

Imię i nazwisko autora rozprawy: **Paulina Rakowska**

Dyscyplina naukowa: **Chemia**

ROZPRAWA DOKTORSKA

Tytuł rozprawy w języku polskim:

**Studia nad mechanizmem wpływu osmolitów,
metylo pochodnych glicyny oraz alkilopochodnych mocznika, na
strukturę i stabilność DNA w roztworze wodnym**

Tytuł rozprawy w języku angielskim:

**Studies on the mechanism of osmolytes, methyl glycine and
alkil urea derivatives, effect on the structure and stability of DNA in
aqueous solution**

Promotor

podpis

prof. dr hab. inż. Janusz Stangret

Gdańsk, rok 2015

*Dziękuję wszystkim, którzy mieli udział w powstaniu tej pracy,
szczególnie Panu Profesorowi Januszowi Stangretowi
oraz Koleżankom i Kolegom z Katedry Chemii Fizycznej.*

*Rodzicom i Adamowi.
Dziękuję za nieocenione wsparcie.*

SPIS TREŚCI

1	Wykaz ważniejszych oznaczeń i skrótów.....	7
2	Streszczenie.....	11
3	Abstract.....	13
4	Wstęp	15
5	Część literaturowa	17
5.1	Struktura DNA	18
5.1.1	Oddziaływania stabilizujące w DNA	23
5.2	Wpływ wody na konformację i stabilność DNA	25
5.3	Wpływ osmolitów na stabilność DNA.....	31
5.3.1	Glicyna i jej <i>N</i> -metylo pochodne	32
5.3.2	Mocznik i jego <i>N</i> -alkilowe pochodne.....	35
5.3.3	Oddziaływania poliamin z DNA.....	37
6	Cel i zakres pracy	41
7	Materiały i metodyka badawcza	45
7.1	Materiały.....	46
7.1.1	DNA genomowe.....	46
7.1.2	Osmolity	46
7.1.3	Odczynniki.....	47
7.1.4	Przygotowanie roztworów do analizy FTIR.....	47
7.1.5	Przygotowanie roztworów do badań kalorymetrycznych ITC	48
7.1.6	Przygotowanie roztworów do badań mikrokalorymetrycznych DSC	49
7.2	Aparatura badawcza	50
7.3	Specjalistyczne oprogramowanie komputerowe.....	51

7.4	Metodyka pomiarowa widm FTIR.....	52
7.4.1	Wprowadzenie	52
7.4.2	Widmo DNA w podczerwieni.....	53
7.4.3	Wstępne opracowanie widm.....	54
7.4.4	Usunięcie widma wody	54
7.4.5	Opracowanie widm IR pod kątem analizy prowadzącej do wyznaczenia „widm zaburzonych”	55
7.4.6	Chemometryczna metoda wyznaczania widm zaburzonych	60
7.5	Metodyka pomiarów kalorymetrycznych ITC.....	65
7.5.1	Wstępne opracowanie termogramów	66
7.6	Metodyka pomiarów kalorymetrycznych DSC.....	72
7.6.1	Wstępne opracowanie danych kalorymetrycznych.....	72
7.7	Metodyka obliczeń	74
8	Część eksperymentalna – wyniki badań i ich dyskusja.....	75
8.1	Analiza danych kalorymetrycznych	77
8.1.1	Glicyna i jej N-metylowe pochodne.....	78
8.1.2	Mocznik i jego N-alkilowe pochodne	86
8.1.3	Spermidyna	92
8.2	Analiza danych widmowych FTIR.....	95
8.2.1	Zmiany widmowe DNA w funkcji stężenia osmolitów	95
8.2.2	Analiza chemometryczna wpływu osmolitów na widmo zaburzonego DNA.....	103
8.2.3	Analiza widm osmolitów zaburzonych przez DNA.....	123
8.3	Analiza wyników obliczeń teoretycznych DFT	127
9	Dyskusja wpływu osmolitów na DNA.....	133
10	Podsumowanie i wnioski końcowe	147
11	Dorobek naukowy.....	151

12 Bibliografia	155
13 Materiały uzupełniające	163
13.1 Dane kalorymetryczne DSC uzyskane dla układów DNA-woda-osmolit	164
13.2 Dane kalorymetryczne ITC uzyskane dla układu DNA-woda-spermidyna	166
13.3 Dane analizy chemometrycznej widm DNA zaburzonego obecnością osmolitów w roztworze	169
13.4 Zoptymalizowane struktury par zasad DNA w obecności wody i osmolitów	173

1 Wykaz ważniejszych oznaczeń i skrótów

$(dT_m/dc)'_{c \rightarrow 0}$	wartość pochodnej zależności temperatury denaturacji DNA w obecności osmolitu od jego stężenia w roztworze wyznaczona dla nieskończonego rozcieńczenia osmolitu [$\text{deg} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$]
A	adenina
C	cytozyna
ctDNA	DNA pochodzące z grasicy cielęcej (<i>ang. calf thymus DNA</i>)
DEM	<i>N, N'</i> - dietylomocznik
DMG	<i>N, N</i> - dimetyloglicyna
DMM	<i>N, N'</i> - dimetylomocznik
FTIR	spektroskopia w zakresie podczerwieni z transformacją Fouriera (<i>ang. Fourier Transform Infra Red</i>)
G	guanina
<i>N</i>	liczba moli osmolitu zaburzonych przez jeden mol par zasad DNA
N_{H_2O}	liczba moli cząsteczek wody zaburzonej, przypadająca na jeden mol osmolitu
NEM	<i>N</i> - etylomocznik
NMG	<i>N</i> - metyloglicyna
NMM	<i>N</i> - metylomocznik
Q_{NaDNA}	entalpia oddziaływania soli sodowej kwasu deoksyrybonukleinowego (NaDNA) z osmolitem, ekstrapolowana do nieskończonego rozcieńczenia osmolitu [kJ mol^{-1}]
Q_{H_2O}	entalpia oddziaływania wody z osmolitem ekstrapolowana do nieskończonego rozcieńczenia osmolitu [J mol^{-1}]
Q_{Na^+}	entalpia oddziaływania jonów sodowych z osmolitem ekstrapolowana do nieskończonego rozcieńczenia osmolitu [kJ mol^{-1}]
P°_{970}	pochodna zależności procentowej zawartości struktury zaburzonej DNA przez osmolit od stężenia tego osmolitu, określana dla pasma 970 cm^{-1} DNA, wyznaczona dla nieskończonego rozcieńczenia osmolitu
$P^{\circ}_{1086/1053}$	pochodna zależności procentowej zawartości struktury zaburzonej DNA przez osmolit od stężenia tego osmolitu, określana dla pasm 1086 i 1053 cm^{-1} DNA, wyznaczona dla nieskończonego rozcieńczenia osmolitu
P°_{1222}	pochodna zależności procentowej zawartości struktury zaburzonej DNA przez osmolit od stężenia tego osmolitu, określana dla pasma 1222 cm^{-1} DNA, wyznaczona dla nieskończonego rozcieńczenia osmolitu
R_{OO}	średnia odległość międzycząsteczkowa wody mierzona pomiędzy atomami tlenu [Å]

R_{OO}^w	średnia ważona odległość międzycząsteczkowa wody mierzona pomiędzy atomami tlenu [Å]
$R_{X-H...Y}$	długość wiązania wodorowego pomiędzy parami zasad [Å]
$\bar{R}_{X-H...Y}$	średnia długość wiązania wodorowego pomiędzy parami zasad [Å]
$\Delta\bar{R}_{X-H...Y}$	różnica średnich długości wiązań wodorowych przy wymianie cząsteczki wody na cząsteczkę osmolitu [Å]
T	tymina
TBACl	chlerek tetrabytyloamoniowy
T_m	temperatura denaturacji DNA [°C]
TMG	<i>N, N, N</i> - trimetyloglicyna
TMM	<i>N, N, N', N'</i> - tetrametylomocznik
U_{95}	niepewność rozszerzona pomiaru dla poziomu ufności równego 95%
ΔT_m	zmiana temperatury denaturacji DNA w obecności określonego stężenia osmolitu w stosunku do DNA w roztworze wodnym bez udziału osmolitu [°C]

2 Streszczenie

Niniejsza rozprawa doktorska zawiera wyniki badań, które dotyczą wpływu małych cząsteczek organicznych, jakimi są osmolity na strukturę i stabilność DNA z grasicy cielęcej w roztworze wodnym bez udziału buforu. Wykorzystane osmolity z grupy metyloglicyn (glicyna, *N*-metyloglicyna, *N,N*-dimetyloglicyna i *N,N,N*-trimetyloglicyna) oraz alkilowych pochodnych mocznika (mocznik, *N*-metylomocznik, *N,N'*-dimetylomocznik, *N,N,N',N'*-tetrametylomocznik, *N*-etylomocznik, *N,N'*-dietylomocznik) zostały wybrane ze względu na konieczność uzupełnienia wiedzy na temat mechanizmu wywoływanej przez nie destabilizacji DNA. Układy pozbawione warunków buforujących zastosowano ze względu na duży wpływ buforów na stabilność temperaturową i termodynamiczną DNA, co utrudniłoby analizę wyników na poziomie molekularnym.

Część eksperymentalna obejmuje wykorzystanie wielu technik. Widma uzyskane za pomocą spektroskopii FTIR oraz adaptacja chemometrycznej metody wyznaczania widm zaburzonych w układach zawierających DNA, pozwoliły na wyizolowanie widma DNA zaburzonego przez substancję rozpuszczoną oraz widma osmolitu zaburzonego przez DNA w roztworze. Tym samym możliwe stało się określenie wzajemnego wpływu DNA i osmolitu na strukturę drugiego komponentu układu. Stabilność temperaturowa DNA w takim układzie została zbadana z wykorzystaniem skaningowej kalorymetrii różnicowej (DSC), natomiast izotermiczna kalorymetria miareczkowa (ITC) umożliwiła wyznaczenie globalnego efektu cieplnego, jaki towarzyszy interakcji osmolitów z DNA w roztworze wodnym.

Dodatkowych informacji potrzebnych do zbadania natury oddziaływań DNA-osmolit dostarczyły przeprowadzone obliczenia teoretyczne DFT uwodnionych oraz poddanych wpływowi wybranych osmolitów par zasad DNA w fazie gazowej. Uzyskane odległości międzyatomowe umożliwiły określenie wpływu zastąpienia cząsteczek wody oddziałujących z różnymi grupami funkcyjnymi zasad przez osmolity na wiązania wodorowe pomiędzy komplementarnymi parami zasad w DNA.

Analiza wyników pozwoliła na zidentyfikowanie różnic w oddziaływaniu metyloglicyn oraz alkilowych pochodnych mocznika na DNA. Zaproponowano również hipotezy robocze dotyczące molekularnego mechanizmu destabilizacji DNA przez te grupy osmolitów w roztworze wodnym pozbawionym substancji buforujących.

3 Abstract

This work presents results of studies on the effect of small organic compounds, which are osmolytes, on the structure and stability of the calf thymus DNA in aqueous solution without buffer. The osmolytes used for experiments were methyl glycines (glycine, *N*-methylglycine, *N,N*-dimethylglycine and *N,N,N*-trimethylglycine) and alkyl urea derivatives (urea, *N*-methylurea, *N,N'*-dimethylurea, *N,N,N',N'*-tetramethylurea, *N*-ethylurea, *N,N'*-diethylurea). They were selected because of lack of sufficient knowledge about their mechanism of DNA destabilization. Systems without buffering conditions were applied due to the large impact of buffers on the thermal and thermodynamic stability of DNA and that would complicate analysis of the research results at the molecular level.

A number of techniques were used in the experimental part. Spectra obtained using FTIR spectroscopy, as well as adaptation of the chemometrical method of determining affected spectra in systems containing DNA, allowed for the isolation of DNA affected spectra by a solute and affected spectra of osmolyte disturbed by the DNA in solution. Thus, it was possible to determine the mutual impact of DNA and osmolyte on the structure of the second component of the system. Thermal stability of the DNA was examined using differential scanning calorimetry (DSC) and isothermal titration calorimetry (ITC). It allowed to determine the global heat effect that accompanies the interaction of osmolytes and DNA in aqueous solution.

Additional information necessary to determine the nature of interactions in DNA-osmolyte systems was provided by the DFT theoretical calculations in the gas phase of hydrated and influenced by osmolytes DNA base pairs. The resulting inter-atomic distances allowed to determine the effect of replacing the water molecules interacting with DNA functional groups by osmolytes on hydrogen bonding between complementary base pairs in the DNA.

Analysis of the results allowed us to identify differences in the methylglycines and alkyl urea derivatives impact on the DNA. On this basis a working hypotheses were also proposed explaining the molecular mechanism of DNA destabilization by osmolytes in an aqueous solution without buffering substances.

4 Wstep

Kwasy nukleinowe obok białek, są najważniejszymi biocząsteczkami występującymi we wszystkich organizmach żywych. Ich funkcją jest kodowanie, transmisja oraz ekspresja informacji genetycznej. Innymi słowy, informacja genetyczna jest przenoszona przez konkretną sekwencję nukleotydów w cząsteczce DNA i RNA. Niezwykle istotne jest zatem zrozumienie, w jaki sposób kwasy nukleinowe funkcjonują w komórce.

Możliwość modyfikacji naturalnej stabilności DNA ma ogromne znaczenie nie tylko w medycynie, ale także w rolnictwie i kryminalistyce. Odkrycie mechanizmów rządzących stabilnością DNA ma zatem znaczenie nie tylko poznawcze. Umiejętność dostosowania jej do wymaganych warunków jest nadal wyzwaniem. Cel ten można osiągnąć poprzez zastosowanie związków będących znanymi destabilizatorami DNA, jakimi są osmolity.

Osmolity to małe cząsteczki organiczne, które są produkowane w komórkach organizmów żywych w odpowiedzi na niekorzystne warunki środowiska. Są one akumulowane w komórkach, osiągając wysokie stężenia (do $2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) bez znacznego wpływu na procesy metabolizmu komórkowego. Istnieje wiele teorii mających na celu wyjaśnienie stabilizującego i destabilizującego wpływu osmolitów na białka i DNA, jednakże wciąż nie można stwierdzić, czy mechanizm tego oddziaływania na biocząsteczki jest pośredni, czy bezpośredni.

Wykazano zostało, że cząsteczki osmolitów zaburzają przestrzenny układ oraz stan energetyczny cząsteczek wody i powodują, że woda przejawia inne właściwości fizykochemiczne niż czysty rozpuszczalnik. Woda natomiast odgrywa bardzo ważną rolę w stabilizacji DNA. W zależności od stopnia uwodnienia cząsteczki DNA zmienia się jej stopień upakowania oraz zmienia się jej konformacja.

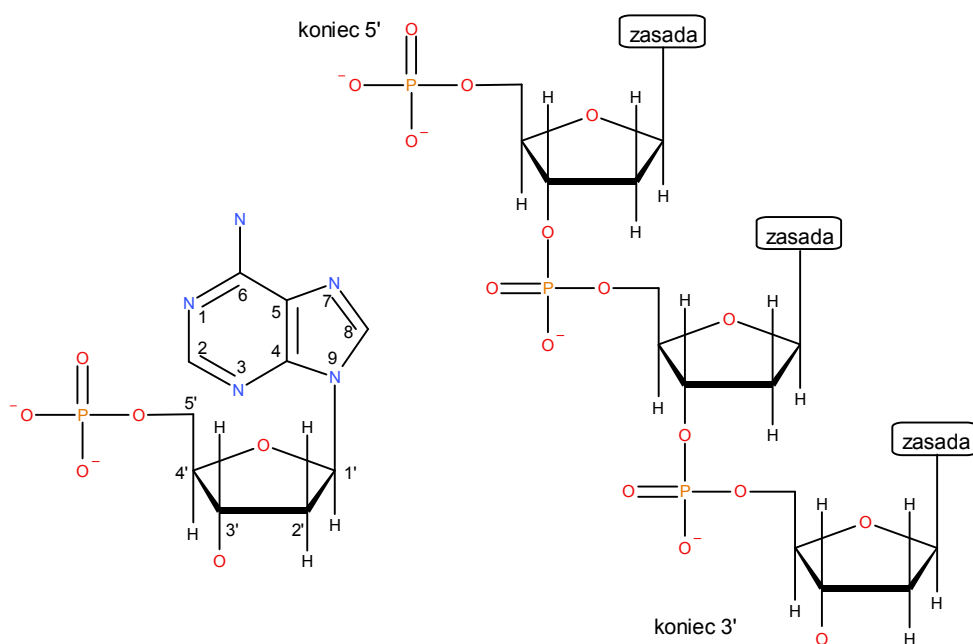
W niniejszej pracy wykorzystano różne uzupełniające się techniki eksperymentalne, co pozwoliło na zaproponowanie niektórych aspektów molekularnego mechanizmu wpływu osmolitów, metylo pochodnych glicyny oraz alkilopochodnych mocznika, na strukturę i stabilność DNA w nie buforowanych roztworach wodnych.

Wykonane w pracy badania mają charakter podstawowy. Poza aspektem poznawczym, wiedza z zakresu fizykochemii badanych układów może przyczynić się do rozwoju metod i technik wykorzystywanych w różnych gałęziach biotechnologii.

5 Część literaturowa

5.1 Struktura DNA

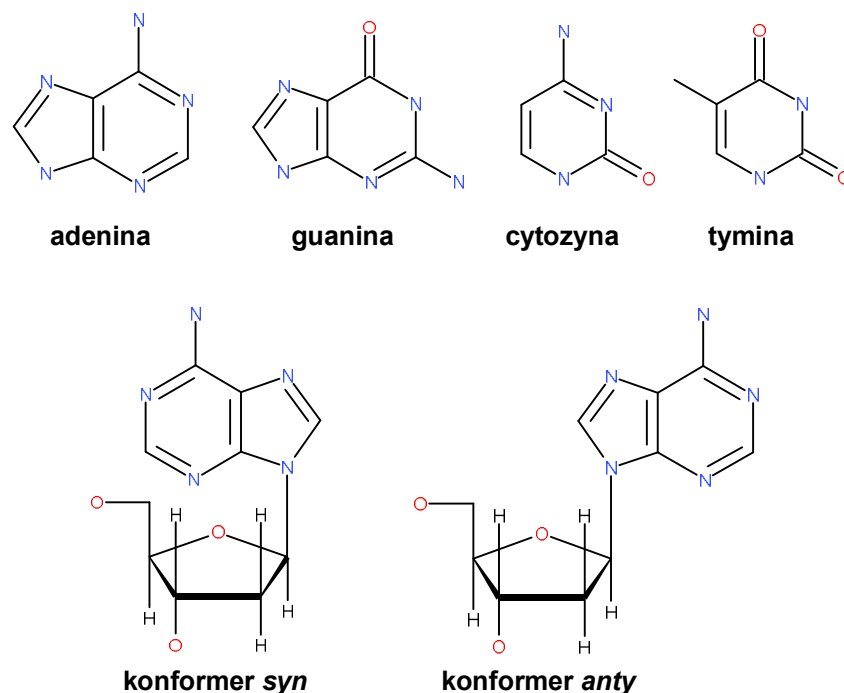
Cząsteczka DNA jest polimerem zbudowanym z nukleotydów, które łącząc się ze sobą w odpowiednie sekwencje. Każdy nukleotyd składa się z: grupy fosforanowej, reszty cukrowej – 2'-deoksyrybozy i zasady azotowej. Zasady są w DNA nośnikiem informacji genetycznej natomiast reszty fosforanowe i cukrowe stanowią szkielet DNA. Nukleotydy połączone są między sobą wiązaniem fosfodiestrowym, w którym grupa fosforanowa łączy grupę hydroksylową przy węglu 3' deoksyrybozy pierwszego nukleotydu z grupą hydroksylową przy węglu 5' deoksyrybozy w kolejnym nukleotydzie (Rysunek 1). Zwyczajowo sekwencja DNA podawana jest od końca 5' do 3', co jest zgodne z kierunkiem jego syntezy¹.



Rysunek 1. Budowa nukleotydu, w tym przypadku adeniny oraz sposób i kierunek łączenia poszczególnych nukleotydów.

W DNA obecne są dwa typy zasad azotowych: puryny i pirymidyny. Puryny występujące w DNA to: guanina (G) i adenina (A), natomiast pirymidyny tworzące DNA to: cytozyna (C) i tymina (T) (Rysunek 2). Pierścień 2'-doeksyrybozy nie jest płaski i jego kształt determinuje strukturę DNA.

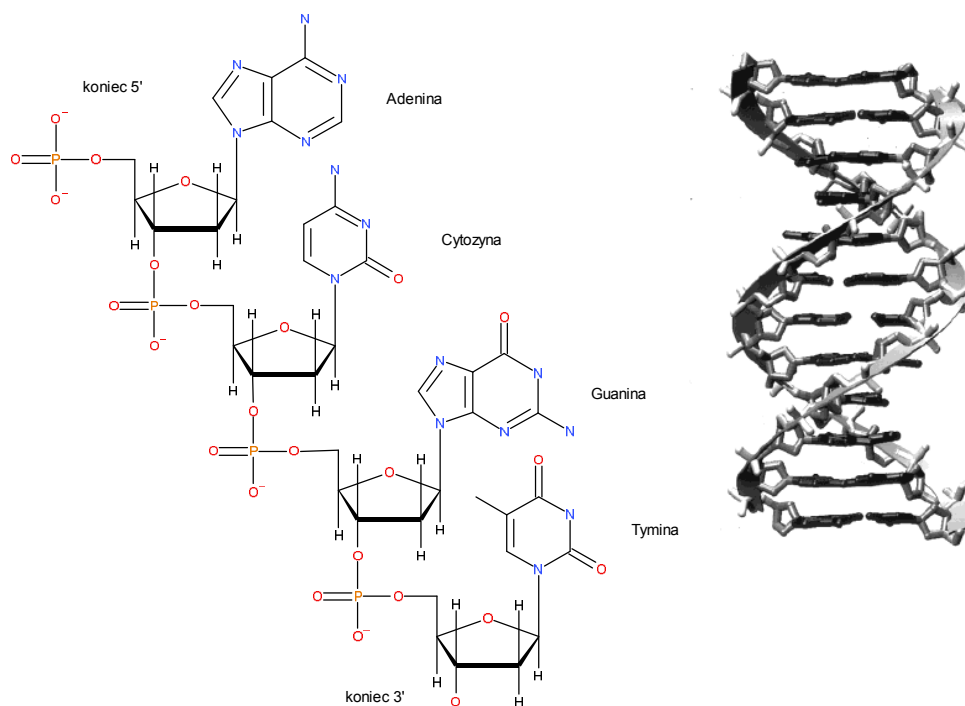
Ponad płaszczyznę pierścienia może wychodzić węgiel C2' lub C3', jeśli znajdują się one po tej samej stronie płaszczyzny, co węgiel C5', to konformacje takie nazywa się *endo*, jeśli po przeciwnej – *egzo*. Ponadto zasady azotowe mogą układać się na dwa różne sposoby (Rysunek 2) w stosunku do pierścienia cukrowego i w związku z tym rozróżniamy ułożenie *anty* i *syn*¹. Związki, które są połączeniem zasady azotowej z cukrem nazywa się nukleozydami. W DNA obecne są cztery rodzaje nukleozydów: deoksyguanozyna (dG), deoksyadenozyna (dA), deoksycytydyna (dC) oraz deoksytymidyna (dT). Cukier związany jest z zasadą wiązaniem N-glikozydowym utworzonym pomiędzy węglem C1' deoksyrybozy, a węglami N9 lub N1, odpowiednio w zasadach purowych lub pirymidynowych.



Rysunek 2. Zasady azotowe w DNA. Puryny: adenina i guanina oraz pirymidyny: cytozyna i tymina. Orientacja *syn* i *anty* wiązania N-glikozydowego 2'deoksyadenozyny.

