

Autoreferat rozprawy doktorskiej pt.

## **Międzycząsteczkowe oddziaływania sprotonowanych zasad azotowych nukleotydów w fazie krystalicznej**

Promotorka: prof. Paulina M. Dominiak

Zasady azotowe nukleotydów to jedno- i dwupierścieniowe związki organiczne o różnorodnych funkcjach biologicznych. Najlepiej znane są jako element makromolekuł kwasów nukleinowych, DNA i RNA, gdzie stanowią element różnicujący od siebie poszczególne nukleotydy i jednocześnie podstawę mechanizmu kodowania informacji genetycznej wśród wszystkich żywych organizmów. To jednak nie koniec funkcji zasad azotowych nukleotydów. Wchodzą one również w skład białek, a konkretnie – centrów aktywnych enzymów, gdzie decydują o ich funkcji i reaktywności. Ta ich rola jest jednym z powodów, dla których zasady azotowe nukleotydów są szeroko badane pod kątem bycia potencjalnymi składnikami aktywnymi leków.

U podstawy wszystkich tych badań leży dokładne zrozumienie oddziaływań tworzonych przez zasady azotowe nukleotydów w różnych warunkach. Ze względu na swoją budowę, związki te chętnie tworzą pary, w których dwie molekuly łączą się ze sobą za pomocą dwóch (lub więcej) wiązań wodorowych równoległych do ich płaszczyzny. Specyficzność tworzenia się owych par leży u podstaw komplementarności nici DNA i zapewnia poprawność procesu jego replikacji. Jednak oprócz kanonicznych par zasad zaproponowanych przez Watsona, Cricka i Wilkinsa, i nauczanych już w szkole średniej, istnieją również tak zwane niekanoniczne pary zasad, których szeroki wybór można spotkać w RNA. Zwiększenie liczby możliwych do stworzenia par jest jednym z czynników, dzięki którym RNA pełni tak różnorodne funkcje.

W mojej pracy doktorskiej skupiam się na oddziaływaniach sprotonowanych zasad azotowych nukleotydów w fazie krystalicznej. Wydaje się, że jest to wąskie zagadnienie, jednak dokładna analiza owych oddziaływań ujawnia coś zgoła odmiennego. Wiadomo, że obecność dodatkowego protonu to nie tylko zmiana akceptora wiązania wodorowego w jego donor, ale też zmiana ładunku, a w konsekwencji – rozkładu gęstości elektronowej, która odpowiada za to, jak chętnie dana molekula będzie wchodzić w przeróżne interakcje. W układach o znaczeniu biologicznym, gdzie już niewielka

zmiana właściwości danej molekuly może prowadzić do destabilizacji całego łańcucha kluczowych dla życia organizmu reakcji, zagadnienia protonacji nie da się przecenić.

Jedną z metod badania zagadnienia parowania się zasad azotowych nukleotydów może być analiza częstości formowania się takich par w różnych środowiskach. Do tej pory różne grupy badawcze wykonały liczne tego typu analizy, podzielić je jednak można było na dwie grupy – analizę par zasad formowanych przez skryształizowane molekuly RNA, oraz formowanych w wyniku symulacji kwantowomechanicznych.

W tym pierwszym przypadku trudno jest o uwzględnienie w analizie lokalizacji protonów. Ze względu na swoje rozmiary i niezbyt sztywną budowę, makromolekuly stanowią wyzwanie dla metod analizy strukturalnej, w tym i krystalografii. Jeżeli już struktura krystalicznego RNA zostanie wyznaczona, lokalizację protonów można próbować się domyślić. Wystarczy porównać, gdzie znajdują się wodory w neutralnej zasadzie azotowej, a gdzie powinny być jeśli dana para ma tworzyć wiązania wodorowe narzucone przez geometrię. Takie podejście jest jednak niesatysfakcjonujące – raz że w ten sposób da się określić wyłącznie lokalizację protonów biorących udział w wiązaniach wodorowych, a dwa że o wiele większą wartość mają dane wynikające bezpośrednio z pomiaru, niż intuicja chemiczna.

Kolejnym elementem wpływającym na częstość formowania się danych par zasad azotowych nukleotydów w RNA jest połączenie owych zasad za pomocą łańcucha zbudowanego z cząsteczek rybozy połączonych wiązaniami fosfodiesterowymi. To ogranicza ruch zasad oraz możliwość tworzenia przez nich niektórych typów par. Szczególnie „poszkodowana” jest w tym układzie tzw. krawędź cukrowa (ang. Sugar edge), którą to zasady przytwierdzone są do rybozy.

Jeśli chodzi o obliczenia kwantowomechaniczne, siłą rzeczy muszą one przyjmować pewne założenia i uproszczenia, często też nie są w stanie w pełni adekwatnie modelować wpływu wszystkich czynników zewnętrznych na formowanie się pary.

