wyżej hipotezy porównałam energię oddziaływania elektrostatycznego przewidzianą dla jednej z zaproponowanych kombinacji reszt aminokwasowych i rozpoznawanych zasad nukleotydowych z wynikiem obliczeń otrzymanym dla kompleksu, którego współrzędne przestrzenne zdeponowane zostały w bazie PDB (identyfikator 1MEY). Przewidziana energia oddziaływania elektrostatycznego wynosiła -134 kcal/mol, a otrzymana w wyniku obliczeń -148 kcal/mol. Zachęcona otrzymanymi wynikami postanowiłam przeprowadzić dalsze obliczenia.

(d) Obliczyłam energię oddziaływania elektrostatycznego dla poszerzonego zbioru struktur oraz przedstawiłam dokładną charakterystykę analizowanych oddziaływań elektrostatycznych. Spośród struktur, dla których wykonane zostały obliczenia, wyłoniłam 33 unikalne kombinacje kluczowych reszt aminokwasowych i rozpoznawanej przez nie sekwencji DNA. Opisałam każde z oddziaływań kanonicznych między innymi poprzez podanie średniej energii oddziaływania elektrostatycznego, odchylenia standardowego, licznosci oraz graficznej ilustracji konkretnych oddziaływań.

Następnie policzyłam sumę energii oddziaływań elektrostatycznych dla każdej z przeanalizowanych kombinacji kluczowych reszt aminokwasowych i zasad nukleotydowych z nici głównej i komplementarnej. Pomimo różnorodności analizowanych struktur połowa (między pierwszym a trzecim kwartylem) otrzymanych wartości mieści się w przedziale -97 kcal/mol a -72 kcal/mol. Świadczy to o porównywalnej energii oddziaływań w większości przypadków.

Wśród przeanalizowanych oddziaływań najbardziej powszechne są oddziaływania dodatnio naładowanych reszt aminokwasowych z guaniną, dla których średnia wartość energii oddziaływań elektrostatycznych wynosi około -45 kcal/mol. Warto też wspomnieć o zawierających grupę amidową resztach glutaminowych i asparaginowych, które mogą być połączone z adeniną dwoma różnymi wiązaniami wodorowymi (N-H...N i O-H...N). Porównywalna średnia energia oddziaływania elektrostatycznego (około -17 kcal/mol) obserwowana jest również dla pary His:G. W tym przypadku oprócz jednego wiązania wodorowego N-H...N występuje też słabe oddziaływanie C-H...O. W ramach oddziaływań obojętnych reszt aminokwasowych, w przypadku reszt serynowych i treoninowych występują również pojedyncze oddziaływania grupy OH (wiązanie O-H...O). Wśród oddziaływań z resztami aminokwasowymi obdarzonymi ujemnym ładunkiem najczęściej występowały oddziaływania z cytozyną, a potem z adeniną. Obie zasady azotowe od strony dużej bruzdy posiadają grupę NH<sub>2</sub>. Te oddziaływania są szczególnie ciekawe, gdyż ścierają się tutaj dwa przeciwstawne efekty. Z jednej strony lokalnie mogą występować wiązania wodorowe, z drugiej zachodzi kulombowskie odpychanie ładunków ujemnych. Od tego który z efektów dominuje zależy czy energia oddziaływania elektrostatycznego będzie przyciągająca czy odpychająca. Dlatego też opisane oddziaływania są wyjątkowo wrażliwe na wzajemną przestrzenną lokalizację donorów i akceptorów wiązań wodorowych. Ponadto zwróciłam uwagę na podobieństwo niekanonicznego oddziaływania 6:Ilc do uznanego za kanoniczne oddziaływania 2:IVc. Oba oddziaływania są podobne pod względem liczby występowania oddziaływań przyciągających, dla których wartości energii oddziaływania elektrostatycznego wynoszą kilkanaście kcal/mol. W grupie 6:Ilc charakterystyczne są oddziaływania reszt argininowych i lizynowych z tlenem ketonowym wchodzącym w skład zarówno guaniny, jak i tyminy.

Przeprowadzone do tej pory badania pozwalają wysnuć kolejną hipotezę dotyczącą pożądanej średniej energii oddziaływania elektrostatycznego dla projektowanych palców cynkowych, która powinna wynosić około -80 kcal/mol. Uzyskane wyniki mają duży potencjał do wykorzystania w praktyce, który należałoby zweryfikować eksperymentalnie. W przypadku potwierdzenia wartości predykcyjnej prezentowanej metodologii, spodziewane jest znaczące usprawnienie procesu projektowania nukleaz palców cynkowych precyzyjnie rozpoznających zadaną sekwencję DNA.