Sekwencję łańcucha DNA, złożoną z nukleotydów, można porównać do struktury pierwszorzędowej białek. Określenie sekwencji kwasów nukleinowych pozwala na uzyskanie informacji genetycznej na temat każdego organizmu, od bakterii aż do człowieka. Różne konformacje, jakie może przyjąć helisa w zależności od warunków środowiska są kolejnym poziomem

organizacji struktury DNA, porównywalnym ze strukturą drugorzędową białek (Rysunek 3). Natomiast przestrzennie upakowana helisa, między innymi w formie chromosomu, to przykład porównywalny ze strukturą trzeciorzędową białek.



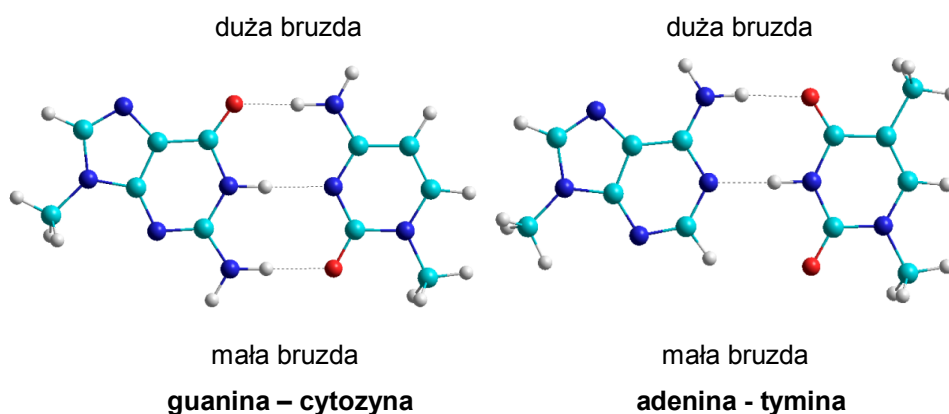
Rysunek 3. Przykłady organizacji struktury DNA w formie sekwencji nukleotydów oraz podwójnej helisy B-DNA (na podstawie ²).

James Watson i Francis Crick ³ jako pierwsi opisali strukturę DNA na podstawie obrazu dyfrakcji promieni rentgenowskich uzyskanego przez Rosalind Franklin i Maurice'a Wilkinsa. Przedstawiony przez nich model opisuje DNA jako prawoskrętną, antyrównoległą, podwójną helisę, tworzoną przez określony wzór komplementarnych par zasad. W ich modelu odległość między sąsiednimi zasadami w helisie wynosi 3.4 Å, a na jeden obrót helisy przypada 10 par zasad, które są skręcone względem siebie pod kątem 36 stopni. Średnica helisy wynosi 20 Å. Zasady azotowe znajdują się wewnątrz helisy, a na zewnątrz są reszty fosforanowe i cukrowe.

Podwójna helisa DNA jest stabilizowana głównie przez oddziaływania zasada – zasada, które działają prostopadłe do osi helisy i są stabilizowane

przez siły dyspersyjne Londona, oddziaływania donorowo - akceptorowe oraz efekt hydrofobowy¹.

Dwie nici DNA są do siebie komplementarne ze względu na parowanie się komplementarnych zasad, adenina jest połączona z tyminą dwoma wiązaniami wodorowymi, natomiast guanina oddziałuje z cytozyną poprzez trzy wiązania wodorowe (Rysunek 4). Komplementarność dwóch nici helisy pozwala na zrozumienie mechanizmu replikacji DNA, co spowodowało rewolucję w naukach biologicznych.



Rysunek 4. Prezentacja wiązań wodorowych łączących komplementarne pary zasad w DNA. Kolorem niebieskim zaznaczono atomy węgla, czerwonym – tlenu, granatowym – azotu, białym – wodoru.

Po odkryciu struktury DNA przez Watsona i Cricka, okazało się, że może ono przyjmować różne konformacje. Badania odwodnionych włókien DNA z wykorzystaniem rentgenografii strukturalnej ujawniły, że istnieją dwie różne struktury, które Rosalind Franklin nazwała A- i B-DNA⁴. Główną różnicą pomiędzy formą A i B jest sposób fałdowania pierścienia cukrowego w nukleotydach. W formie A-DNA obecna jest deoksyryboza w konformacji C2'-endo, natomiast w B-DNA – C3'-endo. Watson i Crick opisali strukturę B-DNA, która jest najbardziej stabilna w cząsteczkach DNA o mieszanej sekwencji, w warunkach fizjologicznych. Natomiast forma A jest spotykana w roztworach DNA o obniżonej aktywności wody¹.

Forma A-DNA, podobnie, jak forma B jest prawoskrętną helisą zbudowaną z dwóch nici ułożonych antyrównoległe. W helisie typu A pary zasad są odchylone od położenia prostopadłego względem osi cząsteczki o 19

stopni. Ponadto A-DNA jest cząsteczką krótszą i ma większą średnicę niż B-DNA (Tabela 1).

Na powierzchni helisy B-DNA znajdują się dwie bruzdy o różnej głębokości i szerokości, tzw. mała i duża bruzda. W formie B duża bruzda jest szersza i głębsza niż w DNA typu A.

Badania z wykorzystaniem rentgenografii strukturalnej odcinka o sekwencji CGCGCG pozwoliły także na odkrycie struktury lewoskrętnej podwójnej helisy DNA⁵. Ze względu na specyficzne ułożenie szkieletu DNA w formie litery „Z” nazwano tę strukturę Z-DNA. Widoczna jest w niej tylko jedna bruzda, analogiczna do małej bruzdy w B-DNA⁶. Z-DNA jest formą przejściową, stabilizowaną przez superzwinięcia, które tworzą się podczas odpakowywania DNA z nukleosomów i w kompleksach z polimerazą RNA. Tworzy się także w warunkach bardzo dużego stężenia soli, która jest niezbędna do zminimalizowania oddziaływań elektrostatycznych między grupami fosforanowymi w szkielecie, które w cząsteczce Z-DNA są bliżej siebie niż w cząsteczce typu A i B. Istnieją również sekwencje DNA występujące często na początku genów, które sprzyjają powstaniu formy Z⁷⁻⁹.

Tabela 1. Porównanie najczęściej spotykanych form DNA, na podstawie¹.

	A-DNA	B-DNA	Z-DNA
Kierunek skręcenia	prawoskrętna	prawoskrętna	lewoskrętna
Średnica helisy	~26 Å	~20 Å	~18 Å
Liczba par zasad/skręt	11	10.5	12
Odległość między sąsiednią parą zasad	2.6 Å	3.4 Å	3.8 Å
Skok helisy	28 Å	35 Å	46 Å
Odchylenie pary zasad od położenia prostopadłego do osi helisy	19°	1°	9°
Konformacja pierścienia cukrowego	C3'-endo	C2'-endo	pirymidyny: C2'-endo puryny: C3'-endo
Wiązanie glikozydowe	anty	anty	anty i syn

5.1.1 Oddziaływania stabilizujące w DNA

Dwa łańcuchy DNA zwinięte w regularną strukturę helikalną są stabilizowane, dzięki ułożeniu zasad w stosie, jedna nad drugą. Wyróżnić można dwa rodzaje stabilizujących oddziaływań zasada – zasada:

- oddziaływania w płaszczyźnie zasad (horyzontalne) – wiązania wodorowe
- oddziaływania prostopadłe do płaszczyzny zasad stabilizowane przez siły dyspersyjne Londona^{10,11}, oddziaływania donorowo-akceptorowe oraz efekt hydrofobowy (asocjacja warstwowa)^{12,13}.

Wiązania wodorowe pomiędzy zasadami odgrywają ważną rolę w rozpuszczalnikach niepolarnych, gdzie asocjacja warstwowa jest nieistotna. Natomiast oddziaływania w płaszczyźnie prostopadłej do płaszczyzny zasad dominują w wodzie, gdzie wiązania wodorowe są tłumione przez współzawodnictwo o miejsca wiązania z cząsteczkami wody^{14,15}.

Sąsiadujące ze sobą wzdłuż helisy pary zasad przyciągają się wiązaniami van der Waalsa. Energia tych wiązań jest stosunkowo niewielka – dla jednej pary atomów wynosi od 2.0 do 4.2 kJ·mol⁻¹. Podwójną helisę tworzy wielka liczba atomów przyciągających się wiązaniami van der Waalsa, zatem to właśnie ten typ wiązań ma zasadnicze znaczenie w utrzymaniu struktury DNA.

Wiązania wodorowe, które tworzą się pomiędzy zasadami w DNA są typu: N-H·····N i N-H·····O, gdzie w obu przypadkach donorem wodoru jest grupa N-H. Dobrze znane wśród nich pary Watsona-Cricka: guanina-cytozyna oraz adenina tymina, zawierają odpowiednio trzy oraz dwa normalne wiązania wodorowe³. Należą one do wiązań wodorowych o średniej sile¹⁶. Poza regularnymi parami Watsona-Cricka, istnieje wiele innych kombinacji par zasad połączonych podwójnym wiązaniem wodorowym, które są spotykane w strukturach krystalicznych kwasów nukleinowych. Biorąc pod uwagę wszystkie możliwe kombinacje par zasad połączonych wiązaniami wodorowymi, określono¹⁷ energię ich wzajemnego oddziaływania, która przyjmuje wartości od -4.71 do -26.73 kcal·mol⁻¹. Spośród wszystkich par zasad najbardziej stabilna jest para GC (-26.73 kcal·mol⁻¹). Natomiast para zasad AT wykazuje średnią stabilność na poziomie -13.14 kcal·mol⁻¹. Obliczenia chemii kwantowej^{18,19} rozdzielają całkowitą energię oddziaływań poprzez wiązania wodorowe na składowe wynikające z efektu dyspersji, polaryzacji oraz efekt elektrostatyczny. Wynika z nich, że główną rolę w wiązaniach wodorowych odgrywają oddziaływania elektrostatyczne i stanowią ok. 80 % całkowitej

energii. Różnice energii całkowitej wiązań wodorowych pomiędzy różnymi parami zasad wskazują, że stabilność takiego kompleksu nie zależy od liczby wiązań wodorowych. Należałoby raczej wziąć pod uwagę rozkład wewnętrznego ładunku elektrycznego zasocjowanych zasad²⁰.

Kolejnym parametrem charakteryzującym wiązania wodorowe par zasad jest geometria takiego kompleksu, czyli długość wiązania wodorowego i jego kąt. Analiza tych parametrów pozwala stwierdzić, że wiązania wodorowe w DNA są prawie liniowe¹⁷. Wykazano również, że poszczególne zasady w parach AU oraz GC nie leżą w jednej płaszczyźnie. Są one skręcone w osi wiązań wodorowych jak łopatki śmigła. To skręcenie wynosi ok. 12° w parze AU i 7° w GC. Porównywalne skręcenia zaobserwowano również w innych kombinacjach par zasad²¹.

Dodatkowo helisa jest stabilizowana przez oddziaływania hydrofobowe. Asocjacja warstwowa zasad, czyli hydrofobowe oddziaływania pomiędzy nimi, powodują zwrócenie powierzchni o charakterze polarnym w kierunku środowiska wodnego.

Badania nad asocjacją zasad i nukleozydów w roztworze wodnym z wykorzystaniem technik osmometrycznych^{15, 22} pozwoliły stwierdzić, że zasięg oddziaływań pionowych pomiędzy zasadami wykracza poza obszar dimeru. Proces asocjacji zasad jest odwracalny i zachodzi ze stałym przyrostem wartości energii swobodnej na każdym etapie. To sugeruje, że dodatek kolejnej zasady do poprzedniej lub do całego stosu jest niekooperatywny, każdy etap jest niezależny i wykazuje takie same parametry termodynamiczne oraz kinetyczne²³. Wartość stałej asocjacji uzyskanej dla nukleozydów purynowych i pirymidynowych jest charakterystyczna dla słabych oddziaływań, natomiast otrzymane dla tych układów entalpie ΔH oraz entropie ΔS są ujemne.

Stabilność oddziaływań pionowych pomiędzy zasadami zależy od ich rodzaju i zmienia się w następującej kolejności: puryna-puryna > puryna-pirymidyna > pirymidyna-pirymidyna²⁴⁻²⁷. Jeśli zasady są ze sobą połączone w oligo- lub polinukleotydy, oddziaływania pionowe zachodzą pomiędzy sąsiednimi zasadami i powodują powstanie stabilnych, jednoniciowych struktur helikalnych²⁸.

Efekt hydrofobowy powoduje, że zasady rozpuszczone w wodzie wykazują tendencję do agregowania oraz redukcji powierzchni dostępnej dla oddziaływań substancja rozpuszczona-rozpuszczalnik, co w ekstremalnych

warunkach prowadzi do powstania układu dwufazowego. Oddziaływania hydrofobowe nie tłumaczą jednak specyficznego oddziaływania pomiędzy zasadami, które przejawia się na przykład silniejszymi oddziaływaniami pomiędzy purynami niż pomiędzy pirymidynami. Te właściwości wynikają z działania sił dyspersyjnych Londona oraz oddziaływań pomiędzy dipolami.

Rozkład ładunku elektrycznego w cząsteczkach jest asymetryczny, co jest spowodowane różną budową pierścieni i obecnością różnych grup funkcyjnych. Zatem dipole utworzone w jednej grupie atomów polaryzują układ elektryczny sąsiednich atomów bądź cząsteczek. To indukuje równoległe dipole, które się przyciągają. Siły te są addytywne i niezależne od temperatury²⁹. Jeśli zasady posiadają również trwały moment dipolowy, dwa efekty elektryczne: siły dyspersyjne Londona oraz trwałe dipole, współdziałają, co prowadzi do powstania znacznego efektu, bardziej zaznaczonego w zasadach purynowych niż pirymidynowych.

W związku z tym, że pary GC są bardziej stabilne niż AT, dimery złożone z GC są energetycznie bardziej korzystne niż te złożone z par AT i różnica ta osiąga wartość 8 kcal·mol⁻¹ na dimer. Istotna jest również kolejność ułożenia zasad i różnica energetyczna pomiędzy dimerem 5'-CG-3' a dimerem 5'-GC-3' wynosi 5 kcal·mol⁻¹ na dimer. W obliczeniach tych nie brano pod uwagę oddziaływań hydrofobowych³⁰.

Podział całkowitej energii stabilizującej pary zasad na układy poziome (wiązania wodorowe) oraz pionowe (ułożenie par zasad w osi helisy) pokazuje, że poziome komplementarne wiązania wodorowe są zależne jedynie od ułożenia par zasad. Pionowe oddziaływania są natomiast zależne zarówno od sposobu ułożenia, jak i sekwencji par zasad^{19,30}.

5.2 Wpływ wody na konformację i stabilność DNA

Woda odgrywa kluczową rolę w stabilizacji biologicznie aktywnej struktury DNA. Oddziaływania między rozpuszczalnikiem a biomakrocząsteczką, jaką jest DNA są bardzo ważnym czynnikiem mającym wpływ na zmienność konformacji kwasów nukleinowych i ich funkcję, w tym oddziaływania z różnymi ligandami³¹⁻³⁵. Szczególne zainteresowanie budzi tendencja do zmiany struktury z A-DNA na B-DNA w zależności od aktywności wody¹. Zjawisko to po raz pierwszy zaobserwowali Franklin i Gosling⁴ badając włókna DNA, które zmieniały konformację z B na A przy

względnej wilgotności 73 – 95 %. Późniejsze badania przeprowadzone z użyciem spektroskopii w podczerwieni i UV dowiodły, że woda jest niezbędna do utrzymania integralnej struktury DNA, a obniżenie wilgotności prowadzi do zniszczenia właściwego ułożenia między zasadami w helisie³⁶.

Redukcja aktywności wody poprzez zmniejszenie wilgotności^{4, 37, 38} bądź dodanie rozpuszczalnika organicznego do roztworu wodnego³⁹⁻⁴¹ stwarza warunki, sprzyjające powstaniu bardziej upakowanej formy A-DNA. Podobny efekt wywołuje wysokie stężenie soli w roztworze, które obniżając aktywność wody, powoduje przejście z formy B do A⁴¹. Ponadto skłonność cząsteczek DNA do tworzenia konformacji A lub B zależy od jego sekwencji. Ogólnie mówiąc, w warunkach zmniejszonej aktywności wody⁴² lub dużego stężenia soli w roztworze⁴³, fragmenty DNA bogate w pary GC częściej występują w konformacji A niż fragmenty par AT. B-DNA jest konformacją dominującą w warunkach naturalnego środowiska w komórce, natomiast A-DNA jest spotykane w kompleksach DNA-białko^{44, 45}.

Pomimo bardzo dużej ilości danych uzyskanych różnymi metodami eksperymentalnymi i teoretycznymi na temat hydratacji A i B-DNA^{32, 33, 46, 47}, dokładny mechanizm ilościowy wpływu środowiska wodnego na DNA jest nadal nieznan. Badania teoretyczne dotyczące hydratacji kwasów nukleinowych stanowią bardzo cenne uzupełnienie danych eksperymentalnych, dostarczając modele teoretyczne będące poza zasięgiem eksperymentu. Takim narzędziem są symulacje komputerowe dynamiki molekularnej, które umożliwiają uzyskanie pełnego obrazu aspektów zarówno strukturalnych, jak i dynamicznych zjawiska rozpuszczania kwasów nukleinowych na poziomie molekularnym⁴⁸. W eksperymencie podobny poziom szczegółowości jest osiągalny poprzez wykorzystanie metod dyfrakcji neutronowej^{49, 50} i promieniowania rentgenowskiego^{47, 51-56} oraz spektroskopii nmr⁵⁷⁻⁵⁹, ale czułość tych metod jest ograniczona tylko do cząsteczek wody o stałej lokalizacji.

Tworzenie przez polinukleotydy struktur drugo- i trzeciorzędowych związane jest z właściwym upakowaniem grup atomów. W dwuniciowej helisie DNA tleny grup fosforanowych są prawie maksymalnie wyeksponowane na powierzchnię podczas, gdy zasady w 80% upakowane są do środka. Inaczej mówiąc 45 % całkowitej powierzchni helisy zajmują grupy fosforanowe, 20 % to zasady, a pozostałe 35 % cukry⁶⁰. Charakter polarny DNA zatem wzrasta,

gdy jest ono uformowane w strukturę dwuniciowej helisy. Większość powierzchni DNA ma charakter hydrofilowy i posiada grupy, które są zarówno donorami, jak i akceptorami wiązania wodorowego. Są one zlokalizowane w małej i dużej bruzdzie oraz wzdłuż polianionowego szkieletu DNA. W konsekwencji, cząsteczki wody silnie asocjują z DNA i tworzą warstwę hydratacyjną, która wykazuje właściwości fizyczne odmienne od wody czystej. Zjawisko hydratacji DNA było dokładnie badane z wykorzystaniem wielu technik eksperymentalnych i teoretycznych, pod kątem zbadania właściwości wody w pobliżu DNA oraz odnalezienia korelacji pomiędzy jej właściwościami a sekwencją i konformacją DNA^{36, 46, 61-63}. Doprowadziło to do wniosku, że woda otaczająca cząsteczkę DNA w roztworze jest mało ruchliwa^{64, 65}, jednocześnie jej gęstość jest większa niż wody czystej⁶⁶, ponieważ ułożenie tetraedryczne cząsteczek czystej wody jest zastępowane przez bardziej zwarte struktury, co jest konsekwencją powstawania wiązań wodorowych z cząsteczką DNA^{63, 67}.

Najczęściej badania dotyczące otoczki hydratacyjnej DNA skupiają się na określeniu liczby cząsteczek wody, które wykazują inne właściwości niż woda czysta. Z badań spektroskopowych, gravimetrycznych i wolumetrycznych włókien DNA w obniżonej wilgotności próbki wynika, że asocjacji z B-DNA ulega 25 do 30 cząsteczek wody na nukleotyd^{67, 68}, natomiast tylko 10 – 12 cząsteczek wody jest niezbędnych do stabilizacji formy A-DNA^{63, 68}. Ponadto ustalono, że 5 – 6 cząsteczek wody jest permanentnie związanych z nukleotydem DNA, nawet przy 0 % względnej wilgotności próbki⁶⁷. Pomiar relaksacji dielektrycznej cząsteczek wody związanych z DNA w mieszaninie woda – etanol wykazały, że co najmniej 10 – 18 cząsteczek wody jest niezbędnych do stabilizacji B-DNA, ale tylko 13 – 15 jest związanych z A-DNA⁶⁹. Mniejsza liczba cząsteczek wody związanych z A-DNA w stosunku do B-DNA może wynikać z większej powierzchni hydrofobowej dostępnej dla rozpuszczalnika poprzez wyeksponowane pierścienie cukrowe w A-DNA⁷⁰. Z punktu widzenia struktury, efekt ten jest konsekwencją bardziej upakowanego szkieletu A-DNA. W B-DNA grupy fosforanowe oddziałują z cząsteczkami wody indywidualnie, natomiast w A-DNA odległość pomiędzy nimi umożliwia tworzenie mostków wodnych pomiędzy tlenami na sąsiednich grupach fosforanowych. W warunkach zredukowanej wilgotności mostki pomiędzy grupami fosforanowymi prawdopodobnie odgrywają ważną rolę

w stabilizowaniu struktury A-DNA poprzez częściowe kompensowanie wzrastającego między nimi odpychania³³.

Pomiary gęstości i siły wyporu włókien DNA o różnej zawartości par GC przy 70 % wilgotności próbki pozwoliły wywnioskować, że w hydratacji par AT biorą udział o 2 cząsteczki wody więcej niż par GC⁷¹. Jednakże zauważono, że w tych warunkach pary GC częściej przyjmują formę A-DNA, podczas gdy pary AT pozostają w konformacji B⁷². Te różnice hydratacji można jednak przypisać głównie zredukowanej aktywności wody wokół A-DNA, a nie zależności stopnia uwodnienia od sekwencji DNA. Z badania objętości molowych i ściśliwości wody wokół DNA w roztworze wodnym w funkcji zawartości poszczególnych zasad w sekwencji DNA wynika, że w przeciwieństwie do wyników Tunisa i Heartsta⁷³, pary GC są hydratowane w większym stopniu niż AT⁶⁶. Ponadto zaobserwowano, że sekwencje DNA typowe dla genomu, czyli zawierające zarówno pary AT, jak i GC, są mniej uwodnione niż sekwencje homopolimerów GC lub AT. Wynika to prawdopodobnie z efektu kooperatywności oddziaływań w regularnych sekwencjach, którego brakuje w sekwencjach mieszanych, i który komplikuje wyznaczenie korelacji pomiędzy sekwencją a stopniem hydratacji DNA⁷⁴.

Chalikian⁶⁶ wskazał, że guanina posiada grupę aminową położoną w małym rowku, która stanowi dodatkowe miejsce donorowe dla wiązania wodorowego w stosunku do pary AT, więc para GC może związać o jedną cząsteczkę wody więcej niż AT.

Badanie zjawiska hydratacji DNA doprowadziły do wniosku, że woda otaczająca cząsteczkę DNA w roztworze nie jest homogeniczna i można ją podzielić na dwie warstwy: pierwszą i drugą warstwę hydratacyjną. Feig⁷⁵ wykorzystując dynamikę molekularną pokazał, że gęstość wody w pierwszej warstwie hydratacyjnej w otoczeniu atomów tlenu i azotu w DNA jest sześciokrotnie większa w stosunku do wody czystej, a wokół atomów węgla – dwukrotnie większa. Druga warstwa hydratacyjna jest dużo mniej wyraźna, ale nadal jej gęstość jest o 15 % większa niż gęstość wody czystej. Zauważono również trzecią warstwę, w której woda zlokalizowana w pobliżu atomów tlenu jest o 5 % gęstsza niż woda czysta. Zgodnie z danymi uzyskanymi z symulacji, struktura wody w odległości 0.8 – 1.0 nm od powierzchni DNA różni się od wody czystej, co zależy od typu atomu, z którym oddziałuje. Największe

zmiany w strukturze wody można zaobserwować w odległości 0.35, 0.39 i 0.5 nm odpowiednio od atomów tlenu, azotu i węgla na powierzchni DNA.