W mojej pracy postanowiłam wybrać trzecią drogę, po części wolną od ograniczeń poprzednich dwóch, jednak wprowadzając inne elementy, na które trzeba było zwrócić uwagę. Oparłam swoją analizę częstości formowania się par zasad azotowych na ich występowaniu w kryształach małych molekuł organicznych. Wiele tego typu struktur zostało zdeponowanych w Cambridge Structural Database (CSD), czyli globalnym repozytorium danych krystalograficznych, zarówno pochodzących z pomiarów rentgenowskich, jak i neutronowych. Na tyle dużo, że możliwym było stworzenie wiarygodnej statystyki par zasad z uwzględnieniem ich protonacji.

Na podstawie otrzymanych częstości występowania par zasad widać, że pary występujące często w kryształach małych molekuł, często występują także w kryształach RNA – jest to najczęściej występujący trend, obecny w każdej z analizowanych przeze mnie zasad azotowych, które występują również w RNA. Na formowanie się pary w dużej mierze wpływa rzecz jasna obecność podstawnika blokującego krawędź cukrową zasady azotowej – w większości przypadków wyłącza ona tę krawędź z tworzenia wiązań wodorowych, a jeśli krawędź wciąż ma możliwość tworzenia takich wiązań, to

powstała zawada steryczna skutecznie to utrudnia. Efekt ten szczególnie dobrze widać w przypadku guaniny, której podstawione pochodne wciąż formują pary za pomocą dwóch wolnych azotów zdolnych do tworzenia wiązania wodorowego, jednak o wiele mniej chętnie.

Protonacja okazała się miejscami trudnym do jednoznacznej interpretacji czynnikiem. Jeżeli zmiana protonacji uniemożliwiała tworzenie pary, to taka para się nie pojawiała – wpływ ten doskonale był widoczny na przykładzie adeniny, której protonacja najłatwiej występowała na krawędzi Watsona-Cricka. Ze względu na to, że każda krawędź adeniny zawiera jeden akceptor i jeden donor protonu, łatwo było jej tworzyć pary, toteż gdy krawędź Watsona-Cricka zaczęła składać się wyłącznie z dwóch donorów protonu, jej częstość formowania par znacznie spadała.

Gdy zmiana protonacji umożliwiała tworzenie się nowej pary, wcale nie było oczywistym, że taka para na pewno się pojawi. Przykładem takiego zachowania może być guanina i cytozyna – obie te zasady, jeśli w skład pary wchodziłaby jedna cząsteczka neutralna i jedna sprotonowana (w najłatwiejszym do protonacji miejscu), byłyby w stanie stworzyć symetryczną parę połączoną trzema wiązaniami wodorowymi. Wśród par tworzonych przez guaninę nie ma ani jednego przykładu takiej pary, zaś wśród par tworzonych przez cytozynę, taki układ jest najczęstszy.

Kolejnym zagadnieniem jest wpływ dodatkowego protonu, który nie bierze udziału w formacji wiązań wodorowych. W mojej analizie udało mi się znaleźć przypadki, w których dodatkowe protony (a w konsekwencji – jednoimienny ładunek oddziałujących cząsteczek) nie miały żadnego wpływu na formowanie się par, ani nawet na długość wiązań wodorowych. Były jednak również przypadki, kiedy specyficzna kombinacja obecności lub braku podstawnika, wraz z niebiorącymi udziału w formowaniu wiązań wodorowych protonami, niemal całkowicie determinowała, jakie pary zostaną utworzone. Mimo, że żaden z tych elementów nie brał bezpośredniego udziału w formowaniu się pary, spowodowana przez nie zmiana gęstości elektronowej molekuly była na tyle duża, by istotnie wpłynąć na jej oddziaływanie.

Analiza częstości występowania par pozwoliła wyznaczyć ogólne trendy wspólne dla wszystkich zasad azotowych, jednak choć mają one podobny schemat budowy, szczegóły którymi się różnią są wystarczające, by każda z nich miała zestaw unikalnych przypadków wymagających osobnego komentarza.

W dalszej części pracy skupiłam się na omówieniu serii pomiarów rentgenograficznych w różnych temperaturach struktur zawierających sprotonowaną hipoksantynę – jedną z rzadziej spotykanych zasad azotowych nukleotydów. Rozwiązałam i przeanalizowałam trzy struktury, którym nadałam następujące skróty: Hx1 LT - niskotemperaturowa, zbliźniona struktura jednowodnego azotanu hipoksantyny ( $C_5H_5N_4O^+ NO_3^- H_2O$ , P2<sub>1/n</sub>), Hx1 HT - wysokotemperaturowa, struktura jednowodnego azotanu hipoksantyny ( $C_5H_5N_4O^+ NO_3^- H_2O$ , Pmnb), Hx2 – struktura trójwodnego azotanu hipoksantyny ( $C_5H_5N_4O^+ 2NO_3^- 2H_2O H_3O^+$ , P2<sub>1/n</sub>).