Symulacje dynamiki molekularnej pozwoliły także na wyznaczenie liczby cząsteczek wody znajdujących się w strefie hydratacyjnej B-DNA oraz A-DNA i wynoszą one odpowiednio 29.4 oraz 28.7 na parę zasad DNA ⁷². Dane te są zgodne z pomiarami grawimetrycznymi, wolumetrycznymi i spektroskopowymi ^{67, 68}, z których wynika, że w strefach hydratacyjnych B-DNA znajduje się 30 cząsteczek wody, które różnią się od wody czystej wyższą gęstością i utratą tetraedrycznej struktury wiązań wodorowych. Zgodnie z tymi badaniami stopień uwodnienia A- i B-DNA jest bardzo zbliżony i niezależny od sekwencji. Zauważyć można jednak znaczące różnice, mianowicie w strukturze A-DNA hydratacja pierścienia cukrowego wymaga dwóch więcej cząsteczek wody kosztem grup fosforanowych i hydratacji w dużym rowku w stosunku do B-DNA ⁷².

W pierwszej warstwie hydratacyjnej, znajduje się 18 – 21 związanych z DNA cząsteczek wody, pozostałe ok. 10 cząsteczek nie jest w bezpośrednim kontakcie z DNA, ale są one związane z cząsteczkami, które bezpośrednio oddziałują z DNA ⁷². Bezpośrednio oddziałujące z DNA cząsteczki wody stanowią integralną część struktury kwasu nukleinowego i ich usunięcie prowadzi do utraty struktury dwuniciowej. Jest to tzw. „wewnętrzna” pierwsza warstwa hydratacyjna, która nie ulega krystalizacji i nie tworzy lodu podczas obniżania temperatury poniżej 0 °C ⁶³.

Liczba cząsteczek wody związanych bezpośrednio z DNA, lepiej niż liczba wszystkich cząsteczek wody w pierwszej warstwie hydratacyjnej, odzwierciedla zależność stopnia uwodnienia DNA od jego sekwencji i konformacji. Uzyskana za pomocą symulacji dynamiki molekularnej ⁷⁵ różnica pomiędzy A- i B-DNA wynosi 1 – 2 cząsteczki. Jest to zgodne z badaniami relaksacji dielektrycznej, z których wynika, że 18 – 19 cząsteczek silnie oddziałuje z B-DNA, natomiast 13 – 15 z A-DNA ⁷⁶. Ponadto zauważono, że sekwencje bogate w pary GC, które przyjmują formę A-DNA wiążą ok. 18.5 cząsteczek wody na parę. B-DNA bogate w pary AT posiada ok. 20 związanych cząsteczek wody ⁶⁶.

Przy wilgotności poniżej 60 % częściowo hydratowane są atomy tlenu z wiązań fosfodiesterowych i furanozy (O₄). Ponadto z uzyskanych na temat pierwszej warstwy hydratacyjnej danych spektroskopowych ⁶² wiadomo, że

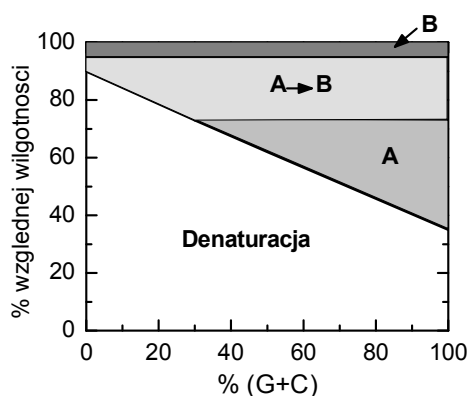
przy wilgotności względnej poniżej 65 % hydratacji ulega także tlen z grup fosforanowych w DNA, gdzie adsorbuje 5-6 cząsteczek wody na jeden nukleotyd. Przy wilgotności względnej powyżej 65 % zachodzi hydratacja funkcjonalnych grup aminowych, iminowych i ketonowych zasad, co wiąże się z przyłączeniem kolejnych 8-9 cząsteczek wody. Pierwsza warstwa hydratacyjna DNA jest kompletna, czyli zawiera ok. 20 cząsteczek wody wtedy, gdy wilgotność względna osiąga 80 %.

W warunkach wysokiej aktywności wody (małe stężenie soli) wszystkie funkcjonalne grupy: fosforanowe, zasadowe i cukrowe są otoczone monowarstwą hydratacyjną, która stabilizuje formę B-DNA. W przypadku długich sekwencji AT, „grzbiet” złożony z cząsteczek wody przebiega wzdłuż małej bruzdy i dodatkowo stabilizuje taką konformację. Zredukowanie aktywności wody powoduje, że hydratacja atomów zasad i cukrów ulega zniszczeniu i tylko bardziej polarne grupy fosforanowe są nadal hydratowane. Taka zmiana powoduje przejście B→A. Forma A-DNA jest stabilizowana przez łańcuchy cząsteczek wody biegnące pomiędzy przeciwnie położonymi atomami tlenu grup fosforanowych i łączące dużą bruzdę. Podniesienie aktywności wody powoduje zwiększenie hydratacji podwójnej helisy DNA i ponowne przejście A→B^{77,78}.

Wykazano⁷⁹ ponadto, że przejście pomiędzy formami B→A jest niemożliwe, gdy DNA zawiera mniej niż 30% par GC w swoim składzie niezależnie od stopnia wilgotności DNA, ale wzrost zawartości GC powoduje wzrost prawdopodobieństwa zmiany konformacji w odpowiednich warunkach, jak pokazano na Rysunku 5.

Cząsteczki wody silnie związane z DNA mają znacznie zredukowaną ruchliwość i zajmują ściśle zdefiniowane miejsca hydratacji w małym i dużym rowku oraz wokół grup fosforanowych^{52, 57-59}. Od dawna znana jest teoria na temat obecności „grzbietu hydratacji” złożonego z pojedynczych cząsteczek wody położonych wzdłuż bardzo wąskiej małej bruzdy w sekwencji d(CGCGAATTCGCG)₂^{53, 80}. Późniejsze badania tego zjawiska w wyższej rozdzielczości⁵⁶ potwierdziły jego istnienie, ale dodatkowo pojawiło się prawdopodobieństwo, że niektóre z obserwowanych cząsteczek wody mogą w rzeczywistości być jonami sodu, które zastępują wodę. Ponadto podobnie dobrze zorganizowane miejsca hydratacji wzdłuż małej bruzdy zostały zlokalizowane w innych sekwencjach⁸¹. Zidentyfikowano również

pentagonalne ułożenie cząsteczek wody w dużej bruzdzie A-DNA^{55, 82} oraz tzw. „stożki hydratacji” z trzema cząsteczkami wody ułożonymi tetraedrycznie wokół każdego z tlenów grup fosforanowych w B-DNA³³.



Rysunek 5. Diagram pokazujący zmiany konformacji DNA o różnej zawartości par GC w zależności od wilgotności względnej. Przy wilgotności powyżej 95 % istnieje tylko forma B-DNA, która w zakresie 95-73 % wilgotności przechodzi w A-DNA. Poniżej 73 % obserwowana jest tylko forma A, przy czym musi być spełniony dodatkowy warunek, czyli zawartość par GC powyżej 30 %, aby zapobiec denaturacji DNA⁷⁹.

Jak wykazały badania, jony, które znajdują się w otocze hydratacyjnej DNA nie powodują jego dehydratacji, jak uważano wcześniej³³. Jony w pierwszej warstwie hydratacyjnej DNA nie zastępują, ale przesuwają bądź reorientują cząsteczki wody. Ich główny wpływ na aktywność wody polega na redukcji ruchliwości wody, a nie liczby cząsteczek wody⁸³. Stabilizacja konformacji A-DNA bogatej w pary GC w roztworach o wysokich stężeniach soli, obserwowana eksperymentalnie¹ jest interpretowana, jako to samo zjawisko, co preferencja DNA do przyjmowania konformacji A przy zredukowanej wilgotności i w rozpuszczalnikach organicznych¹. Metody symulacji komputerowych sugerują jednak, że efekt jonów wynika z odmiennego zjawiska, które powoduje bardzo specyficzne zmiany struktury warstwy hydratacyjnej DNA, która faworyzuje konformację A- lub B-DNA⁷⁵.

5.3 Wpływ osmolitów na stabilność DNA

Organizmy żywe przystosowują się do ekstremalnych warunków środowiska poprzez akumulowanie określonych substancji organicznych, znanych jako osmolity. Duże stężenia tych związków w komórkach organizmu

pozwała na utrzymanie na odpowiednio wysokim poziomie ciśnienia osmotycznego w cytoplazmie i wpływa na stabilność i aktywność cząsteczek biologicznych⁸⁴⁻⁸⁷. Osmolity pochodzenia naturalnego można podzielić zasadniczo na trzy grupy związków: poliole (np. glicerol, mannitol), wolne aminokwasy i ich pochodne (np. tauryna, β -alanina) oraz mocznik i metyloaminy (np. TMAO, *N,N,N*-trimetyloglicyna, *N*-metyloglicyna). Poliole występują w komórkach alg, prostych roślin oraz wielu owadów, które są narażone na działanie ekstremalnie niskich temperatur. Aminokwasy i ich pochodne są głównie akumulowane w komórkach halofilnych bakterii, bezkręgowców morskich oraz śluzic atlantyckich. TMAO i metyloglicyny natomiast występują w organizmach morskich, które akumulują mocznik, jako ważny produkt metabolizmu azotu^{88,89}.

Wpływ osmolitów na kwasy nukleinowe znany jest częściowo za sprawą badań prowadzonych nad czynnikami poprawiającymi wydajność oraz specyficzność reakcji PCR⁹⁰⁻⁹⁶. Jednakże pomimo tego, że wpływ osmolitów na kwasy nukleinowe i ich kompleksy z białkami jest znany i ma wiele zastosowań w badaniach *in vitro* oraz ma ogromne znaczenie *in vivo*⁹⁷⁻¹⁰³, nadal nie wiadomo zbyt dużo o molekularnych podstawach obserwowanych efektów.

5.3.1 Glicyna i jej *N*-metylo pochodne

Zarówno glicyna, jak i jej *N*-metylowe pochodne w warunkach neutralnego pH występują w formie jonów obojnych. Powodują one, że temperatura termicznego rozpadu dwuniciowego DNA (dsDNA) spada liniowo wraz ze wzrostem stężenia *N*-metylowych pochodnych glicyny w roztworze¹⁰⁴⁻¹⁰⁷. Ułatwienie przejścia formy dwuniciowej do jednoniciowej DNA wiąże się z preferowanym oddziaływaniem i akumulacją na powierzchni jednoniciowego DNA, która staje się dostępna w wyniku denaturacji^{108, 109}. Zdolność do gromadzenia się pochodnych glicyny na powierzchni ssDNA maleje wraz ze wzrostem liczby grup metylowych zastępujących protony aminowe w cząsteczce glicyny. Trend ten można przypisać zdolności glicyny do tworzenia silnych wiązań wodorowych z zasadami wyeksponowanymi w czasie denaturacji DNA. Glicyna i *N*-metyloglicyna są akceptorami i donorami wiązań wodorowych podczas, gdy *N,N,N*-trimetyloglicyna jest tylko ich akceptorem¹¹⁰.

Glicyna, *N*-metyloglicyna oraz *N,N,N*-trimetyloglicyna nie wykazują preferencji do lokalnej akumulacji wokół jednoniciowego DNA w stosunku do pozostałej części roztworu. Jednakże można zauważyć taką akumulację w otoczeniu ssDNA w porównaniu do dwuniciowego DNA. Ponadto widoczny jest jej wzrost następujący wraz ze wzrostem zawartości par GC w DNA. Zależność ta została zaobserwowana dla wszystkich *N*-metylowanych glicyn, co świadczy o silniejszym powinowactwie tych osmolitów do par zasad GC¹¹⁰. Ze względu na preferowane oddziaływanie tych osmolitów z zasadami G oraz C na powierzchni jednoniciowego DNA, są one specyficznymi denaturantami fragmentów DNA bogatych właśnie w te pary¹⁰⁸.

Hong¹⁰⁸ przeprowadził badania z których wynika, że dodatek *N,N,N*-trimetyloglicyny do roztworu powoduje znaczny wzrost potencjału chemicznego (μ) znajdującego się w nim DNA. Oznacza to, że lokalne stężenie *N,N,N*-trimetyloglicyny w sąsiedztwie dwuniciowej helisy jest dużo mniejsze niż w pozostałej części roztworu. Taki niejednorodny podział *N,N,N*-trimetyloglicyny zachodzi głównie dlatego, że zarówno cząsteczki *N,N,N*-trimetyloglicyny, jak i DNA preferują oddziaływanie z wodą bardziej niż między sobą. Porównanie tych wyników z danymi uzyskanymi na temat oddziaływania *N,N,N*-trimetyloglicyny z różnymi białkami¹¹¹ pokazuje, że osmolit ten jest wykluczany przede wszystkim z anionowej powierzchni DNA tworzonej przez grupy fosforanowe¹¹².

Rees¹⁰⁴ jako pierwszy zauważył, że *N,N,N*-trimetyloglicyna powodując obniżenie temperatury denaturacji DNA jest jednocześnie czynnikiem izostabilizującym, czyli eliminującym zależność T_m od zawartości par guaninacytozyna (GC) w DNA nie wpływając przy tym na jego właściwości, jako polielektrolitu. Efekt izostabilizujący tego osmolitu jest tym większy im większa jest zawartość par GC w DNA. Ponadto nawet bardzo wysokie stężenie *N,N,N*-trimetyloglicyny ($5.6 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) w roztworze (w obecności 5 mM buforu fosforanowego o pH 7.5) nie zmienia konformacji B-DNA. Barone¹⁰⁵ kontynuował te badania pokazując, że zdolność do izostabilizacji przez *N*-metylowe pochodne glicyny wzrasta wraz ze wzrostem liczby grup metylowych na atomie azotu. *N,N,N*-trimetyloglicyna wywołuje największy efekt destabilizacji, natomiast najmniejszy efekt zaobserwowano w przypadku glicyny. Jest to zgodne z hipotezą, że czynniki, które w większym stopniu

zwiększają charakter hydrofobowy rozpuszczalnika, powodują większą destabilizację DNA ¹¹³.

Glicyna powoduje liniowy spadek wartości entalpii przejścia z formy dwuniciowej do jednoniciowej DNA wraz ze wzrostem jej stężenia w roztworze. Prawdopodobnie mechanizm jej wpływu na stabilność termiczną DNA jest zupełnie inny od pozostałych osmolitów będących jonami obojnaczymi. Glicyna podobnie, jak mocznik ¹¹⁴ konkuruje o wewnątrzcząsteczkowe wiązania wodorowe z wodą wypierając ją z dostępnych miejsc hydratacji i zmieniając w ten sposób energię solwatacji ¹⁰⁵.

N,N,N-trimetyloglicyna utrzymuje swoją zdolność zarówno do obniżania T_m DNA, jak i do niwelowania różnicy w temperaturze denaturacji pomiędzy fragmentami bogatymi w pary GC i AT nawet, gdy do roztworu dodana zostanie kadaweryna ⁸⁸. Kadaweryna jest poliaminą, która w warunkach naturalnych występuje w postaci dodatnio naładowanej cząsteczki i poprzez elektrostatyczne oddziaływania z DNA powoduje wzrost jego stabilności. W celu wyjaśnienia efektu izostabilizacji można posłużyć się hipotezą zaproponowaną przez Melchiora i von Hippela ¹¹³, którzy sugerowali, że substancje rozpuszczone o charakterze hydrofobowym wykazują tym silniejsze powinowactwo do makromolekuł im większe jest ich stężenie w roztworze. Wiele z tych związków, które mają odpowiedni rozmiar, może ulokować się w dużej bruzdzie dwuniciowego B-DNA i powodować preferencyjne, słabe i niekooperatywne oddziaływania hydrofobowe z grupami metylowymi tyminy wyeksponowanymi w dużej bruzdzie. To podnosi stabilność par AT, prawdopodobnie poprzez usunięcie cząsteczek wody, co powoduje wzmocnienie wiązań wodorowych pomiędzy zasadami w DNA. Podobne oddziaływania z parami GC są niemożliwe ze względu na brak grup metylowych. W ten sposób uzyskuje się zmniejszenie różnicy pomiędzy stabilnością par zasad AT i GC. Stężenie osmolitu przy, którym zanika różnica stabilności pomiędzy parami zasad GC i AT nazwane zostało „stężeniem izostabilizującym” ^{104, 105}.

Kadaweryna nie wpływa na efekt izostabilizacji wywołany przez *N,N,N*-trimetyloglicynę, co potwierdza hipotezę, że efekt ten jest wynikiem wiązania się osmolitu z DNA w dużej bruzdzie. Poliaminy są ligandami oddziałującymi z małą bruzdą DNA ¹¹⁵, zatem nie wpływają na wiązanie osmolitów w dużej bruzdzie. W dsDNA zasady purynowe i pirymidynowe

ułożone są wewnątrz struktury makrocząsteczki, co w dużej mierze zapobiega ich kontaktowi z rozpuszczalnikiem. Jednakże w stanie zdenaturowanym są one solwatowane w znacznie większym stopniu. W konsekwencji stan zdenaturowany DNA jest faworyzowany przez każdy czynnik, który powoduje wzrost hydrofobowości środowiska (rozpuszczalnik + osmolit). Mechanizm ten może tłumaczyć destabilizujący wpływ *N,N,N*-trimetyloglicyny na DNA. Zatem kadaweryna i *N,N,N*-trimetyloglicyna wpływają na DNA niezależnie od siebie, kadaweryna oddziałuje z DNA bezpośrednio, natomiast *N,N,N*-trimetyloglicyna oddziałuje na DNA poprzez wpływ na właściwości rozpuszczalnika⁸⁸.

Entalpia topnienia DNA w obecności *N,N,N*-trimetyloglicyny po przekroczeniu stężenia $0.75 \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ rośnie i staje się coraz silniej endotermiczna wraz z dalszym wzrostem stężenia osmolitu, zarówno w przypadku fragmentów DNA złożonych z p(dAdT), jaki i p(dGdC)^{116, 117}. Jednocześnie temperatura topnienia p(dGdC) maleje wraz ze wzrostem stężenia *N,N,N*-trimetyloglicyny w roztworze, podczas gdy stabilność polinukleotydu p(dAdT) się nie zmienia. Zmiany entalpii zaobserwowane dla p(dAdT) wskazują na to, że oddziaływania osmolitu z dwuniciowym polinukleotydem są kompensowane przez podobne oddziaływania z pojedynczą nicią, co skutkuje brakiem wpływu *N,N,N*-trimetyloglicyny na jego temperaturę denaturacji. Przy wyższych stężeniach osmolitu oddziaływania z dupleksem zaczynają dominować, co powoduje powstanie endotermicznego wkładu, który podwyższa entalpię topnienia. W związku z tym, że wzrost entalpii nie wpływa na stabilność polinukleotydu, prawdopodobnie towarzyszy mu wzrost entropii następujący w wyniku zmiany stężenia *N,N,N*-trimetyloglicyny.

Wzrost efektu endotermicznego towarzyszącego topnieniu p(dGdC) wiąże się ze spadkiem jego stabilności, który następuje wraz ze wzrostem stężenia *N,N,N*-trimetyloglicyny w roztworze. Takie zachowanie sugeruje, że *N,N,N*-trimetyloglicyna w mniejszym stopniu oddziałuje z parami GC w dwuniciowym polinukleotydzie, lub tworzy dużo więcej oddziaływań z jednoniciowym p(dGdC)¹¹⁶.

5.3.2 Mocznik i jego *N*-alkilowe pochodne

Wpływ pochodnych alkilowych mocznika na DNA nie został jeszcze zbadany. Sam mocznik podobnie jak glicyna powoduje spadek temperatury

denaturacji kwasów nukleinowych, który następuje liniowo wraz ze wzrostem stężenia tego osmolitu w roztworze ^{114, 118-120}. Mocznik jest donorem i akceptorem potencjalnych wiązań wodorowych, ale jest jednocześnie znacznie mniej polarny niż jony obojętne *N*-metylowanych glicyn. Destabilizuje on DNA ^{114, 118, 119, 121} jednak w przeciwieństwie do białek, DNA pozostaje nienaruszone nawet przy stężeniu 6 M mocznika w roztworze wodnym ^{118, 119}.

Dodanie mocznika do roztworu prawie wcale nie wpływa na potencjał chemiczny dwuniciowego DNA ¹⁰⁸. Wynika z tego, że lokalne stężenie mocznika w otoczeniu DNA jest prawie takie samo, jak w całym roztworze. Podobnie dzieje się w obecności kationów sodu i potasu oraz anionu chlorkowego, mocznik nie jest akumulowany ani wykluczany z ich otoczenia ¹²².

Mocznik powoduje powolny liniowy spadek wartości entalpii procesu przejścia DNA z formy dwuniciowej do jednoniciowej, który następuje wraz ze wzrostem stężenia osmolitu w roztworze. Postawiona została w związku z tym hipoteza ¹¹⁴, która zakłada, że zależność ΔH i temperatury denaturacji od stężenia mocznika wynika z jego preferencyjnego oddziaływania z zasadami DNA, co jest bardziej efektywne, gdy DNA jest w stanie zdenaturowanym.

Jedna z teorii zakłada, że w przeciwieństwie do pochodnych glicyny mocznik destabilizuje bardziej pary zasad AT niż GC ¹¹⁰. Poprzez silniejsze oddziaływania z adeniną i tyminą osmolit ten konkuruje z wodą o potencjalne miejsca tworzenia wiązań wodorowych wzdłuż DNA, co powoduje większą dehydratację par AT w stosunku do GC. Chalikian ⁶⁶ postulował, że woda jest silniej związana z fragmentami DNA złożonymi z par GC w dwuniciowym DNA. Nordstrom ¹¹⁰ zakładając, że podobnie dzieje się w przypadku jednoniciowego DNA i pary AT są słabiej hydratowane, stwierdził, że zjawisko to tłumaczy dużą akumulację mocznika w okolicach fragmentów ssDNA bogatych w pary AT. To natomiast jest przyczyną większej niestabilności bogatych w pary AT fragmentów dsDNA w obecności mocznika.

Druga teoria przedstawiona przez Babayana ¹¹⁸ zakłada, że wpływ mocznika na temperaturę DNA nie zależy od rodzaju par zasad tworzących kwasy nukleinowe. Mocznik uznawany jest za bardzo efektywny, ale niespecyficzny czynnik denaturujący kwasy nukleinowe ze względu na preferowane oddziaływania z polarnymi powierzchniami o charakterze

aminowym w cząsteczkach zasad (guaniny, cytozyny oraz tyminy i uracylu), które stają się dostępne w wyniku denaturacji¹⁰⁸.

Teorię tę potwierdzają symulacje z wykorzystaniem dynamiki molekularnej¹²³. Wykazują one, że mocznik powoduje utratę wiązań wodorowych łączących komplementarne pary zasad w RNA. Jednocześnie mocznik nie wykazuje preferencji w oddziaływaniach z konkretnymi zasadami, a jedynie z grupami aminowymi. Zatem destabilizacja RNA przez mocznik wynika z tworzenia wielu bezpośrednich wiązań wodorowych z zasadami oraz asocjacji z nimi.

Z dostępnych mi źródeł literaturowych wynika, że zostało wykonanych niewiele badań dotyczących oddziaływania mocznika z DNA w odróżnieniu do jego wpływu na białka.

5.3.3 Oddziaływania poliamin z DNA

Poliaminy to grupa małych alifatycznych związków organicznych, tj.: spermina, spermidyna, putrescyna i kadaweryna, które są naturalnie produkowane w komórkach organizmów eukariotycznych i prokariotycznych¹²⁴. Są to aminy biogenne, których stężenie zmienia się w trakcie cyklu komórkowego. Odgrywają one istotną rolę w regulacji komórkowej proliferacji, transformacji, różnicowaniu komórek oraz apoptozie i tumorogenezie. Biorą również udział w wielu innych procesach biologicznych, np. replikacji, transkrypcji, translacji, modyfikacjach potranslacyjnych, stabilizacji błon komórkowych i bramkowaniu kanałów jonowych¹²⁵⁻¹²⁸.