Hx1 ma wyraźną strukturę warstwową, w której jeden kation hipoksantyny otoczony jest przez trzy aniony azotanowe oraz trzy cząsteczki wody. Każdy z anionów jest zwrócony w kierunku

sprotonowanego azotu hipoksantyny w taki sposób, by stworzyć z nim dwa nieco niesymetryczne wiązania wodorowe. Gęsta sieć wiązań wodorowych oraz przyciąganie elektrostatyczne pomiędzy przeciwnie naładowanymi jonami mocno wiąże warstwę i sprawiają, że mimo zmiany temperatury wszelkie zmiany geometrii w obrębie warstwy są bardzo niewielkie.

Hx2 ma bardzo podobną strukturę – również zbudowana jest z warstw hipoksantyny, azotanu i wody o niemal identycznej geometrii, jak Hx1, ale na dwie takie warstwy przypada trzecia warstwa, której Hx1 nie posiada. Jest ona zbudowana z drugiego anionu azotanowego, cząsteczki wody oraz jonu oksoniowego – te dwie ostatnie molekuly tworzą tak zwany kation Zundela ( $H_5O_2^+$ ).

Struktura Hx1 wykazała przejście fazowe w niskiej temperaturze połączone z bliźniaczeniem się. Prócz tego, kryształy Hx1 LT charakteryzuje negatywny współczynnik rozszerzalności termicznej. Oba te zjawiska mają swe źródło w subtelnym zmianach geometrii struktury, które pojawiają się wraz z temperaturą. Jak to wcześniej było powiedziane, warstwy Hx1 są dość sztywne i nie wykazują zbyt dużych zmian z temperaturą. Jednak między sobą warstwy połączone są jedynie oddziaływaniami elektrostatycznymi. Na uwagę zasługuje fakt, że przyciągające oddziaływania elektrostatyczne między kationem hipoksantyny a anionem azotanowym występują skośnie między warstwami, zaś najsilniejsze oddziaływania odpychające pomiędzy anionami azotanowymi – prostopadle między warstwami. Taki układ sprawia, że sztywne warstwy struktury łatwo się ślizgają, prowadząc do stopniowej zmiany parametrów komórki elementarnej i geometrii całego kryształu.

W mojej pracy podjęłam się analizy owych zmieniających się oddziaływań, opartej na analizie geometrii każdej ze struktur oraz obliczeniach energii elektrostatycznej a także całkowitej energii obecnych w strukturze dimerów. Do otrzymania tych wyników użyłam geometrii z trzech źródeł – wyznaczonej za pomocą modelu niezależnych atomów (ang. Independent Atom Model, IAM), udokładnionej w oparciu o bank asferycznych atomów (ang. Multipolar Atom Types from Theory and Statistical clustering, MATTS), oraz zoptymalizowanej metodami kwantowomechanicznymi. Każda z tych geometrii ma swoje elementy charakterystyczne, a porównanie różnic między nimi pozwoliło mi wyciągnąć wnioski na temat struktury.

Każda z geometrii dała podobne wyniki jeśli chodzi o różnice w energii dimerów niepołączonych wiązaniami wodorowymi. Energie te, zarówno elektrostatyczne jak i całkowite, zmieniały się stopniowo wraz z temperaturą, będąc w ścisłej zależności ze zmianami odległości środków masy tworzących je molekuł. Jednak gdy przychodziło do analizy zmian energii dimerów formowanych przez molekuly połączone wiązaniem wodorowym, wyraźnie było widać, jak duży wpływ na energię ma lokalizacja wodorów. W IAM wodory są umieszczone zazwyczaj zbyt blisko molekuly, dla odmiany bank asferycznych atomów wydłuża wiązania do długości porównywalnych ze średnimi wartościami otrzymywanymi z pomiarów neutronowych, zaś optymalizacja geometrii wyciąga je automatycznie do długości otrzymanych z pomiarów neutronowych w temperaturze 0 K. Różnice w energiach oddziaływań wyznaczonych na podstawie geometrii z tych trzech źródeł są jasnym

dowodem na to, jak ważnym elementem analizy strukturalnej jest poprawne wyznaczenie lokalizacji protonów i jak duży wpływ może to mieć na wynik końcowy.

Interesującym było przyjrzenie się, jak ściśle powiązane są ze sobą zmiany struktury (a w konsekwencji energii dimerów) z bardziej makroskopowymi zjawiskami w kryształach. Przemieszczające się warstwy kryształu przyczyniały się do powstania ujemnego współczynnika rozszerzalności termicznej i prostopadłego do niego, zwiększonego dodatniego współczynnika rozszerzalności termicznej. Ich wektory skierowane są po skosie względem płaszczyzn. Prócz tego bliźniaczenie kryształu, który dzielił się niemalże na pół, a zbliźniona część była odwrócona względem pierwotnej o  $180^\circ$ . Wszystkie te elementy przeciwdziałały rozpadowi kryształu w wyniku zbyt dużych naprężeń powodowanych przemieszczającymi się warstwami.

Podsumowując, w mojej rozprawie doktorskiej przyjrzałam się oddziaływaniom zasad azotowych nukleotydów, ze szczególnym uwzględnieniem ich sprotonowanej formy, używając do tego metod krystalografii rentgenowskiej oraz obliczeń kwantowomechanicznych.