Poliaminy egzogenne i ich analogi są transportowane do komórek, a ich stężenie w płynach ustrojowych i tkankach może znacznie się podwyższyć, co jest wyznacznikiem wielu chorób, np. nowotworów, łuszczycy czy anemii sierpowatej^{129,130}.

W fizjologicznych warunkach w komórce grupy aminowe poliamin są protonowane, dzięki temu polikationy oddziałują z ujemnie naładowanymi cząsteczkami, tj.: DNA, RNA, białkami i fosfolipidami¹²⁶. Jednakże pomimo tak dużej roli jaką odgrywają w procesach komórkowych, ich dokładna funkcja fizjologiczna *in vivo* i mechanizm ich działania w proliferacji komórek ssaków pozostaje w dużej mierze niewyjaśniony.

Zostało udowodnione, że poliaminy stabilizują DNA podczas niekorzystnego działania temperatury, denaturacji zasadowej, rozkładu enzymatycznego, działania promieniowania oraz interkalacji przez barwniki aromatyczne¹³¹⁻¹³⁷. Mogą również odgrywać rolę w utrzymywaniu komórkowego DNA w odpowiednim upakowaniu oraz umożliwiać upakowanie DNA w główkach fagowych¹³⁸⁻¹⁴⁰.

Głównym celem oddziaływania poliamin ze względu na ich dodatni ładunek, jak wspomniano wcześniej, stają się ujemnie naładowane grupy fosforanowe DNA i RNA. Jednakże, pomimo wielu badań i obszernej literatury, nadal nie został sprecyzowany model ogólny zaproponowany przez Liquori¹¹⁵, dotyczący określenia pozycji i orientacji, w jakiej poliaminy wiążą się z DNA. Nie jest również zrozumiałe, w jaki sposób ograniczenia geometryczne podczas oddziaływań wpływają na strukturalne i mechaniczne zachowanie układu¹⁴¹.

W celu poznania mechanizmów oddziaływania poliamin oraz ich pochodnych z DNA i RNA *in vitro* przeprowadzono wiele badań z wykorzystaniem różnych technik, m.in.: dializy równowagowej, obrazowania NMR, dichroizmu kołowego, spektroskopii Ramana, spektroskopii FTIR, krystalografii, skaningowej kalorymetrii różnicowej oraz izotermicznej kalorymetrii miareczkowej¹⁴²⁻¹⁵⁶. Badania te pokazały, że spośród wielu różnych rodzajów oddziaływań biorących udział w interakcji poliamina-DNA, najsilniejsze są oddziaływania elektrostatyczne. Ponadto, na podstawie badań oddziaływania sperminy i spermidyny z DNA o różnej zawartości par zasad, wyciągnięto wniosek, że zachodzące interakcje są niezależne od budowy kwasu nukleinowego. Jednocześnie istnieje teoria, że wiązanie poliamin do DNA nie wywołuje znaczących zmian konformacyjnych w jego natywnej strukturze, jest ono niespecyficzne i może zachodzić bezpośrednio lub pośrednio przez wiązania wodorowe cząsteczek wody¹⁵². Rezultaty eksperymentów zostały potwierdzone przez zastosowanie teorii kondensacji polielektrolitów i przeciwjonów¹⁵⁷⁻¹⁶⁰, z których wynika, że niespecyficzne elektrostatyczne oddziaływania pomiędzy grupami fosforanowymi DNA i polikationami utrzymują kationy w cienkiej skondensowanej warstwie blisko powierzchni DNA. Z drugiej strony, wyniki badań krystalograficznych wskazują na to, że poliaminy zajmują tylko ściśle określone miejsca w strukturze A-DNA, Z-DNA oraz tRNA^{8, 161-163}. Wysokie powinowactwo poliamin do form DNA innych niż

B-DNA może wskazywać na to, że zarówno struktura drugorzędowa, jak i skład par zasad DNA mogą determinować rozpoznanie poliamin.

Mimo, że istnieje wiele doniesień, natura oddziaływań poliamin z DNA i następujące w ich konsekwencji zmiany konformacyjne budzą nadal zainteresowanie i są celem kolejnych poszukiwań.

6 Cel i zakres pracy

Przedstawiony przegląd literaturowy na temat wpływu osmolitów na DNA stał się podstawą i inspiracją do badań zrealizowanych w ramach niniejszej pracy. Przede wszystkim należy zauważyć, iż mimo mnogości badań przeprowadzonych w celu poznania roli oraz mechanizmów działania osmolitów na komponenty komórkowe organizmów żywych, w których osmolity naturalnie występują, stosunkowo niewiele jest prac poświęconych układom zawierającym DNA.

Jedną z grup osmolitów jaką są metylowe pochodne glicyny jest stabilizator białek. Zostały one zaklasyfikowane do tzw. osmolitów kompatybilnych, czyli takich, które nie oddziałują szkodliwie na biocząsteczki w warunkach fizjologicznych. Pomimo takich właściwości powodują one obniżenie stabilności termicznej DNA. Niestety, nie istnieje jednoznaczna i spójna teoria, która tłumaczyłaby mechanizm tego zjawiska.

W grupie alkilowych pochodnych mocznika dostępnych jest niewiele informacji dotyczących kwestii ich oddziaływania na biocząsteczki. Jednocześnie nie udało mi się znaleźć żadnych danych dotyczących ich wpływu na DNA. Znacznie większe zainteresowanie budzi działanie samego mocznika zarówno na białka, jak i kwasy nukleinowe. Jest on jednoznacznie uznawany za osmolit destabilizujący DNA ze względu na zdolność do obniżania jego temperatury denaturacji.

Uogólniając stan wiedzy w przedstawionym obszarze, wciąż istnieje zapotrzebowanie na stworzenie spójnej teorii, która określałaby molekularny mechanizm procesów zachodzących w układach DNA-woda-osmolit. Tematyka niniejszej pracy wpisuje się w nurt tak ukierunkowanych poszukiwań. Stanowią one także uzupełnienie prac prowadzonych w Katedrze dotyczących wpływu wybranych grup osmolitów na białko. Na podstawie tych badań nie ulega wątpliwości fakt, że obecność buforu w roztworze modyfikuje zachowanie się białka często w wyższym stopniu niż sam osmolit. Należało zatem oczekiwać również silnego wpływu buforu na zachowanie się DNA w roztworze. Celem poznania interakcji osmolit-DNA należałoby poddać badaniom roztwory pozbawione obecności buforów. Według mojej wiedzy brakuje badań na temat DNA w roztworach nie buforowanych. Obecność buforów jest natomiast w literaturze zupełnie ignorowana w dyskusji oddziaływania z osmolitami.

Szeroko pojętym celem niniejszej pracy była próba zaproponowania niektórych aspektów molekularnego mechanizmu wpływu osmolitów, metylo pochodnych glicyny oraz alkilopochodnych mocznika, na strukturę i stabilność DNA w nie buforowanych roztworach wodnych.

Zakres realizacji poszczególnych celów obejmował:

1. Wykonanie pomiarów oraz przeprowadzenie analizy chemometrycznej widm FTIR w układach DNA-woda-osmolit, celem uzyskania informacji na temat zmian strukturalnych w cząsteczce DNA wywołanych obecnością osmolitu w roztworze oraz zweryfikowania sposobu oddziaływania osmolitów z DNA w aspekcie oddziaływań bezpośrednich i pośrednich.
2. Wykonanie pomiarów kalorymetrycznych DSC celem określenia wpływu osmolitów na stabilność termiczną DNA w roztworach wodnych oraz potwierdzenia słuszności wyboru do badań układów nie buforowanych.
3. Wykonanie pomiarów kalorymetrycznych ITC, celem określenia globalnego efektu cieplnego towarzyszącego oddziaływaniu poszczególnych osmolitów z DNA oraz komponentów entalpowych, które współtworzą ten efekt.
4. Wykonanie obliczeń teoretycznych DFT w układach DNA-woda oraz DNA-osmolit, celem określenia wpływu wybranych osmolitów na moc wiązań wodorowych pomiędzy komplementarnymi zasadami DNA, będących jednym z głównych czynników stabilizujących strukturę helikalną tej makrocząsteczki.

7

Materiały i metodyka badawcza

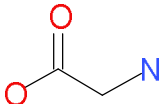
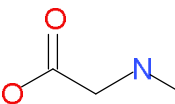
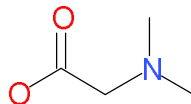
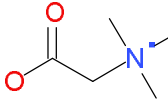
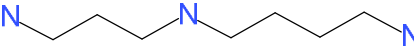
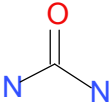
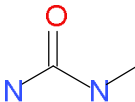
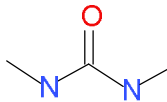
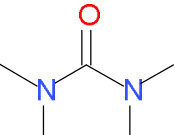
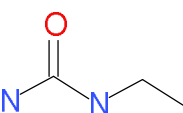
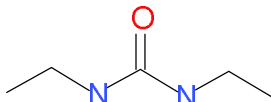
7.1 Materiały

7.1.1 DNA genomowe

Sól sodowa kwasu deoksyrybonukleinowego (Sigma – Aldrich) – zakupiony preparat DNA z grasicy cielęcej (ctDNA) dostarczony był w formie zliofilizowanych włókien.

7.1.2 Osmolity

Tabela 2. Uprozczone wzory strukturalne badanych osmotów.

Glicyna	<i>N</i>-metyloglicyna	<i>N,N</i>- dimetyloglicyna
		
<i>N,N,N</i>-trimetyloglicyna	Spermidyna	
		
Mocznik	<i>N</i>-metylomocznik	<i>N,N'</i>- dimetylomocznik
		
<i>N,N,N',N'</i>- tetrametylomocznik	<i>N</i>-etylomocznik	<i>N,N'</i>- dietylomocznik
		

Glicyna (99 %, Sigma – Aldrich)
N-metyloglicyna (NMG, 99 %, Sigma – Aldrich)
N,N-dimetyloglicyna (DMG, 98 %, Sigma – Aldrich)
N,N,N-trimetyloglicyna (TMG, 99 %, Sigma – Aldrich)
 Mocznik (98 %, Sigma – Aldrich)
N-metylomocznik (NMM, >97 %, Fluka)
N,N'-dimetylomocznik (DMM, 98 %, Sigma – Aldrich)
N,N,N',N'-tetrametylomocznik (TMM, 99 %, Fluka)
N-etylomocznik (NEM, 98 %, Fluka)
N,N'-dietylomocznik (DEM, 97 %, Sigma – Aldrich)
 Spermidyna (≥ 99 %, Sigma – Aldrich)

7.1.3 Odczynniki

Dejonizowana woda ($\kappa < 0.10 \text{ S} \cdot \text{cm}^{-1}$)
 Chlorek sodu (NaCl, ≥ 99 %, POCh)
 Chlorek tetrabutylamoniowy (TBACl, ≥ 99 %, Sigma – Aldrich)
 Fosforan sodu jednozasadowy monohydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, >99 %, Sigma)
 Fosforan sodu dwuzasadowy dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, >98.5 %, Sigma)

7.1.4 Przygotowanie roztworów do analizy FTIR

Roztwór osmolitu

Tabela 3. Zakres stężeń badanych osmolitów.

Osmolit	$c \text{ [mol dm}^{-3}\text{]}$
Glicyna	0 – 2.0
<i>N</i> -metyloglicyna	0 – 5.5
<i>N,N</i> -dimetyloglicyna	0 – 5.5
<i>N,N,N</i> -trimetyloglicyna	0 – 3.5
Mocznik	0 – 7.0
<i>N</i> -metylomocznik	0 – 7.0
<i>N,N'</i> -dimetylomocznik	0 – 5.5
<i>N,N,N',N'</i> -tetrametylomocznik	0 – 3.0
<i>N</i> -etylomocznik	0 – 1.4
<i>N,N'</i> -dietylomocznik	0 – 1.4
Spermidyna	0 – 1.0

Roztwory osmolitu przygotowywałam w ilości zależnej od potrzeb, bezpośrednio przed każdym eksperymentem. Odważoną ilość wybranej substancji rozpuszczałam w wodzie dejonizowanej, aby uzyskać roztwór o określonym stężeniu. Klarowny roztwór był każdorazowo odgazowywany z użyciem eksykatora próżniowego i mieszadła magnetycznego. Wybrane osmolity badane były w zakresie stężeń przedstawionym w Tabeli 3.

Roztwór DNA w wodzie

Roztwory DNA przygotowywałam wagowo. Odważoną próbkę DNA w wodzie dejonizowanej mieszałam za pomocą jałowej końcówki pipety automatycznej i pozostawiałam na 24 h w temperaturze 4 °C w celu rozpuszczenia DNA. Po upływie tego czasu roztwór ponownie mieszałam i odwirowywałam, aby uzyskać jednolity żel, który wykorzystywałam do pomiarów. Sporządzałam roztwory o stężeniu 8 % wagowych DNA, optymalnym do pomiarów.

Roztwór DNA w obecności osmolitu

Wodne roztwory DNA w obecności osmolitu przygotowywałam z wykorzystaniem przyrządzonych wcześniej roztworów wyjściowych glicyny, mocznika i ich *N*-alkilowych pochodnych, w przedstawionym w Tabeli 3 zakresie stężeń. Roztwór przygotowywałam tak, aby stężenie wagowe DNA każdorazowo wynosiło 8 %.

7.1.5 Przygotowanie roztworów do badań kalorymetrycznych ITC

Roztwór wyjściowy osmolitu

Roztwory osmolitów przygotowywałam w ilości zależnej od potrzeb, bezpośrednio przed każdym eksperymentem. Odważoną ilość wybranej substancji rozpuszczałam w wodzie dejonizowanej, aby uzyskać roztwór o określonym stężeniu. Stężenie każdego osmolitu przygotowywałam tak, aby w eksperymencie po miareczkowaniu uzyskać odpowiedni stosunek liczby cząsteczek badanego związku do liczby grup fosforanowych w roztworze DNA. Proporcje te były dobrane tak, aby zachować warunki eksperymentalne z badań prowadzonych z wykorzystaniem spektroskopii FTIR.

Roztwór wyjściowy DNA

Roztwory DNA przygotowywałam przed pomiarem, poprzez rozpuszczenie odważonych wcześniej włókien soli sodowej DNA w wodzie dejonizowanej. Uzyskaną próbkę DNA mieszałam za pomocą jałowej końcówki pipety automatycznej i pozostawiałam na 24 h w temperaturze 4 °C w celu rozpuszczenia DNA. Po upływie tego czasu roztwór mieszałam i odwirowywałam, aby uzyskać jednolitą ciecz, którą wykorzystywałam do pomiarów. Sporządzałam roztwory tak, aby po miareczkowaniu uzyskać stężenie końcowe DNA równe 1 mg·ml⁻¹.

Roztwory wyjściowe związków pomocniczych

Roztwory związków pomocniczych, czyli NaCl i TBACl, przygotowywałam w wodzie dejonizowanej. Stężenie każdego z nich dostosowałam do potrzeb eksperymentu, tak aby liczba cząsteczek danej substancji w roztworze odpowiadała liczbie grup fosforanowych DNA zawartych w badanym roztworze.

7.1.6 Przygotowanie roztworów do badań mikrokalorymetrycznych DSC

Roztwór wyjściowy osmolitu

Roztwory osmolitów przygotowywałam analogicznie, jak w eksperymentach kalorymetrycznych ITC.

Roztwór wyjściowy DNA

Roztwory DNA przygotowywałam przed pomiarem, poprzez rozpuszczenie odważonych wcześniej włókien soli sodowej DNA w wodzie dejonizowanej. Uzyskaną próbkę DNA mieszałam za pomocą jałowej końcówki pipety automatycznej i pozostawiałam na 24 h w temperaturze 4 °C w celu rozpuszczenia DNA. Po upływie tego czasu roztwór mieszałam i odwirowywałam, aby uzyskać jednolitą ciecz, którą wykorzystywałam do pomiarów. Sporządzałam roztwory o stężeniu DNA równym 1 mg·ml⁻¹, optymalnym do pomiarów.

Roztwór DNA w obecności osmolitu

Wodne roztwory DNA w obecności osmolitu przygotowywałam z wykorzystaniem przyrządzonych wcześniej roztworów wyjściowych glicyny, mocznika i ich *N*-alkilowych pochodnych, w przedstawionym w Tabeli 3 zakresie stężeń. Roztwór przygotowywałam tak, aby stężenie DNA każdorazowo wynosiło $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$.

7.2 Aparatura badawcza

Widma FTIR badanych roztworów mierzyłam za pomocą spektrometru FTIR Nicolet 8700 firmy Thermo Electron Co. We wszystkich pomiarach zastosowałam jednodobiciową przystawkę ATR (attenuated total reflection) wyposażoną w diamentowy kryształ. Każde widmo było średnią z 256 lub 512 skanów, wykonanych w rozdzielczości 2 cm^{-1} , w zakresie $4500 - 550 \text{ cm}^{-1}$. Spektrometr wraz z przystawką były przedmuchiwany azotem, aby usunąć z układu parę wodną oraz ditlenek węgla. Temperatura w trakcie pomiarów była kontrolowana z wykorzystaniem termostatu elektrycznego (Specac Inc.) i utrzymywana na stałym poziomie, $25.0 \pm 0.1 \text{ }^\circ\text{C}$.

Pomiary kalorymetryczne wykonałam z wykorzystaniem izotermicznego mikrokalorymetru miareczkowego Nano-Isothermal Titration Calorimeter III firmy Calorimetry Sciences Corp. oraz skaningowego mikrokalorymetru różnicowego Nano-Differential Scanning Calorimeter III (TA Instruments).

Mikrokalorymetr DSC wyposażony jest w dwie kapilarne celki pomiarowe o pojemności 0.33 ml . W celce referencyjnej każdorazowo znajdował się wodny roztwór osmolitu (lub bufor fosforanowy z dodatkiem chlorku sodu). W celce reakcyjnej umieszczałam w zależności od potrzeb: wodny roztwór osmolitu (lub bufor fosforanowy z chlorkiem sodu), przy pomiarach linii buforowych albo DNA w wodnym roztworze osmolitu (lub w buforze fosforanowym z chlorkiem sodu), przy właściwych pomiarach. Skanowanie odbywało się w zakresie temperatur $10 - 100 \text{ }^\circ\text{C}$, z szybkością $1 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, przy stałym ciśnieniu 3 atmosfer. Pomiar linii buforowych obejmował pięć cykli skanowania (na jeden cykl składa się równoważenie 1200 s , grzanie od 10 do $100 \text{ }^\circ\text{C}$, ponowne równoważenie 600 s i chłodzenie do $10 \text{ }^\circ\text{C}$), natomiast pomiar właściwy, dwa pełne cykle skanowania. Dane kalorymetryczne przekazywane do komputera zsynchronizowanego z mikrokalorymetrem są przedstawiane w skali mocy grzania w funkcji temperatury.

Kalorymetr ITC składa się z dwóch celki o pojemności 1 ml każda. Są to celki: reakcyjna, w której umieszczalam roztwór badanej substancji oraz celka odniesienia, gdzie znajdowała się woda. Ponadto w pomiarach wykorzystywana była precyzyjna biureta o pojemności 250 μl przy pomocy, której miareczkowany był roztwór osmolitu. Objętość jednej porcji titranta wynosiła 10 μl . Dozowanie rozpoczynało się każdorazowo po 2000 s równoważenia. Pomiaru wykonywane były przy stałej temperaturze 25 °C. Poszczególne porcje roztworu osmolitu były automatycznie dozowane co 300 s. Mieszanina reakcyjna była przez cały czas trwania eksperymentu mieszana z prędkością 250 obr./min za pomocą wyprofilowanej końcówki biurety. W czasie trwania eksperymentu w celce odniesienia utrzymywana była stała temperatura. Natomiast w celce pomiarowej, w zależności od efektu termicznego reakcji, temperatura spadała (reakcja endotermiczna) lub podnosiła się (reakcja egzotermiczna) w stosunku do celki referencyjnej. W wyniku tego dodatkowy element kontrolny kompensował różnicę temperatur pomiędzy celkami dostarczając lub odprowadzając z celki pomiarowej ciepło odpowiadające entalpii przemiany¹⁶⁴⁻¹⁷³. Moc użyta do osiągnięcia tego stanu była monitorowana i zapisywana w funkcji czasu przez komputer zsynchronizowany z mikrokalorymetrem.

Wszystkie próbki przygotowywałam wagowo z wykorzystaniem wagi analitycznej, z dokładnością do 10^{-5} g.

Odczyn pH wszystkich roztworów kontrolowałam za pomocą pH-metru firmy Schott, wyposażonego w mikroelektrodę szklaną.

7.3 Specjalistyczne oprogramowanie komputerowe

Do rejestracji i wstępnej obróbki widm FTIR wykorzystalam program *OMNIC 7.3* firmy *Thermo Electron Corp.*. Analizę widm przeprowadziłam z użyciem programu *Grams/AI 8.0* (*Thermo Electron Corp.*) oraz programu *Yanusz* (autorstwa Pierre Laudet), pracującego pod kontrolą pakietu *Grams/AI*. Środowisko obliczeniowe *MATLAB 7.1* (*MathWorks*) zostało wykorzystane do przeprowadzenia analizy chemometrycznej danych widmowych z użyciem skryptów autorstwa Piotra Bruździaka.

Do rejestracji i obróbki danych kalorymetrycznych wykorzystane zostały programy *Nano DSC Run 4.0* oraz *NanoAnalyze 2.1* firmy *TA Instruments*.

Część analizy danych kalorymetrycznych została przeprowadzona w ramach programu *Grams/AI 8.0*.

Dane wejściowe do obliczeń DFT oraz wizualizację wyników przygotowałam z użyciem pakietu *HyperChem 8.0*. Obliczenia wykonałam przy użyciu standardowego pakietu *Gaussian 03*. Były one prowadzone na komputerach Centrum Informatycznego Trójmiejskiej Akademickiej Sieci Komputerowej w ramach klasterów *Holk* i *Galera*.

7.4 Metodyka pomiarowa widm FTIR

7.4.1 Wprowadzenie

Spektroskopia w podczerwieni pozwala na uzyskanie wielu różnych informacji na temat DNA. Umożliwia, na przykład, określenie geometrii cząsteczki kwasu deoksyrybonukleinowego poprzez wykorzystanie charakterystycznych dla danej konformacji DNA pasm markerowych, które określane są przez konkretną liczbę falową i intensywność absorpcji. Śledzenie pasm przypisanych do danej struktury DNA pozwala na badanie wywołanych różnymi czynnikami zewnętrznymi zmian konformacji helisy DNA pomiędzy formami A, B, C i Z oraz określenie zawartości danej struktury w badanej próbce na podstawie intensywności absorpcji charakterystycznych pasm^{174 175}. Spektroskopia IR umożliwia również badanie form jedn-, dwu- oraz trzyniciowych DNA, przemian jakie zachodzą pomiędzy wymienionymi strukturami i czynników, które je determinują^{176 177}.

Technika spektroskopii IR pozwala obserwować zmiany jakie zachodzą w kwasach nukleinowych pod wpływem oddziaływania z różnymi związkami, na przykład jonami metali¹⁷⁸, czy cząsteczkami organicznymi¹⁷⁹. Analizę miejsc oddziaływań oraz stopnia zmiany struktury DNA ułatwia metoda widm różnicowych.

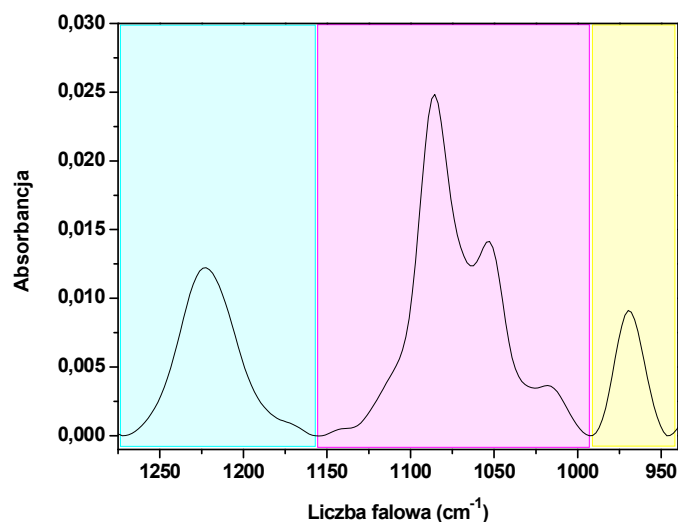
Metoda widm FTIR umożliwia także badanie oddziaływania DNA z rozpuszczalnikiem. Dużą część publikacji w tym zakresie stanowią prace poświęcone zmianom zachodzącym w widmie DNA w funkcji wilgotności próbki⁶². Interesująca jest również możliwość obserwowania zmian wywołanych dehydratacją DNA, co zbadał m. in. Tsuboi¹⁸⁰. Scharakteryzował on te zmiany i udowodnił, że częściowo są one podobne do zmian, które

zachodzą w widmie DNA w roztworze podczas termicznej denaturacji, działania deoksyrybonukleazy lub formamidu.

7.4.2 Widmo DNA w podczerwieni

Widmo DNA w podczerwieni pozwala na uzyskanie wielu informacji na temat jego struktury. W widmie takim można wyróżnić dwa główne obszary absorpcji. Pierwszy obszar znajduje się w zakresie częstości $1300-950\text{ cm}^{-1}$ i zlokalizowane są w nim pasma charakterystyczne dla grup fosforanowych w DNA. Zakres pasm charakterystycznych głównie dla wiązań karbonylowych zasad nukleinowych odpowiada przedziałowi $1800-1500\text{ cm}^{-1}$.

W badaniach analizie poddałam zakres $1270-900\text{ cm}^{-1}$, w którym obserwujemy pasma powstające w wyniku drgań cukier – grupa fosforanowa oraz drgań reszt cukrowych. Pozostały zakres widma DNA w wodzie zwykłej został pominięty ze względu na zbyt dużą w tym obszarze absorpcję grup karbonylowych badanych osmotów. Wybrany zakres został podzielony na trzy części, z których każda analizowana jest osobno i w każdej z nich zawarte są charakterystyczne pasma DNA (Rysunek 6).



Rysunek 6. Widmo FTIR ctDNA z uwzględnieniem trzech analizowanych zakresów.

Pierwszy badany obszar $1275-1155\text{ cm}^{-1}$ zawiera pasmo 1222 cm^{-1} odpowiadające antysymetrycznym drganiom rozciągającym grup PO_2^- , które jest także głównym markerem formy B-DNA¹⁸¹. Kolejny badany obszar $1155-$

990 cm^{-1} obejmuje dwa ważne pasma DNA. Pasma 1086 cm^{-1} związane jest z symetrycznymi drganiami rozciągającymi grupy PO_2^- w szkielecie DNA^{181, 182}, natomiast pasmo 1053 cm^{-1} związane jest z występowaniem drgań rozciągających wiązań C-O reszt deoksyrybozy¹⁸². Ostatni z analizowanych zakresów 990-945 cm^{-1} zawiera jedno istotne pasmo, charakterystyczne dla formy B-DNA, singlet przy 970 cm^{-1} , który pojawia się jako wynik drgań rozciągających wiązań C-C w szkielecie DNA¹⁸¹.

7.4.3 Wstępne opracowanie widm

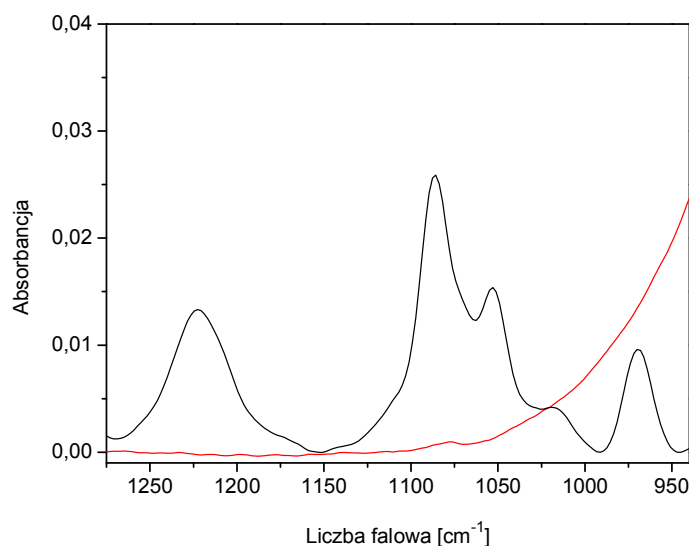
Przed właściwą analizą widm trzeba poddać je wstępnej obróbce. Po pierwsze należy wyeliminować wpływ pary wodnej. Nieusunięcie udziału absorpcji pary wodnej w widmie DNA może powodować powstawanie sztucznych pasm, widocznych zwłaszcza po zwiększeniu rozdzielczości widma za pomocą dekonwolucji lub drugiej pochodnej. Podobne skutki mogą pojawić się, gdy pasma absorpcji pary wodnej zostaną odjęte od widma DNA niedokładnie. Wpływ widma pary wodnej zmniejsza się przepłukując aparat pomiarowy azotem. Wykonywałam także rejestrację widma pary wodnej przed właściwym pomiarem próbki, aby umożliwić późniejszą korekcję (odjęcie) na podstawie wizualnej oceny wyniku odejmowania.

Kolejną modyfikacją, jakiej poddawałam widma jest wygładzanie, które pozwala w pewnym stopniu usunąć szumy. Wygładzanie wybranych widm przeprowadziłam korzystając z algorytmu Savitzky-Golay z szerokością wygładzania 9 – 13 cm^{-1} przy zastosowaniu wielomianu trzeciego stopnia.

7.4.4 Usunięcie widma wody

Przed analizą widm niezbędne jest usunięcie udziału absorpcji wody zarówno z widm uzyskanych dla roztworów wodnych osmolitów oraz DNA, jak i widm roztworów wodnych DNA z osmolitami. Woda zwykła stosowana jako rozpuszczalnik pozwala na dokładną analizę widm DNA w zakresie 1250 – 800 cm^{-1} ponieważ w tym obszarze absorpcja wody wyrażona jest jako krzywa, która nie ma wpływu na widmo DNA przy dalszej analizie (Rysunek 7). Odjęcie widma wody zwykłej od widma DNA z osmolitem w środowisku wodnym pozwala więc uzyskać wyizolowane pasma charakterystyczne dla absorpcji DNA w zakresie grup fosforanowych wraz z pasmami badanych osmolitów w danym obszarze. Po usunięciu wpływu rozpuszczalnika z widm

roztworów wodnych osmolitów lub DNA uzyskujemy wyizolowane widma powyższych składników w roztworze wodnym.



Rysunek 7. Wyizolowane widmo wody (linia czerwona) w zakresie analizowanych pasm DNA (linia czarna).

7.4.5 Opracowanie widm IR pod kątem analizy prowadzącej do wyznaczenia „widm zaburzonych”

Widmo zaburzone DNA obecnością osmolitu w roztworze wodnym

W celu uzyskania wyizolowanego widma DNA zaburzonego przez osmolit należało uzyskać następujące serie stężeniowe widm oraz ich różnice (znak „prim” został użyty do oznaczenia wszystkich serii widm wykorzystanych do wyznaczenia widma zaburzonego DNA, natomiast znak „bis” do oznaczenia serii widm, które posłużyły do wyizolowania widm zaburzonych osmolitów obecnością DNA w roztworze):

W_{DNA-osmolit-H₂O} – seria stężeniowa widm DNA (stałe stężenie) w obecności osmolitu (zmiennie stężenie) w roztworze wodnym. Uzyskane widma są sumą udziałów widmowych wielu indywidualów: widma DNA niezaburzonego i zaburzonego przez osmolit, widma substancji

rozpuszczonej niezaburzonej i zaburzonej przez DNA, widma wody objętościowej, wody zaburzonej przez osmolit i wody zaburzonej przez DNA.

$W_{\text{osmolit-H}_2\text{O}}^?$ – seria stężeniowa widm osmolitu w roztworze wodnym.

Otrzymane w ten sposób widma są sumą udziałów widmowych: osmolitu, wody objętościowej i wody zaburzonej przez substancję rozpuszczoną.

$W_{\text{osmolit-H}_2\text{O}}^i$ – seria stężeniowa interpolowanych widm osmolitu w roztworze wodnym.

W_{osmolit}^i – seria stężeniowa interpolowanych widm osmolitu, pozbawionych udziału wody objętościowej.

$W_{\text{H}_2\text{O}}$ – widmo wody objętościowej (wody czystej).

$W_{\text{DNA-H}_2\text{O}}^?$ – seria widm DNA w obecności osmolitu o zmiennym stężeniu w roztworze wodnym, na którą składają się udziały widm DNA niezaburzonego i zaburzonego przez substancję rozpuszczoną oraz widm wody objętościowej i wody zaburzonej przez DNA. Seria ta pozbawiona jest udziału widmowego osmolitu oraz wody zaburzonej przez tę substancję.

$W_{\text{DNA}}^?$ – seria wyizolowanych widm DNA, na którą składają się udziały widmowe jedynie DNA niezaburzonego i zaburzonego przez osmolit.

Przeprowadzona przeze mnie analiza danych widmowych roztworów wodnych DNA w obecności osmolitu ($W_{\text{DNA-osmolit-H}_2\text{O}}^?$), wymagała dokładnego usunięcia z otrzymanych widm pasm charakterystycznych dla osmolitu oraz pasm wody w badanym zakresie. W tym celu zmierzyłam widma substancji rozpuszczonej w roztworze wodnym ($W_{\text{osmolit-H}_2\text{O}}^?$). Przygotowanie wszystkich roztworów metodą wagową umożliwiło mi dokonanie obliczeń stężeń badanego osmolitu w roztworze wodnym, jak również w roztworze z DNA. Dalej umożliwiło to interpolację widm osmolitu w roztworze wodnym do odpowiednich stężeń. Zgodnie z Rów. 1 uzyskane widma interpolowane (W_{osmolit}^i) były odejmowane ze współczynnikiem 1 od odpowiadających im widm DNA w obecności osmolitu. Podczas tych operacji założyłam, że kontur widma osmolitu zaburzonego przez DNA pokrywa się z konturem widma osmolitu niezaburzonego. Zgodność tego założenia potwierdziły późniejsze eksperymenty mające na celu wyizolowanie widm osmolitów zaburzonych

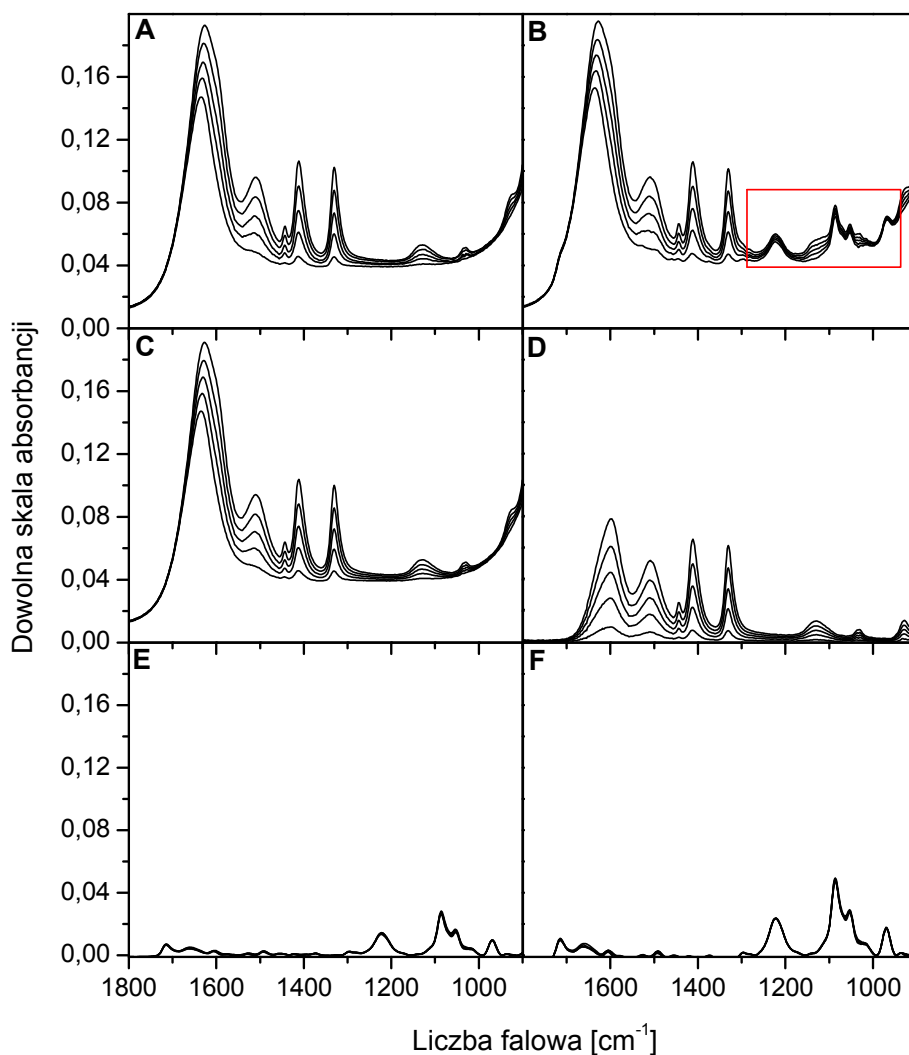
przez DNA. Przyjęłam również, że widma zawierające udział osmolitu nie zawierają już udziału wody zaburzonej przez osmolit.

$$W'_{DNA-H_2O} = W'_{DNA-osmolit-H_2O} - W'^i_{osmolit}$$

(Rów. 1)

W uzyskanej w wyniku tych operacji serii widm pozostaje jeszcze udział wody objętościowej oraz wody zaburzonej przez DNA, które należy usunąć. W tym celu przyjęłam przybliżenie, iż kształt widma wody zaburzonej przez DNA jest wystarczająco zbliżony do kształtu widma wody objętościowej, aby oba te indywidualia zostały usunięte w procesie odejmowania widma wody objętościowej. Współczynnik odejmowania dobierany był na podstawie oceny wizualnej, tak, aby w badanym zakresie nie powstawały ujemne obszary absorpcji.

Ostatnim etapem przygotowywania widm do analizy było poddanie wyizolowanych widm DNA zaburzonego normalizacji, która polegała na sprowadzeniu poszczególnych analizowanych pasm do pola powierzchni równego 1. Zabieg ten przeprowadzono w wybranym zakresie analizowanych widm w celu uzyskania ujednoczonych pasm charakterystycznych dla DNA. Sposób izolacji widma DNA w obecności osmolitu został przedstawiony schematycznie na Rysunku 8. Normalizacja widm była konieczna ze względu na różnice stężeń badanych indywidualów w ramach jednej serii pomiarowej. Pozwoliło to na dokładną analizę różnic w kształcie i położeniu pasm, będących skutkiem interakcji DNA z osmolitem.



Rysunek 8. Ilustracja metody izolowania widm DNA w roztworach o zmiennym stężeniu glicyny. A – seria widm wodnego roztworu osmolitu ($W'_{\text{osmolit-H}_2\text{O}}$); B – seria widm DNA w wodnym roztworze osmolitu ($W'_{\text{DNA-osmolit-H}_2\text{O}}$), czerwoną ramką zaznaczone są analizowane pasma DNA; C – widma osmolitu z Rysunku A interpolowane do stężeń z Rysunku B ($W'^i_{\text{osmolit-H}_2\text{O}}$); D – widma osmolitu z Rysunku C pozbawione udziału wody (W'^i_{osmolit}); E – seria widm DNA pozbawionych udziału osmolitu (W'_{DNA}); F – wyizolowane widma DNA znormalizowane według powierzchni pasma odpowiadającego antysymetrycznym drganiom rozciągającym grup PO_2^- .

Widmo zaburzone osmolitu obecnością DNA w roztworze wodnym

W celu uzyskania wyizolowanego widma osmolitu zaburzonego przez DNA należało uzyskać następujące serie stężeniowe widm oraz ich różnice:

$W''_{\text{osmolit-DNA-H}_2\text{O}}$ – seria stężeniowa widm osmolitu (stałe stężenie) w obecności DNA (zmiennie stężenie) w roztworze wodnym. Uzyskane widma są sumą udziałów widmowych wielu indywidualów: widma osmolitu niezaburzonego i zaburzonego przez DNA, widma DNA niezaburzonego i zaburzonego przez osmolit, widma wody objętościowej, wody zaburzonej przez osmolit i wody zaburzonej przez DNA.

$W''_{\text{DNA-H}_2\text{O}}$ – seria stężeniowa widm DNA w roztworze wodnym. Otrzymane w ten sposób widma są sumą udziałów widmowych: DNA, wody objętościowej i wody zaburzonej przez DNA.

$W''^i_{\text{DNA-H}_2\text{O}}$ – seria stężeniowa interpolowanych widm DNA w roztworze wodnym.

W''^i_{DNA} – seria stężeniowa interpolowanych widm DNA pozbawionych udziału wody.

$W''_{\text{H}_2\text{O}}$ – widmo wody objętościowej (wody czystej).

$W''_{\text{osmolit-H}_2\text{O}}$ – seria widm osmolitu w obecności DNA w roztworze wodnym, na którą składają się udziały widm osmolitu niezaburzonego i zaburzonego przez DNA oraz widm wody objętościowej i wody zaburzonej przez osmolit. Seria ta pozbawiona jest udziału widmowego DNA oraz wody zaburzonej przez DNA.

W''_{osmolit} – seria wyizolowanych widm osmolitu, na którą składają się udziały widmowe jedynie osmolitu niezaburzonego i zaburzonego przez DNA.

Analogicznie, jak w przedstawionej już procedurze otrzymywania widm zaburzonych DNA obecnością osmolitu, do uzyskania wyizolowanych widm osmolitu zaburzonego przez DNA, konieczne jest usunięcie z tych widm pasm absorpcji samego DNA oraz wody. Zmierzone widma DNA w roztworze wodnym ($W''_{\text{DNA-H}_2\text{O}}$) zostały interpolowane do wartości rzeczywistych stężeń DNA w roztworach z osmolitem. Podczas odejmowania uzyskanych widm interpolowanych od serii widm osmolitu w obecności DNA w roztworze

wodnym, usunięty został udział widmowy DNA niezaburzonego. Do korekcy widm ze względu na obecność DNA zaburzonego przez osmolit posłużyły wyizolowane we wcześniejszym eksperymencie widma W'_{DNA} . W uzyskanych w ten sposób widmach ($W''_{\text{osmolit-H}_2\text{O}}$) udział wody objętościowej oraz wody zaburzonej przez substancję rozpuszczoną został usunięty podczas odejmowania widma wody objętościowej.

7.4.6 Chemometryczna metoda wyznaczania widm zaburzonych

Badania nad skuteczną metodą uzyskiwania właściwych widm zaburzonych na podstawie analizy danych spektralnych były od dawna prowadzone i rozwijane w zespole Stangreta. Jego prace skupiają się między innymi na poszukiwaniu widm wody zaburzonej przez szereg substancji rozpuszczonych oraz wyznaczeniu parametru N , określającego liczbę cząsteczek zaburzonych, równą liczbie moli cząsteczek wody zaburzonej przez jeden mol substancji rozpuszczonej^{183, 184}. Metoda uzyskiwania widm zaburzonych została w tym samym zespole zautomatyzowana poprzez wykorzystanie algorytmów chemometrycznych opartych na analizie serii widm roztworów. Zostało to dokładnie opisane w publikacji¹⁸⁵ oraz zastosowane, również z moim udziałem, w analizie układów zawierających DNA¹⁸⁶. W niniejszej pracy zastosowałam tę metodę do otrzymania widm DNA zaburzonego przez wybrane osmolity oraz do wyznaczenia liczby cząsteczek osmolitu zaburzonego przez obecność DNA w roztworze.

Metoda widm różnicowych zaproponowana przez Stangreta może być wykorzystywana do analizy różnych układów, jeśli tylko możliwe jest wyodrębnienie udziału zaburzonego (*affected, a*) i niezaburzonego (*bulk, b*) badanego składnika w obecności substancji rozpuszczonej w roztworze:

$$\varepsilon \cdot c = \varepsilon_a \cdot c_a + \varepsilon_b \cdot c_b$$

(Rów. 2)

gdzie ε , ε_a , ε_b oznaczają odpowiednio, widmo roztworu badanego składnika, widmo jego części zaburzonej oraz niezaburzonej, natomiast $c = c_a + c_b$ wyraża całkowite stężenie badanej substancji w roztworze ($\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$).

Przekształcając równanie możemy wyznaczyć widmo czynnika zaburzonego w roztworze:

$$\varepsilon_a = \frac{c}{c_a}(\varepsilon - \varepsilon_b) + \varepsilon_b$$

(Rów. 3)

Zakładając, że $c = I/MV$, natomiast $c_a = Nm/V$, uzyskujemy równanie 3 w postaci:

$$\varepsilon_a = \frac{1}{NMm}(\varepsilon - \varepsilon_b) + \varepsilon_b$$

(Rów. 4)

gdzie m oznacza molalność roztworu substancji rozpuszczonej ($\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$); M – masę molową badanego składnika ($\text{kg}\cdot\text{mol}^{-1}$); V – objętość roztworu zawierającego m moli substancji rozpuszczonej i jeden kilogram czynnika badanego; N – liczbę cząsteczek zaburzonych, równą liczbie moli cząsteczek badanego czynnika zaburzonych przez jeden mol substancji rozpuszczonej.

Przedstawione powyżej równanie 4 jest najlepiej spełnione, gdy $m \rightarrow 0$ i sprowadza się do postaci:

$$\varepsilon_a = \frac{1}{NM} \left(\frac{\partial \varepsilon}{\partial m} \right)_{m=0} + \varepsilon_b$$

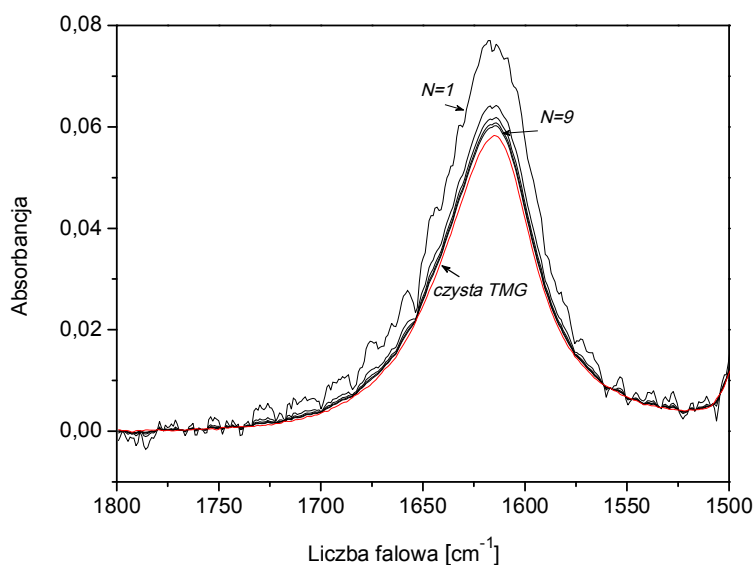
(Rów. 5)

Pochodna z powyższego równania, w warunkach nieskończonego rozcieńczenia substancji rozpuszczonej, jest uzyskiwana poprzez aproksymację ε względem m , dla każdej liczby falowej w całej serii widm danego układu, mierzonych dla różnych molalności substancji rozpuszczonej. Równanie 5 zawiera dwie niewiadome: ε_a oraz wartość N , w związku z tym poznając jedną z nich jednocześnie poznajemy także drugą.

Przykładowy zestaw próbnych widm zaburzonych dla różnych wartości N został przedstawiony na Rysunku 9. Ze wzrostem wartości parametru N , widmo zaburzone staje się bardziej podobne do widma czystego czynnika. Dzieje się tak, ponieważ udział widma zaburzonego maleje ze wzrostem N , a udział czystego czynnika staje się bardziej istotny.

Klasyczna metoda otrzymywania widma zaburzonego polega na znalezieniu spośród serii widm wyznaczonych z równania 5, na podstawie

analizy ich kształtu, tego widma, które w całym rozpatrywanym regionie nie posiada pasm ujemnych, jego kształt ma sens fizyczny i nie zawiera w sobie udziału formy niezaburzonej. Metoda ta jest niestety czasochłonna i pozwala na przeanalizowanie jedynie niewielkiej liczby testowych widm zaburzonych.

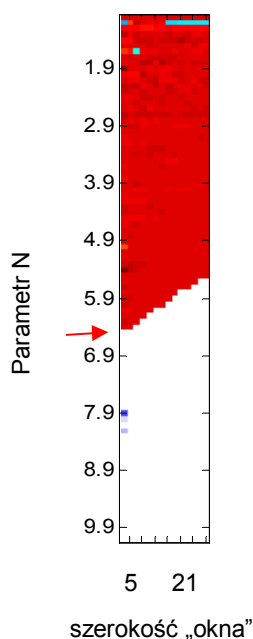


Rysunek 9. Przykładowy zestaw próbných widm zaburzonych N,N,N -trimetyloglicyny dla wybranych wartości parametru N . Kolorem czerwonym zostało zaznaczone widmo niezaburzone N,N,N -trimetyloglicyny.

Procedura otrzymywania kształtu widma zaburzonego i odpowiadającej mu wartości parametru N została zautomatyzowana przez Bruździaka poprzez zastosowanie metody chemometrycznej¹⁸⁵ i wykorzystana przeze mnie do wyznaczenia liczby cząsteczek osmolitu zaburzonych w roztworze przez DNA. Metoda ta opiera się na wykorzystaniu równania 5 do wyznaczenia dla danej substancji rozpuszczonej serii próbných widm zaburzonych, z których tylko jedno odpowiada poszukiwanej wartości parametru N . Udział indywidualum niezaburzonego w tych próbných widmach zmienia się od zera (dla wartości N równych lub niższych od wartości poszukiwanej) do prawie 100 % (dla dużych wartości N). Podobnie, jak w metodzie klasycznej poszukuje się wartości parametru N , który odpowiada widmu zaburzonemu (ϵ_a), nieposiadającemu udziału widma formy niezaburzonej i pasm ujemnych. Bruździak zaproponował

metodę chemometryczną polegającą na powtarzającej się cyklicznie analizie małych podzestawów widm testowych, określanych jako „okna”, co pozwala znaleźć prawdziwą wartość parametru N . Jest to wartość znajdująca się na granicy pomiędzy podzestawem próbnych widm zaburzonych, które nie zawierają jeszcze udziału formy niezaburzonej, a podzestawem w którym się ona pojawia. W celu zwiększenia dokładności wyznaczenia parametru N , analizę taką powtarza się cyklicznie dla coraz węższych zakresów serii próbnych widm zaburzonych (szerokości „okien”).

Wybrane z serii próbnych widm zaburzonych widma w danym podzestawie są porównywane z widmem niezaburzonej substancji badanej. Podobieństwo tych czynników do widma niezaburzonego określa się za pomocą parametru χ^2 , a sumę dwóch najniższych uzyskanych parametrów χ^2 nazwano sumarycznym parametrem χ^2 ($\Sigma\chi^2$).



Rysunek 10. Przykładowa mapa parametru $\Sigma\chi^2$ dla N,N,N -trimetyloglicyny zaburzonej przez obecne w roztworze DNA. Biały region oznacza małe podobieństwo wyizolowanych czynników do widma N,N,N -trimetyloglicyny; pozostałe kolory oznaczają wysokie podobieństwo przynajmniej jednego z wyizolowanych czynników do widma N,N,N -trimetyloglicyny. Czerwoną strzałką zaznaczone jest miejsce na osi, gdzie wyznaczony został parametr N .

Skok wartości parametru $\Sigma\chi^2$ związany jest z właściwą wartością parametru N i co się z tym wiąże również z poszukiwanym widmem osmolitu zaburzonego przez obecność DNA w roztworze. Wyniki opisanego analizy chemometrycznej przedstawiane są w postaci mapy parametru $\Sigma\chi^2$, na której granica pomiędzy regionami oznaczającymi małe i duże podobieństwo wyznacza wartość parametru N . Granica ta wyznaczona jest przez ostre przejście pomiędzy różnymi kolorami na mapie w miejscu wskazującym na osi poszukiwaną wartość N , jak to zostało przedstawione na przykładowej mapie dla jednego z badanych układów (Rysunek 10).

Analogiczna metoda została przeze mnie wykorzystana do wyznaczenia widm DNA zaburzonego przez osmolity w roztworze. Substancja rozpuszczona oddziałuje w roztworze wodnym na biocząsteczkę pośrednio lub bezpośrednio. W wyniku tego oddziaływania badane DNA występuje w roztworze również w dwóch stanach: zaburzonym (a) i niezaburzonym (b). Korzystając z prawa addytywności absorpcji możemy zapisać widmo takiego układu (A), jako:

$$A = A_a x_a + A_b x_b$$

(Rów. 6)

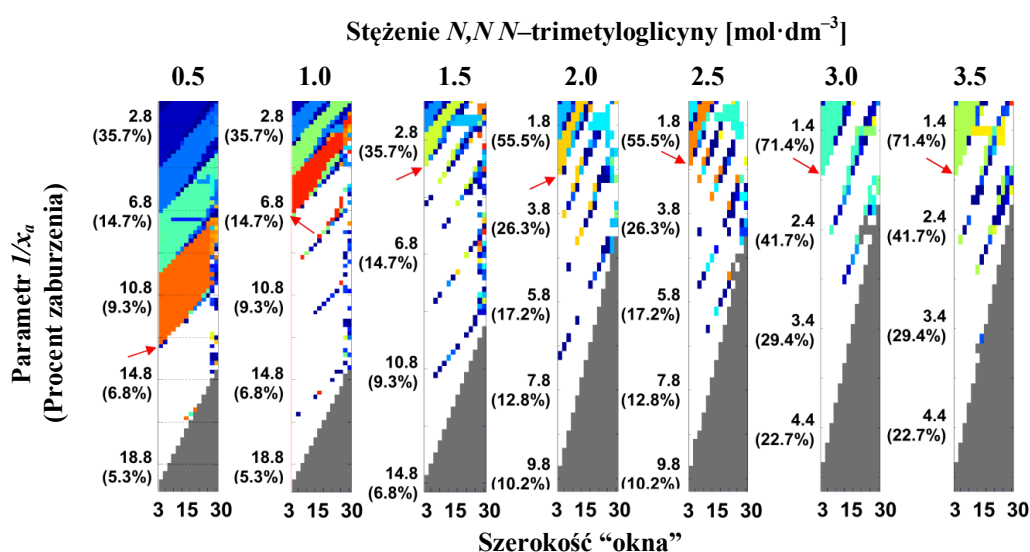
gdzie A_a i A_b oznaczają widma poszczególnych indywiduów, a x_a i x_b ich udziały molowe w całkowitym widmie. Prawo addytywności można zastosować tylko wtedy, gdy objętość własna obu rozważanych form biomakrocząsteczki jest taka sama, co powinno być spełnione gdy różnice w ich strukturze są niewielkie. Po odpowiednim przekształceniu równania 6 uzyskujemy wzór, który pozwala wyznaczyć widmo formy zaburzonej (A_a):

$$A_a = \frac{1}{x_a} (A - A_b) + A_b$$

(Rów. 7)

Równanie 7 zawiera dwie niewiadome: widmo formy zaburzonej, A_a oraz wartość parametru $1/x_a$. Poznając jedną z tych niewiadomych, równocześnie poznamy i drugą. Wykorzystując analogiczną do powyższej metodę chemometryczną, na podstawie równania 7, wyznacza się serię testowych widm zaburzonych (A_a) dla kolejnych wartości parametru $1/x_a$, który jest większy lub równy 1.

W rozpatrywanym w tej pracy przypadku wyizolowane z serii testowych widm zaburzonych widma czystych czynników są porównywane z widmem DNA niezaburzonego uzyskanym z pomiaru DNA w roztworze wodnym bez udziału osmolitu. Przykładowe mapy parametru $\Sigma\chi^2$ związanego z właściwą wartością parametru $1/x_a$ oraz z procentową zawartością struktury DNA zaburzonej przez osmolit, zostały przedstawione na przykładowym zestawieniu dla jednego z badanych układów DNA – woda – *N,N,N*-trimetyloglicyna (Rysunek 11).



Rysunek 11. Przykładowe mapy parametru $\Sigma\chi^2$ dla DNA zaburzonego przez *N,N,N*-trimetyloglicynę obecną w roztworze (stężenia *N,N,N*-trimetyloglicyny podane powyżej każdej z map). Biały region oznacza małe podobieństwo wyizolowanych czynników do widma DNA; pola szare to obszar „pusty”; pozostałe kolory oznaczają wysokie podobieństwo przynajmniej jednego z wyizolowanych czynników do widma DNA. Czerwonymi strzałkami zaznaczone są miejsca na osiach, gdzie wyznaczony został parametr $1/x_a$ (lub procent zaburzenia struktury DNA przez osmolit).

7.5 Metodyka pomiarów kalorymetrycznych ITC

Typowy eksperyment ITC polega na miareczkowaniu roztworem titranta zawartym w strzykawce, znajdujący się w celce pomiarowej roztwór analitu w stałej temperaturze i pod stałym ciśnieniem atmosferycznym. Ciepło uwalniane lub pobierane podczas reakcji jest mierzone w funkcji czasu. W wyniku pomiaru uzyskuje się przedstawiający zależność mocy [$\mu\text{cal}\cdot\text{s}^{-1}$] od czasu [min] termogram, który składa się z serii pików, a pole powierzchni każdego z nich reprezentuje efekt cieplny przemiany (ΔH) związany

z dodaniem małej ilości titranta do celki pomiarowej. Wartość zaabsorbowanego lub wydzielonego ciepła, czyli powierzchnia pików jest proporcjonalna do liczby moli titranta.

Kalorymetr ITC w trakcie miareczkowania mierzy globalny efekt cieplny, który towarzyszy mieszanemu dwóch reagentów: titranta i analitu, na który składa się kilka różnych procesów. Poza zmianą entalpii związaną ze „zrywaniem” starych i „powstawaniem” nowych wiązań, na ogólny efekt wpływa także zmiana entalpii mieszania roztworów, która zależy od różnicy w ich pH, stężeniach i temperaturach oraz zmiana entalpii rozcieńczania badanych roztworów. W związku z powyższym ciepło badanych przez mnie reakcji zostało oszacowane na podstawie szeregu eksperymentów miareczkowania, które miały na celu uwzględnienie tych procesów składowych:

1. miareczkowanie roztworu DNA wybranym roztworem osmolitu,
2. miareczkowanie roztworu DNA wodą (poprawka na efekt rozcieńczania roztworu DNA)
3. miareczkowanie wody roztworem osmolitu (poprawka na efekt rozcieńczania roztworu osmolitu),
4. miareczkowanie wody wodą (poprawka wynikająca z różnic temperatur pomiędzy titrantem i roztworem w celce),
5. miareczkowanie roztworu NaCl roztworem osmolitu,
6. miareczkowanie roztworu NaCl wodą (poprawka na efekt rozcieńczania),
7. miareczkowanie roztworu TBA^+Cl^- roztworem osmolitu,
8. miareczkowanie roztworów TBA^+Cl^- wodą (poprawka na efekt rozcieńczania).

7.5.1 Wstępne opracowanie termogramów

Dane kalorymetryczne przedstawiane są bezpośrednio na termogramach, które są zależnością mocy [$\mu\text{J}\cdot\text{s}^{-1}$] od czasu [s]. Jest to seria pików odpowiadających kolejnym etapom miareczkowania. Pole każdego pików jest

automatycznie integrowane przy pomocy specjalistycznego programu *NanoAnalyze 2.1* i podawane w postaci ciepła reakcji, Q [μJ].

W celu uzyskania efektu cieplnego wynikającego z oddziaływania DNA z poszczególnymi osmolitami należało uzyskać ciepła cząstkowe reakcji miareczkowania:

1. $Q_{\text{DNA-osmolit}}$ – ciepło miareczkowania roztworu DNA roztworem osmolitu, w którego skład wchodzi również efekty różnicy temperatur roztworów, rozcieńczania oraz oddziaływania osmolitu z jonami Na^+ obecnymi w roztworze DNA;
2. $Q_{\text{DNA-H}_2\text{O}}$ – ciepło miareczkowania roztworu DNA wodą, które wynika z efektu rozcieńczania;
3. $Q_{\text{H}_2\text{O-osmolit}}$ – ciepło miareczkowania wody roztworem osmolitu, które wynika z efektu rozcieńczania;
4. $Q_{\text{H}_2\text{O-H}_2\text{O}}$ – ciepło miareczkowania wody wodą, wynikające z efektu różnicy temperatur pomiędzy roztworem znajdującym się w biurecie i roztworem w celce reakcyjnej;
5. $Q_{\text{NaCl-osmolit}}$ – ciepło miareczkowania roztworu NaCl roztworem osmolitu, w którego skład wchodzi również efekty różnicy temperatur roztworów i rozcieńczania;
6. $Q_{\text{NaCl-H}_2\text{O}}$ – ciepło miareczkowania roztworu NaCl wodą, które wynika z efektu rozcieńczania;
7. $Q_{\text{TBACl-osmolit}}$ - ciepło miareczkowania roztworu TBA^+Cl^- roztworem osmolitu, w którego skład wchodzi również efekty różnicy temperatur roztworów i rozcieńczania;
8. $Q_{\text{TBACl-H}_2\text{O}}$ - ciepło miareczkowania roztworu TBA^+Cl^- wodą, które wynika z efektu rozcieńczania;

Dla każdego z badanych osmolitów zostały wykonane eksperymenty, a ich przykładowe termogramy są przedstawione na Rysunku 12A-D. Powstały one w wyniku miareczkowania roztworów DNA, NaCl, TBACl oraz wody roztworem danego osmolitu. Kilukrotnie został wykonany także eksperyment

miareczkowania woda – woda (Rysunek 12H), ale ze względu na powtarzalne wyniki, zarówno wewnątrz serii dla jednego osmolitu, jak i pomiędzy poszczególnymi seriami, wartość poprawki na różnicę temperatur pomiędzy celką pomiarową i biuretą, została ujednoczona i wykorzystana do wszystkich obliczeń. We wszystkich etapach analizy korekcja ta zaznaczana jest przez dodanie znaku „prim” do symbolu ciepła (Q'). Zaprezentowany na Rysunku 12H termogram, który jest efektem miareczkowania wody wodą, przedstawia efekt egzotermiczny, co może wynikać stąd, że celka pomiarowa była stabilizowana w temperaturze 25°C podczas pomiaru, natomiast temperatura titranta umieszczonego w biurecie była wyższa, zatem po każdym miareczkowaniu następowało niewielkie podwyższenie temperatury w celce reakcyjnej, co musiało zostać zrekompensovane.

Poza właściwymi seriami pomiarowymi zostały wykonane także eksperymenty miareczkowania roztworów DNA, NaCl i TBACl, wodą (Rysunek 12E-G), które pozwoliły na oszacowanie poprawki wynikającej z rozcieńczania roztworów znajdujących się w celce pomiarowej. Jak widać, ze względu na nieznaczną zmianę objętości roztworu w celce pomiarowej podczas miareczkowania, obserwujemy niewielki efekt egzotermiczny, który wynika głównie z różnic temperatur roztworów analitu i titranta. Wartości tych poprawek również posłużyły do korekcji efektów cieplnych we wszystkich seriach pomiarowych dla różnych substancji rozpuszczonych.

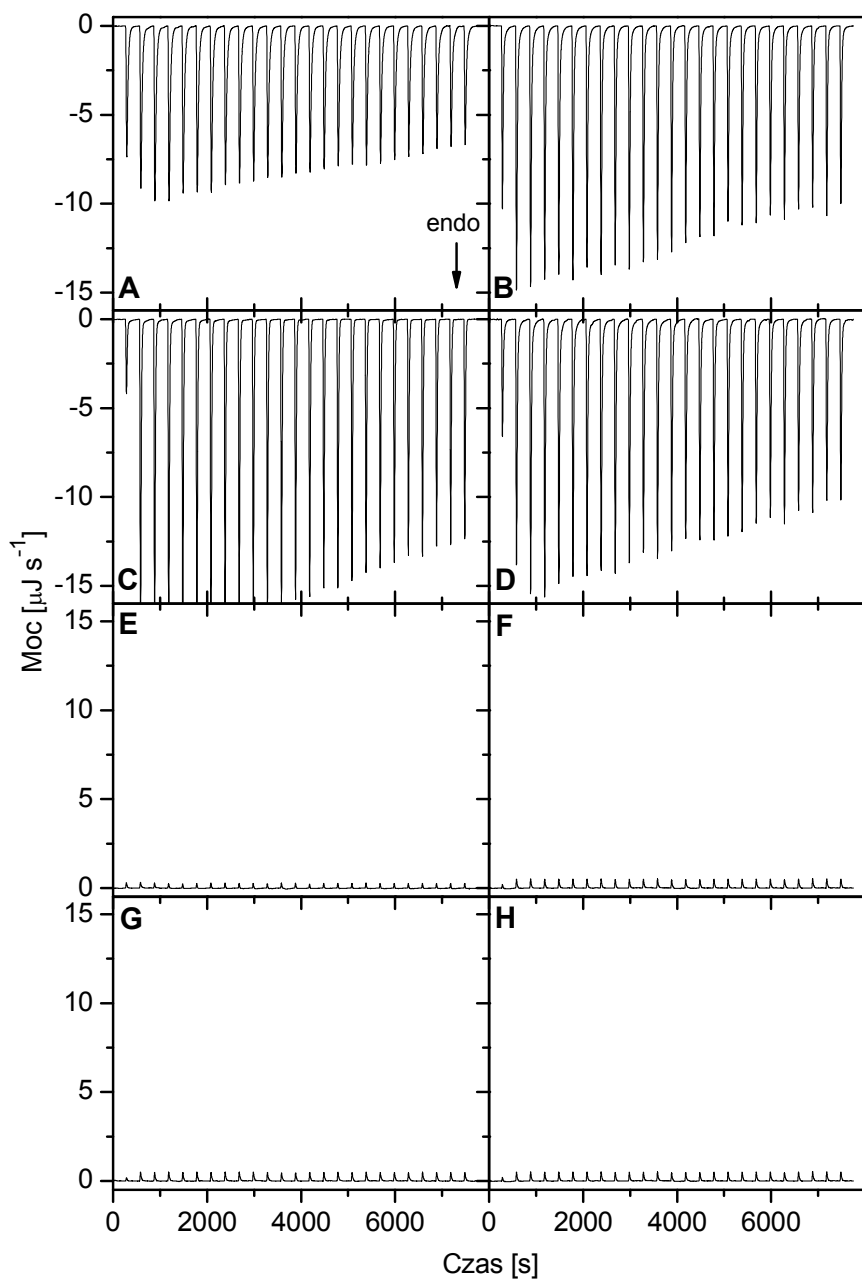
W związku ze zbliżonymi wartościami pH w badanych roztworach (5.5 – 6.5) efekt cieplny reakcji protonowania został w tych rozważaniach pominięty.

W wyniku odpowiednich szacunków uzyskiwane są wartości ciepła wymienianego na skutek oddziaływania różnych indywiduów w roztworze, czyli zmiana entalpii, która jest z tymi oddziaływaniami związana. W celu uproszczenia dyskusji wartość tych ciepł będzie przeze mnie nazywana skrótowo entalpią oddziaływania.

W pierwszym etapie oszacowana zostaje entalpia oddziaływania soli sodowej DNA z osmolitem w roztworze wodnym (Q_1):

$$Q_1 = Q_{DNA-osmolit} - (Q'_{H_2O-osmolit} + Q_{H_2O-H_2O} + Q'_{DNA-H_2O})$$

(Rów. 8)



Rysunek 12. Przykładowe termogramy uzyskane techniką izotermicznej kalorymetrii różnicowej powstałe w wyniku miareczkowania: A – roztworu DNA – roztworem mocznika, B – roztworu NaCl - roztworem mocznika, C – roztworu TBACl – roztworem mocznika, D - H₂O – roztworem mocznika, E – roztworu DNA - H₂O, F – roztworu NaCl - H₂O, G – roztworu TBACl - H₂O, H – H₂O-H₂O.

W tym celu wykonany został każdorazowo zestaw eksperymentów pozwalający na uwzględnienie faktu, że na ogólny efekt cieplny towarzyszący oddziaływaniom pomiędzy DNA i substancją rozpuszczoną (Rysunek 12A) wpływ ma także efekt towarzyszący rozcieńczaniu roztworu osmolitu (Rysunek 12D) i jest to, jak widać, główny składnik obserwowanego procesu. W przedstawionym przykładzie (Rysunek 12D) jest to reakcja endotermiczna. Należy wziąć pod uwagę także poprawki związane z rozcieńczaniem roztworu DNA (Rysunek 12E) i różnicą temperatur w celkach (Rysunek 12H).

W drugim etapie określona została wartość entalpii oddziaływania chlorku sodu z wybranym osmolitem w roztworze wodnym (Q_2):

$$Q_2 = Q_{NaCl-osmolit} - (Q'_{H_2O-osmolit} + Q_{H_2O-H_2O} + Q'_{NaCl-H_2O})$$

(Rów. 9)

Wykonałam w związku z tym serię pomiarów, z których przykładowy termogram przedstawiony jest na Rysunku 12B. Oszacowanie entalpii oddziaływania NaCl z mocznikiem, zgodnie z równaniem 9, wymagało uwzględnienia efektu związanego z rozcieńczaniem roztworu mocznika (Rysunek 12D) oraz pozostałych poprawek: na różnicę temperatur pomiędzy roztworami w celce i biurecie (Rysunek 12H) i rozcieńczanie roztworu chlorku sodu (Rysunek 12F).

W każdym eksperymencie, w którym wykorzystywane jest DNA, w roztworze obecne są również jony Na^+ . Konieczne jest w związku z tym uwzględnienie ich oddziaływania z osmolitami. Jednakże eksperymenty, w których wykorzystywany jest chlorek sodu, pozwalają określić entalpie oddziaływania osmolitów, zarówno z jonami Na^+ , jak i Cl^- . Dlatego konieczne jest określenie oddziaływania samych jonów Cl^- z osmolitami, aby możliwe było uwzględnienie tego efektu cieplnego w dalszych obliczeniach. W tym celu wykorzystany do badań został chlorek tetrabutylamoniowy (TBA^+Cl^-). Założono, że efekt cieplny uzyskany po zmiareczkowaniu roztworu wodnego TBA^+Cl^- roztworem osmolitu będzie wynikał z oddziaływania jonów Cl^- z osmolitem. Kation TBA^+ posiada na tyle duży promień jonowy, a tym samym małą gęstość ładunku, że można się było spodziewać pomijalnie małego efektu cieplnego oddziaływania osmolitu z tym jonem. Dlatego wartość entalpii

oddziaływania jonów Cl^- z wybranym osmolitem (Q_3) obliczono posługując się równaniem:

$$Q_3 = Q_{\text{TBAcl-osmolit}} - (Q'_{\text{H}_2\text{O-osmolit}} + Q_{\text{H}_2\text{O-H}_2\text{O}} + Q'_{\text{TBAcl-H}_2\text{O}})$$

(Rów. 10)

Wykonanie serii termogramów, umożliwiło uwzględnienie w ogólnym efekcie oddziaływania TBA^+Cl^- z mocznikiem (Rysunek 12C), efektów rozcieńczania roztworów mocznika (Rysunek 12D) i TBA^+Cl^- (Rysunek 12G) oraz poprawki na różnicę temperatur (Rysunek 12H).

Dzięki powyższym założeniom możliwe jest oszacowanie entalpii oddziaływania jonów Na^+ z poszczególnymi osmolitami w roztworze wodnym (Q_4):

$$Q_4 = Q_2 - Q_3$$

(Rów. 11)

W celu ujednoczenia wyników otrzymanych bezpośrednio z eksperymentu, wartości odpowiednich ciepł (Q) przeliczone są na liczbę moli danego osmolitu w nastrzyku.

Podczas analizy oddziaływania jonów Na^+ z osmolitami zastosowałam odpowiednie przeliczenia i wartości ciepła Q podałam dla 1 mola jonów Na^+ oddziałującego z poszczególnymi osmolitami. Oszacowane wartości ciepła podawałam w zależności od stosunku stężeń osmolitu i sodu. Najważniejszymi analizowanymi wielkościami są efekty cieplne towarzyszące oddziaływaniu badanych osmolitów z DNA. Analizowane ciepło przedstawiłam w przeliczeniu na 1 mol par zasad badanego kwasu nukleinowego w zależności od stosunku stężeń osmolitu i par zasad DNA.

Korekcja na objętość odbywała się przy założeniu addytywności objętości roztworu w celce i roztworu miareczkującego i miała na celu uniezależnienie się od stopnia rozcieńczenia analitu w roztworze miareczkowanym, co zapewnia właściwą odległość międzycząsteczkową osmolit – DNA, adekwatną do stosunku molowego $n_{\text{osmolit}}/n_{\text{DNA}}$, niezależną od objętości całkowitej roztworu. W tym celu, uzyskany stosunek molowy jest mnożony przez stosunek objętości końcowej i początkowej roztworu w celce. Ostateczny efekt cieplny

oddziaływania DNA – osmolit wciąż będzie jednak zależał od stężenia DNA w celce kalorymetru.

W końcowym etapie wszystkie uzyskane wartości entalpii w funkcji stosunków molowych ekstrapolowane były do ich zerowej wartości, czyli do warunków nieskończonego rozcieńczenia substancji rozpuszczonej w roztworze.

7.6 Metodyka pomiarów kalorymetrycznych DSC

Kalorymetria DSC jest metodą, która pozwala określić stabilność biomolekuł w zależności od warunków środowiskowych, takich jak pH, siła jonowa roztworu, czy obecność w roztworze różnych substancji rozpuszczonych.

W podstawowym eksperymencie DSC, energia jest w sposób ciągły dostarczana do celki pomiarowej (zawierającej roztwór z badanym związkem) oraz do celki referencyjnej (zawierającej ten sam roztwór bez badanego związku). Temperatura obu celek rośnie tak samo w funkcji czasu. Różnica w energii, którą trzeba dostarczyć do celki pomiarowej, żeby utrzymać taką samą temperaturę, jak w celce referencyjnej, jest równoważna wartości ciepła zaabsorbowanego bądź uwolnionego przez biomolekułę w badanym roztworze, odpowiednio, podczas procesu endo- lub egzotermicznego. Parametry termodynamiczne, które można uzyskać w takim eksperymencie są wrażliwe na zmiany w strukturze biocząsteczek. Jakakolwiek zmiana ich konformacji uwidacznia się jako zmiana kształtu lub położenia profilu denaturacji na termogramie. Ma to więc wpływ na wartość temperatury denaturacji, czyli temperatury, w której 50 % struktury biomolekuły ma formę natywną, a pozostała część jest zdenaturowana. Zmniejszenie wartości temperatury denaturacji, w wyniku zmiany warunków środowiskowych, świadczy o zmniejszonej stabilności badanej cząsteczki.

7.6.1 Wstępne opracowanie danych kalorymetrycznych

Dane kalorymetryczne przedstawiane są bezpośrednio na termogramach, jako zależność mocy grzania [$\mu\text{J}\cdot\text{s}^{-1}$] od temperatury [$^{\circ}\text{C}$] z wykorzystaniem specjalistycznego programu *NanoAnalyze 2.1*, stanowiącego oprogramowanie zintegrowane z kalorymetrem DSC.

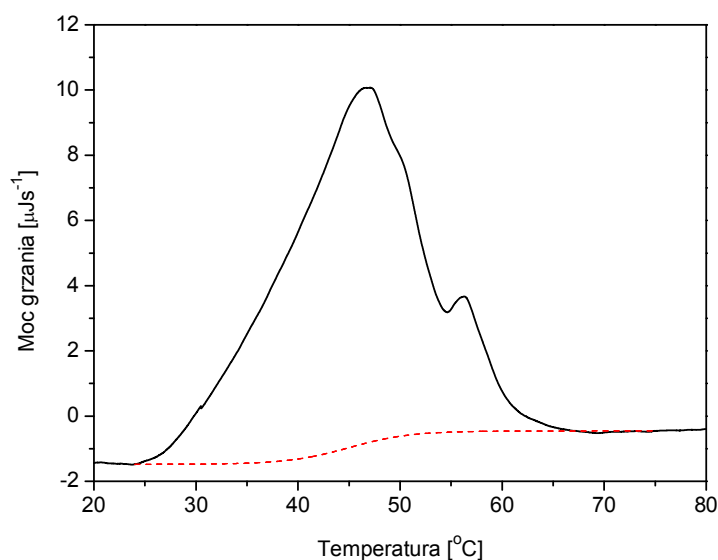
Kalorymetria DSC została przeze mnie wykorzystana do wyznaczenia temperatury denaturacji DNA w obecności różnych substancji rozpuszczonych w roztworze wodnym. Dla każdej z badanych substancji wykonywałam pomiary linii buforowych oraz właściwych termogramów z DNA obecnym w roztworze. Stężenie DNA było stałe we wszystkich pomiarach i wynosiło $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, natomiast substancje rozpuszczone badane były przy dwóch stężeniach: jednostkowym umożliwiającym porównanie wszystkich badanych związków i maksymalnym możliwym stężeniu wynikającym z rozpuszczalności danej substancji w wodzie.

Pierwszym krokiem w przygotowaniu danych kalorymetrycznych do analizy było dobranie odpowiedniej linii buforowej i odjęcie jej od właściwego termogramu, zawierającego profil denaturacji DNA. Linie buforowe mierzone były przy obu celkach wypełnionych roztworem niezawierającym DNA, w identycznych warunkach (opisanych w rozdziale 7.2.), jak w przypadku roztworu substancji rozpuszczonej, zawierającej DNA. Było to konieczne ze względu na niewielkie różnice pomiędzy celką pomiarową i referencyjną, które powodują, że linia bazowa jest lekko zakrzywiona i przesunięta względem zera. Wykonanie tej korekty jest możliwe przy użyciu oryginalnego oprogramowania.

Po odjęciu linii buforowej uzyskujemy termogram przedstawiający profil denaturacji DNA, poprzedzony przez linię bazową formy natywnej DNA, natomiast po denaturacji uzyskiwana jest linia bazowa odpowiadająca formie zdenaturowanej DNA. Obecność obu wymienionych linii bazowych umożliwia wyznaczenie tzw. chemicznej linii bazowej. Chemiczna linia bazowa powinna mieć przebieg sigmoidalny i płynnie przechodzić od początkowej do końcowej linii bazowej (Rysunek 13). Sposób wyznaczenia tej linii w pewnym stopniu wpływa na określenie wartości interesującej mnie temperatury denaturacji DNA. W większości przypadków możliwe było przybliżenie linii bazowych funkcjami liniowymi lub kwadratowymi. W przypadku występowania po denaturacji procesów egzotermicznych, konieczne było przybliżenie linii bazowej funkcją wielomianową. Prawidłowe wyznaczenie i odjęcie chemicznej linii bazowej umożliwiło dalszą analizę termogramów.

Kolejny etap polegał na wyznaczeniu średniej temperatury denaturacji DNA mierzonej jako położenie środka ciężkości pola powierzchni zawartego pod krzywą termogramu. Wyznaczenie wartości odciętej tego punktu zostało

wykonane z wykorzystaniem programu *Grams/AI 8.0*. W tym samym programie termogramy zostały dodatkowo poddane normalizacji do jednostkowego pola powierzchni, co umożliwiło lepsze porównywanie kształtu i przesunięć profilu denaturacji zarówno wewnątrz serii stężeniowych, jak i pomiędzy poszczególnymi seriami.



Rysunek 13. Wstępna analiza danych kalorymetrycznych. Linią ciągłą oznaczona jest eksperymentalna krzywa zawierająca linię bazową przed i po denaturacji oraz profil denaturacji DNA; linią przerywaną zaznaczona jest dopasowana chemiczna linia bazowa.

7.7 Metodyka obliczeń

Optymalizację geometrii struktur osmolitów i niehydratowanych oraz hydratowanych par zasad wykonałam w ramach teorii funkcjonału gęstości (DFT) przy użyciu hybrydowego funkcjonału korelacyjno-wymennego B3LYP^{187, 188}. Obliczenia wykonałam korzystając ze standardowej bazy typu People'a 6-31G(d)^{189, 190}. W celu wyznaczenia momentów dipolowych osmolitów, struktury zoptymalizowane w fazie gazowej wykorzystałam jako dane wejściowe do optymalizacji cząsteczek z zastosowaniem modelu polaryzowalnego kontinuum rozpuszczalnika (PCM)¹⁹¹⁻¹⁹³.

8 Część eksperymentalna – wyniki badań i ich dyskusja

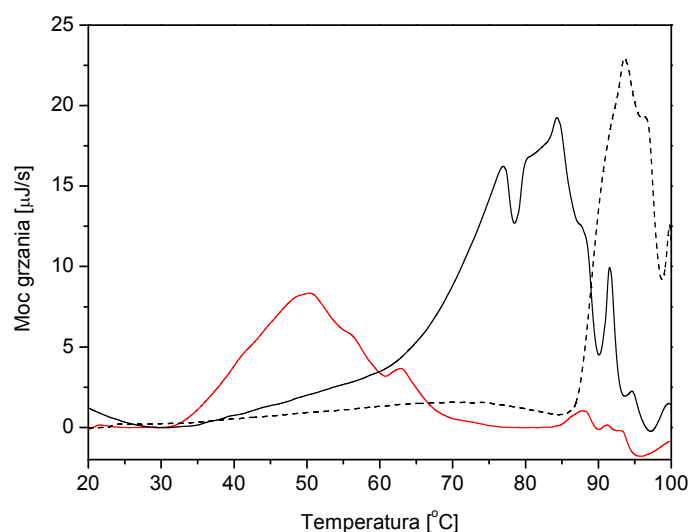
Na wstępie tego rozdziału należy zwrócić uwagę na fakt, że wszystkie badania opisane w niniejszej pracy zostały przeprowadzone w środowisku wodnym, a nie buforowym. Z biochemicznego punktu widzenia jest to niezgodne z warunkami panującymi w cytoplazmie i płynach ustrojowych, gdyż środowisko wodne nie zapewnia stałości pH. Jednakże badana przeze mnie biocząsteczka, DNA, sama posiada właściwości buforujące i w analizowanych, różnymi technikami, próbkach udało się uzyskać wartość pH przygotowanych roztworów wraz z różnymi substancjami rozpuszczonymi na poziomie 6.0 ± 0.5 . Jest to wartość zbliżona do warunków fizjologicznych, więc podczas analizy poszczególnych wyników nie było konieczne uwzględnianie wpływu zmian pH na stabilność i strukturę DNA.

Najważniejszym powodem decydującym o zastosowaniu roztworów wodnych bez dodatku buforu, był fakt iż każdy dodatkowy składnik w przypadku badanych układów wpływałby na wyniki i komplikował ich analizę. Zatem rezygnacja z buforu miała istotne zalety z fizykochemicznego punktu widzenia.

W moim wyborze upewniły mnie wykonane dodatkowo pomiary kalorymetryczne DSC, w których sprawdziłam wpływ obecności w roztworze buforu fosforanowego i chlorku sodu na stabilność DNA (Rysunek 14). Wykonałam dwa eksperymenty, w których zastosowałam bufor fosforanowy o pH 6.5 i stosunkowo małym stężeniu 5 mM. Próbki różniły się natomiast stężeniem chlorku sodu: w pierwszej stężenie to wynosiło 100 mM, natomiast w drugiej 500 mM. Okazało się, że obecność zarówno jonów fosforanowych, jak i sodowych w istotny sposób wpływa na temperaturę denaturacji oraz kształt profilu denaturacji DNA.

Średnia temperatura denaturacji DNA w roztworze wodnym wyniosła 51.0 °C, dodatek buforu fosforanowego oraz 100 mM chlorku sodu spowodował przesunięcie tej wartości do 75.8 °C oraz zmianę kształtu profilu denaturacji. Podniesienie stężenia chlorku sodu w buforze fosforanowym, zgodnie z przewidywaniami, spowodowało przesunięcie profilu denaturacji w kierunku wyższych temperatur, do tego stopnia, że nie jest on widoczny w całości w zakresie temperaturowym, który był przeze mnie zastosowany w badaniach kalorymetrycznych. Maksimum głównego piku pojawiło się w temperaturze 93.6 °C, co wskazuje na znaczne podwyższenie temperatury denaturacji DNA.

Analizując profil denaturacji DNA w buforze można zauważyć wyraźnie zaznaczone rozszczepienie termogramów na składowe. W przypadku DNA w roztworze wodnym profil ten jest bardziej zwarty. Fragmenty DNA bogate w pary GC są stabilniejsze niż te bogate w pary AT, stąd rozszczepienie termogramów DNA w buforze na składowe jest spowodowane różnicami w temperaturze denaturacji poszczególnych odcinków DNA.



Rysunek 14. Termogramy zawierające profil denaturacji DNA w czystej wodzie (linia czerwona), w buforze fosforanowym o stężeniu 5 mM z NaCl o stężeniu 100 mM (linia czarna ciągła) oraz w buforze fosforanowym o stężeniu 5 mM z 500 mM NaCl (linia czarna przerywana).

8.1 Analiza danych kalorymetrycznych

Termogramy otrzymane z wykorzystaniem kalorymetrii DSC pozwoliły na wyznaczenie temperatury denaturacji DNA (T_m) w obecności osmolitów. Pozostałe parametry termodynamiczne charakteryzujące denaturację DNA zostały pominięte ze względu na skomplikowane i niestandardowe, w większości przypadków, profile termogramów, co generowało duże i trudne do oszacowania błędy. Stosunkowo większym błędem, w porównaniu do pozostałych osmolitów, obarczone są temperatury denaturacji DNA w obecności *N*-metyloglicyny, *N,N,N',N'*-tetrametylomocznika i *N,N'*-dietylomocznika. Ma to związek z dodatkowymi efektami egzotermicznymi, które wystąpiły bezpośrednio po denaturacji, przez co zakłóciły przebieg linii

bazowej formy zdenaturowanej DNA i znacznie utrudniły wyznaczenie i odjęcie prawidłowej chemicznej linii bazowej. Efekty te są prawdopodobnie spowodowane agregacją zdenaturowanej formy DNA. Temperatura denaturacji została wyznaczona na podstawie termogramów zgromadzonych na Rysunkach 54, 55 oraz 56 w rozdziale 13. Porównania i analizy kształtów profili denaturacji dokonałam natomiast opierając się na znormalizowanych termogramach zamieszczonych w poniższych podrozdziałach.

W przypadku kalorymetrii ITC, przebieg uzyskanych termogramów wskazuje na brak bezpośrednich oddziaływań DNA z badanymi osmolitami. Powierzchnia pików, po dodaniu kolejnych porcji roztworu zawierającego osmolit, zmienia się w nieznacznym stopniu lub jest stała, co wyklucza tworzenie kompleksów i inne bezpośrednie oddziaływania. Wyjątkiem jest spermidyna, która została zbadana, dla porównania, jako związek o udokumentowanym, bezpośrednim oddziaływaniu z dwuniciowym DNA¹⁹⁴. Ze względu na nietypowy przebieg termogramów ITC, zostały one wykorzystane tylko do wyznaczenia wartości globalnych efektów cieplnych towarzyszących oddziaływaniu osmolitów z wodą, z jonami sodu oraz z DNA.

8.1.1 Glicyna i jej *N*-metylowe pochodne

8.1.1.1 Kalorymetria DSC

Zarówno glicyna, jak i jej *N*-metylowe pochodne powodują obniżenie temperatury denaturacji DNA (T_m , Tabela 4). Zatem w zakresie badanych stężeń zmniejszają jego stabilność. Wyjątkiem jest *N,N,N*-trimetyloglicyna, która przy najwyższym badanym stężeniu podnosi wartość T_m , jednakże jest to znikomy efekt, który może wynikać ze wspomnianego powyżej błędu przy odejmowaniu linii bazowej. W przypadku *N*-metyloglicyny wzrost jej stężenia w roztworze powoduje stopniowe (liniowe) zmniejszanie stabilności DNA. W pozostałych przypadkach (glicyny, *N,N*-dimetyloglicyny i *N,N,N*-trimetyloglicyny), z pominięciem spermidyny, obserwujemy wyraźnie nieliniowy przebieg zależności temperatury denaturacji od stężenia osmolitu (Rysunek 15). Wskazuje on na zwiększanie się stabilności DNA przy wyższych stężeniach osmolitu względem stężeń niższych. Obserwacja ta może przemawiać za pojawieniem się stabilizujących oddziaływań osmolit-DNA przy wyższych stężeniach.

Tabela 4. Parametry temperaturowe charakteryzujące zmianę temperatury denaturacji DNA w obecności osmolitów.

	c^a $mol\ dm^{-3}$	T_m^b $^{\circ}C$	ΔT_m^c $^{\circ}C$	$(dT_m/dc)_{c \rightarrow 0}^d$ $^{\circ}C \cdot dm^3 \cdot mol^{-1}$
DNA	0	50,99	0,00	0,00
Glicyna	0,012	45,37	-5,62	-602,70
	0,025	46,56	-4,43	
<i>N</i> -metyloglicyna	0,012	49,29	-1,70	-180,50
	0,030	46,71	-4,28	
	0,049	45,38	-5,61	
	0,066	42,13	-8,86	
<i>N,N</i> -dimetyloglicyna	0,012	47,22	-3,77	-339,01
	0,063	44,50	-6,49	
<i>N,N,N</i> -trimetyloglicyna	0,012	49,51	-1,48	-151,33
	0,042	51,69	+0,70	

a – stężenie osmolitów

b – temperatura denaturacji DNA

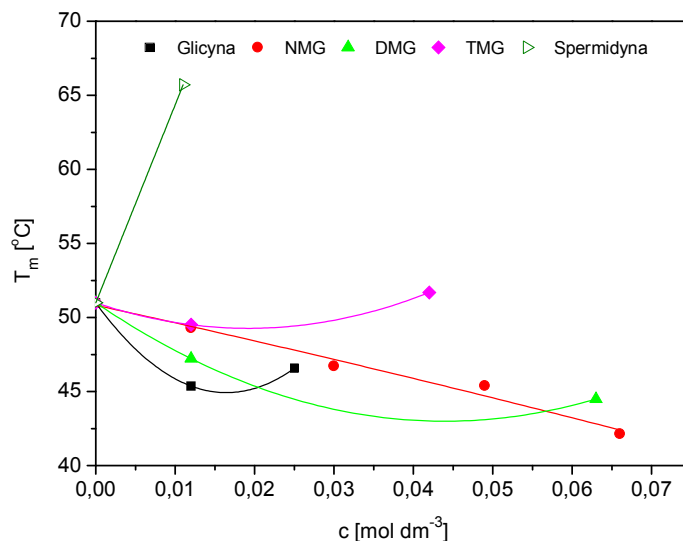
c – zmiana temperatury denaturacji DNA w obecności określonego stężenia osmolitu w stosunku do czystego DNA

d – wartość pochodnej zależności temperatury denaturacji DNA w obecności osmolitu od jego stężenia w roztworze, wyznaczona dla nieskończonego rozcieńczenia osmolitu

Na potrzeby dalszej analizy wprowadziłam parametr $(dT_m/dc)_{c \rightarrow 0}$, który jest pochodną z funkcji wyznaczonej dla zależności temperatury denaturacji DNA w obecności osmolitu od stężenia tego osmolitu. Pochodna wyznaczona jest dla roztworu osmolitu nieskończenie rozcieńczonego. Zależności temperatury denaturacji DNA od stężenia osmolitu mają charakter nieliniowy, dlatego konieczne było zastosowanie, w większości przypadków, funkcji wielomianowych.

Największe obniżenie temperatury denaturacji DNA w stosunku do czystego DNA w roztworze (ΔT_m , Tabela 4) można zaobserwować w przypadku maksymalnego użytego stężenia *N*-metyloglicyny, natomiast najmniejszy efekt wywołuje *N,N,N*-trimetyloglicyna. Zmiany temperatury w jej obecności są nieznaczne i najwolniejsze. Najszybciej natomiast DNA traci stabilność w wyniku dodania do roztworu glicyny.

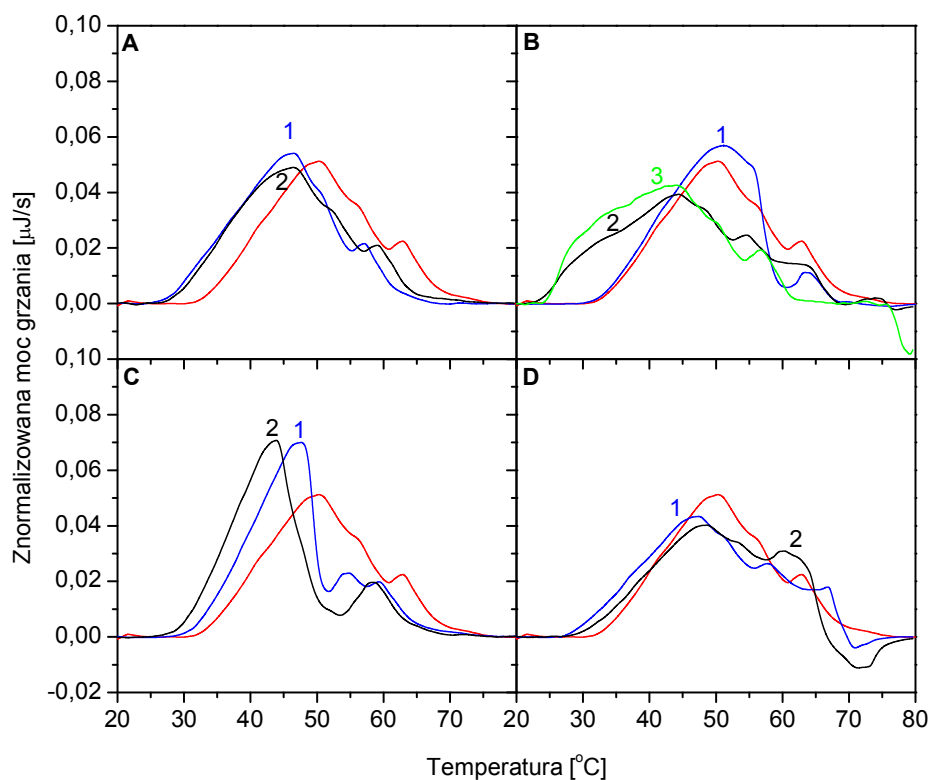
Glicyna i jej *N*-metylowe pochodne wykazują brak monotonicznego wpływu liczby grup metylowych w cząsteczce na temperaturę denaturacji DNA.



Rysunek 15. Temperatura denaturacji DNA w obecności osmolitów w roztworze wodnym. Punkty przybliżone zostały funkcjami wielomianowymi drugiego stopnia oraz funkcjami liniowymi, które posłużyły do wyznaczenia pochodnych dla nieskończonego rozcieńczenia osmolitu w roztworze.

Analizując termogramy uzyskane dla glicyn po odjęciu chemicznej linii bazowej (Rysunek 16) można zauważyć, że najmniejsza zmiana profilu denaturacji, w stosunku do czystego DNA, nastąpiła w wyniku obecności w roztworze glicyny. Zaobserwować można tutaj wyraźne przesunięcie maksimum w kierunku niższych wartości temperatury, ale sam kształt termogramu nie uległ znaczącej zmianie. Oznacza to, że glicyna obniża ogólnie stabilność DNA, nie wpływając jednocześnie na względną stabilność występujących w DNA sekwencji. W przypadku jedno- i dwupodstawionej glicyny widać natomiast wyraźną zmianę profilu denaturacji. Dla *N,N*-dimetyloglicyny i niskich stężeń *N*-metyloglicyny następuje wyostrenie i ujednoczenie profilu, co wynika ze zniwelowania różnic w trwałości fragmentów DNA bogatych w pary AT i GC. Profil denaturacji DNA w obecności *N,N,N*-trimetyloglicyny jest wyraźnie zniekształcony przez efekt egzotermiczny, który miał miejsce pod koniec procesu denaturacji. Może on oznaczać, że powstałe w wyniku denaturacji jednoniciowe DNA uległo

agregacji lub wystąpiły silne oddziaływania pomiędzy osmolitem, a zdenaturowaną formą DNA.



Rysunek 16. Znormalizowane termogramy DSC przedstawiające denaturację DNA w obecności osmolitów: A – glicyny, B – *N*-metyloglicyny, C – *N,N*-dimetyloglicyny, D – *N,N,N*-trimetyloglicyny.. Numerami oznaczono wzrastające stężenie osmolitu. Linią czerwoną zaznaczony jest termogram denaturacji DNA w roztworze wodnym bez osmolitu.

8.1.1.2 Kalorymetria ITC

Uzyskane z wykorzystaniem kalorymetrii ITC wartości entalpii oddziaływania osmolitów z solą sodową DNA, jonami sodu i wodą na poszczególnych etapach miareczkowania, ekstrapolowałam do nieskończonego rozcieńczenia tych osmolitów w roztworze. Otrzymane wyniki zamieściłam w Tabeli 5.

Z zależności przedstawionej na Rysunku 17 wynika, że dodawaniu glicyny i *N*-metyloglicyny do roztworu wodnego soli sodowej DNA towarzyszy niewielki efekt endotermiczny. Oddziaływanie *N,N*-

dimetyloglicyny i *N,N,N*-trimetyloglicyny z DNA jest natomiast procesem egzotermicznym o niewielkiej wartości.

Tabela 5. Efekty cieplne charakteryzujące oddziaływanie osmolitów z cząsteczkami wody, jonami sodowymi z solą sodową DNA.

	$Q_{\text{NaDNA}}^{\text{a}}$ <i>kJ/mol</i>	U_{95}^{b}	$Q_{\text{Na}^+}^{\text{c}}$ <i>kJ/mol</i>	U_{95}^{b}	$Q_{\text{H}_2\text{O}}^{\text{d}}$ <i>J/mol</i>	U_{95}^{b}
Glicyna	5,25	0,58	-2,89	0,85	43,87	2,30
<i>N</i> - metyloglicyn a	8,30	0,61	-2,01	0,46	29,41	1,86
<i>N,N</i> - dimetyloglicy na	-0,70	0,30	-1,58	0,41	3,46	1,17
<i>N,N,N</i> - trimetyloglic yna	-2,90	0,37	0,13	0,30	-1,00	1,35

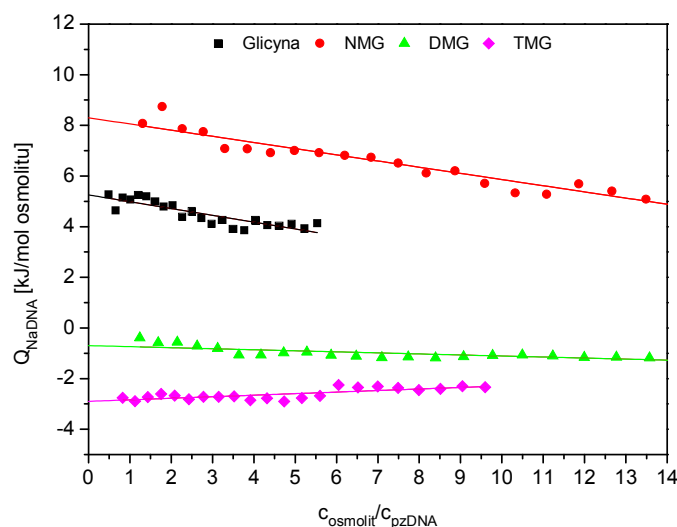
a – wartość entalpii oddziaływania soli sodowej kwasu deoksyrybonukleinowego (NaDNA) z osmolitem ekstrapolowana do nieskończonego rozcieńczenia osmolitu

b – niepewność rozszerzona pomiaru dla poziomu ufności równego 95%

c - wartość entalpii oddziaływania jonów sodowych z osmolitem ekstrapolowana do nieskończonego rozcieńczenia osmolitu

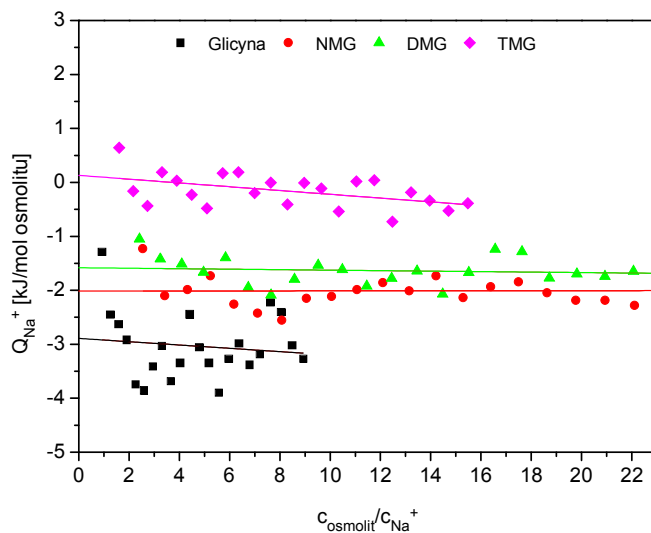
d - wartość entalpii oddziaływania wody z osmolitem ekstrapolowana do nieskończonego rozcieńczenia osmolitu

Wyznaczony globalny efekt entalpowy towarzyszący oddziaływaniu osmolitu z DNA składa się z wielu cząstkowych efektów towarzyszących: (a) efektu przynajmniej częściowego burzenia sfery hydratacyjnej osmolitu oraz sfery hydratacyjnej soli sodowej DNA (efekt endotermiczny), (b) efektu oddziaływań elektrostatycznych, kontaktów molekularnych i ewentualnych oddziaływań specyficznych między osmolitem i NaDNA (efekt egzotermiczny), (c) efektu rekonstrukcji hydratacji oddziałującego układu cząsteczek (efekt egzotermiczny) oraz (d) efektu zmiany energii wewnętrznej NaDNA spowodowanego oddziaływaniem, na skutek zmiany struktury DNA, zmiany energii wiązań wodorowych między komplementarnymi zasadami, zmiany energii oddziaływań typu π - π pomiędzy zasadami, efektu energetycznego towarzyszącego ewentualnemu przemieszczeniu jonu Na^+ w sferze solwatacyjnej grupy fosforanowej DNA.



Rysunek 17. Zależność entalpii oddziaływania soli sodowej DNA z glicyną i jej *N*-metylopochodnymi od stosunku stężeń osmolitu i par zasad DNA w roztworze. Punkty zostały przybliżone prostymi, które posłużyły do ekstrapolowania otrzymanych zależności do nieskończonego niskiego stężenia osmolitu.

Analizie poddane zostało również oddziaływanie jonów Na^+ z osmolitami (Rysunek 18). Określenie entalpii tego procesu jest konieczne ze względu na obecność jonów sodowych w roztworach zawierających DNA.



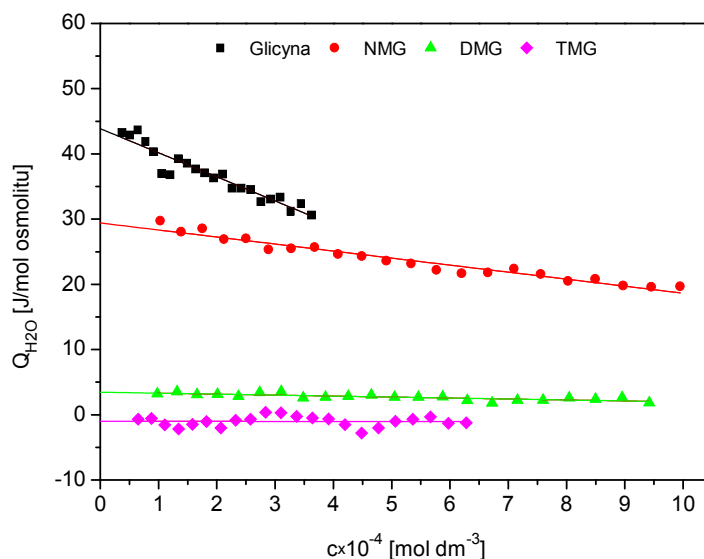
Rysunek 18. Zależność entalpii oddziaływania jonów sodowych z glicyną i jej *N*-metylowymi pochodnymi od stosunku stężeń osmolitu i jonów sodowych w roztworze. Punkty zostały przybliżone prostymi, które posłużyły do ekstrapolowania otrzymanych zależności do nieskończonego niskiego stężenia osmolitu.

Zauważyć można, że proces oddziaływania jonów sodowych z glicyną, *N*-metyloglicyną i *N,N*-dimetyloglicyną jest słabo egzotermiczny. Występuje tutaj pewnego rodzaju prawidłowość, a mianowicie zwiększanie liczby podstawników metylowych w pochodnych glicyny powoduje zmniejszenie egzotermicznego efektu oddziaływania z badanymi kationami. Ponadto dla *N*-metyloglicyny i *N,N*-dimetyloglicyny efekt ten można uznać za stały i niezależny od stężenia osmolitu w badanej mieszaninie. Natomiast, dodawanie glicyny i *N,N,N*-trimetyloglicyny do roztworu zawierającego jony Na^+ powoduje niewielki wzrost egzotermicznego efektu oddziaływania tych komponentów w środowisku wodnym.

Z powyższych zależności można wywnioskować, że oddziaływania jonów sodowych z wodą są nieco słabsze niż powstające oddziaływania pomiędzy tymi kationami a osmolitami. Jednakże efekt ten zmniejsza się wraz ze wzrostem liczby grup $-\text{CH}_3$ w badanych związkach i dla *N,N,N*-trimetyloglicyny obserwujemy właściwie zniesienie obu tych oddziaływań. Dzieje się tak wbrew oczekiwanemu wzrostowi zasadowości pochodnych glicyny ze wzrostem liczby grup metylowych¹⁹⁵. Zatem, rosnąca zawada przestrzenna grup metylowych przy koordynacji do jonów Na^+ jawi się jako czynnik determinujący obserwowaną prawidłowość lub/i istotna różnica w energii hydratacji glicyn w zależności od liczby podstawników metylowych.

Z obserwacji zależności entalpii rozcieńczenia poszczególnych osmolitów w funkcji ich stężenia (Rysunek 19) można zauważyć, że rozcieńczenie zarówno glicyny, *N*-metyloglicyny, jak i *N,N*-dimetyloglicyny jest procesem endotermicznym. W przypadku glicyny jest to efekt największy, a rozcieńczenie *N,N*-dimetyloglicyny wywołuje bardzo mały efekt cieplny. *N,N,N*-trimetyloglicyna, jako jedyna generuje minimalny efekt egzotermiczny.

Miareczkując wodę roztworem osmolitu zastępujemy niektóre oddziaływania woda – woda wody czystej nowymi oddziaływaniami woda osmolit, oraz oddziaływaniami woda – woda zaburzona przez osmolit w roztworze. Na podstawie badań hydratacji glicyn przeprowadzonych w naszej Katedrze¹⁹⁵, należałoby się spodziewać efektów egzotermicznych we wszystkich przypadkach osmolitów.

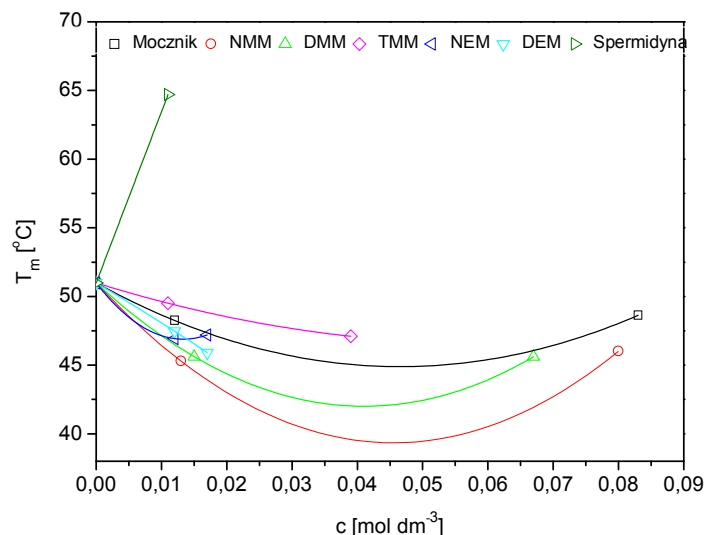


Rysunek 19. Zależność entalpii rozcieńczania roztworu glicyny i jej *N*-metylowych pochodnych od stężenia osmolitów. Punkty zostały przybliżone prostymi, które posłużyły do ekstrapolowania otrzymanych zależności do nieskończonego niskiego stężenia osmolitu.

Celem przeprowadzenia dyskusji ciepł rozcieńczania osmolitów w aspekcie oddziaływań osmolit-woda należałoby uwzględnić subtelne przesunięcie równowagi kwasowo-zasadowej w roztworze na skutek rozcieńczania i związany z tym efekt energetyczny. Wstępne uwzględnienie tego efektu nie tłumaczy jednak wciąż tego, że jest on endotermiczny. Wydaje się, że konieczne byłoby jeszcze uwzględnienie efektu zmniejszania się liczby cząsteczek wody biorących udział w hydratacji substancji rozpuszczonej ze wzrostem jej stężenia. Efekt taki jest powszechnie obserwowany jako wynik nakładania się sfer solwatacyjnych ze wzrostem stężenia¹⁹⁶. Należałoby zatem wziąć pod uwagę efekt energetyczny towarzyszący wzrostowi liczby cząsteczek wody w sferze hydratacyjnej substancji rozpuszczonej przy rozcieńczaniu roztworu (efekt endotermiczny). Odpowiednie badania wykraczają jednak poza zakres zaplanowany w ramach niniejszej pracy.

8.1.2 Mocznik i jego N-alkilowe pochodne

8.1.2.1 Kalorymetria DSC



Rysunek 20. Temperatura denaturacji DNA w obecności osmolitów w roztworze wodnym. Punkty przybliżone zostały funkcjami wielomianowymi drugiego stopnia oraz funkcjami liniowymi, które posłużyły do wyznaczenia pochodnych dla nieskończonego rozcieńczenia osmolitu w roztworze.

Mocznik i jego *N*-alkilowe pochodne, podobnie jak glicyny, obniżają temperaturę denaturacji DNA (Tabela 6), czyli mają destabilizujący wpływ na jego trwałość w roztworze. Zauważyć można również, że w przypadku wszystkich osmolitów z tej grupy nawet kilkukrotne zwiększenie ich stężenia w roztworze nie powoduje znaczących zmian temperatury denaturacji. Zatem mechanizm oddziaływania tych osmolitów na DNA jest słabo zależny od ich stężenia. Podobny nieliniowy przebieg zależności temperatury denaturacji DNA od stężenia osmolitu (Rysunek 20), jak w przypadku glicyn, może być tłumaczony analogicznie, jak już przedstawiono w rozdziale 8.1.1.1, jako pojawienie się stabilizujących oddziaływań osmolit-DNA przy wyższych stężeniach osmolitu.

Na podstawie analizy uzyskanych pochodnych dla nieskończonego rozcieńczenia osmolitu w roztworze (Tabela 6) widać, że największy wpływ na wartość temperatury denaturacji DNA mają: *N*-metylomocznik i *N*-etylomocznik. Efekt ten zmniejsza się w wyniku dodawania kolejnych

podstawników, w wyniku czego najmniejszy wpływ na stabilność DNA ma *N,N,N',N'*-tetrametylomocznik.

Tabela 6. Parametry temperaturowe charakteryzujące zmianę temperatury denaturacji DNA w obecności osmolitów.

	c^a $mol \cdot dm^{-3}$	T_m^b $^{\circ}C$	ΔT_m^c $^{\circ}C$	$(dT_m/dc)'_{c \rightarrow 0}^d$ $^{\circ}C \cdot dm^3 \cdot mol^{-1}$
DNA	0	50,99	0,00	0,00
Mocznik	0,012	48,25	-2,74	-245,22
	0,083	48,63	-2,36	
<i>N</i> -metylomocznik	0,013	45,29	-5,7	-474,96
	0,080	46,01	-4,98	
<i>N,N'</i> -dimetylomocznik	0,015	45,62	-5,37	-398,05
	0,067	45,61	-5,38	
<i>N,N,N',N'</i> - tetrametylomocznik	0,011	49,51	-1,48	-141,39
	0,039	47,10	-3,89	
<i>N</i> -etylomocznik	0,012	46,93	-4,06	-476,80
	0,017	47,20	-3,79	
<i>N,N'</i> -dietylomocznik	0,012	47,47	-3,52	-286,75
	0,017	45,91	-5,08	

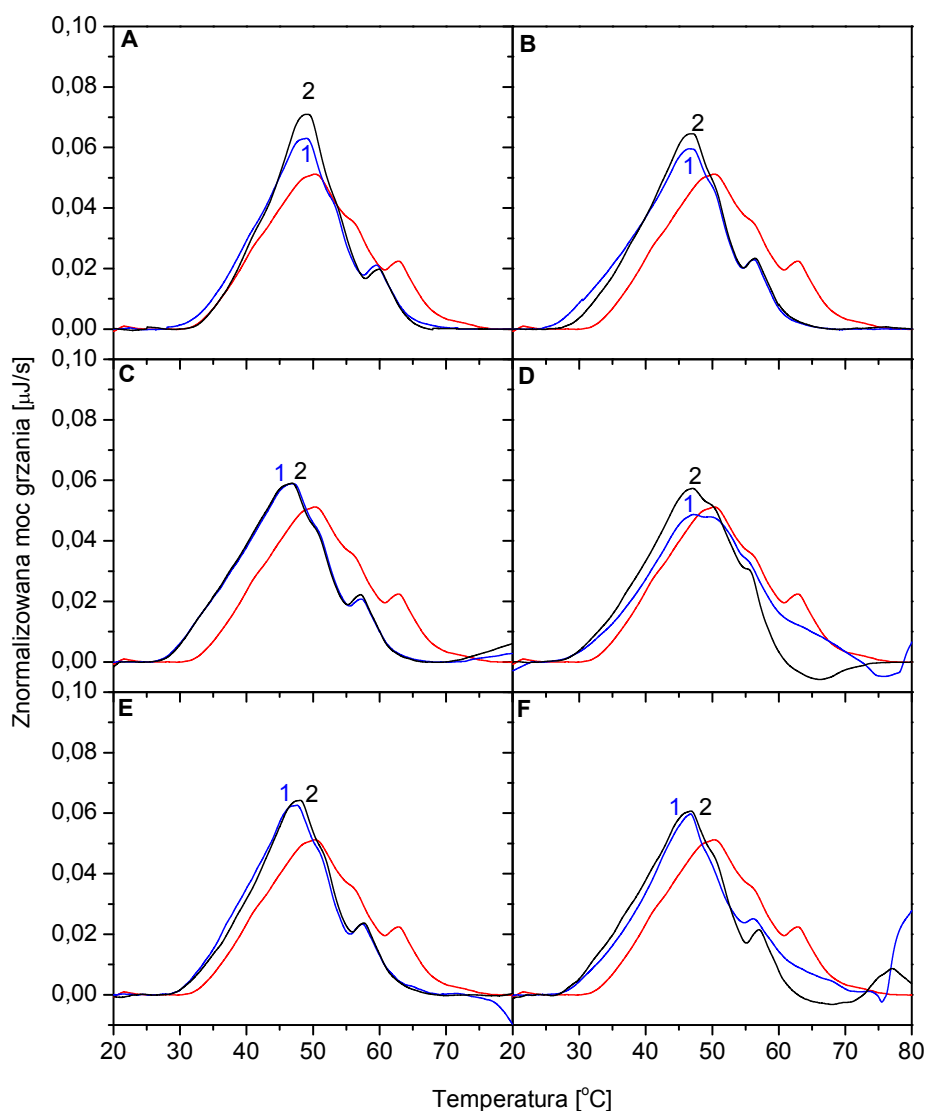
a – stężenie osmolitów

b – temperatura denaturacji DNA

c – zmiana temperatury denaturacji DNA w obecności określonego stężenia osmolytu w stosunku do czystego DNA

d – wartość pochodnej zależności temperatury denaturacji DNA w obecności osmolytu od jego stężenia w roztworze, wyznaczona dla nieskończonego rozcieńczenia osmolytu

Obserwacje te prowadzą do wniosku, że wpływ mocznika i jego *N*-alkilowych pochodnych na DNA zależy od liczby i rodzaju podstawników w cząsteczce mocznika. Podstawienie jednego protonu aminowego przez grupę metylową lub etylową wywołuje największy efekt. Zastąpienie kolejnego protonu na sąsiedniej grupie aminowej ten wpływ zmniejsza, podobnie, jak zwiększenie wymiarów podstawnika z metylowego na etylowy. Usunięcie wszystkich atomów wodoru i zastąpienie ich grupami metylowymi powoduje, że *N,N,N',N'*-tetrametylomocznik ma mniejszy wpływ na temperaturę denaturacji DNA niż sam mocznik.



Rysunek 21. Znormalizowane termogramy DSC przedstawiające denaturację DNA w obecności osmolitów: A – mocznika, B – *N*-metylomocznika, C – *N,N'*-dimetylomocznika, D – *N,N,N',N'*-tetrametylomocznika, E – *N*-etylomocznika, F – *N,N'*-dietylomocznika. Numerami oznaczono wzrastające stężenie osmolytu. Linia czerwoną zaznaczony jest termogram denaturacji DNA w roztworze wodnym bez osmolytu.

Analizując kształt termogramów odpowiadających roztworom DNA z osmolitami (Rysunek 21), zauważyć można wyraźne przesunięcie maksimum pików w kierunku niższych wartości temperatury. Jednocześnie profil denaturacji DNA w obecności osmolitów jest bardzo zbliżony do profilu

denaturacji czystego DNA w roztworze wodnym. Od tej reguły odbiegają *N,N,N',N'*-tetrametylomocznik i *N,N'*-dietylomocznik, ale w ich przypadku występują wyraźne dodatkowe efekty termiczne, które pojawiają się bezpośrednio po denaturacji modyfikując kształt termogramów. Zatem moczniki obniżają temperaturę denaturacji DNA nie wpływając jednocześnie na zależność stabilności DNA od jego sekwencji.

8.1.2.2 Kalorymetria ITC

W Tabeli 7 zamieszczone są wartości entalpii oddziaływania osmolitów z solą sodową DNA, jonami sodu i wodą, które zostały uzyskane z wykorzystaniem izotermicznej kalorymetrii miareczkowej.

Tabela 7. Efekty cieplne charakteryzujące oddziaływanie osmolitów z cząsteczkami wody, jonami sodowymi z solą sodową DNA.

	$Q_{\text{NaDNA}}^{\text{a}}$ <i>kJ/mol</i>	U_{95}^{b}	$Q_{\text{Na}^+}^{\text{c}}$ <i>kJ/mol</i>	U_{95}^{b}	$Q_{\text{H}_2\text{O}}^{\text{d}}$ <i>J/mol</i>	U_{95}^{b}
Mocznik	-2,12	0,216	-2,51	0,389	127,99	2,77
<i>N</i> -metylomocznik	-2,69	0,317	-2,65	0,630	32,07	2,16
<i>N,N'</i> - dimetylomocznik	-4,06	0,506	-3,02	0,446	0,62	2,26
<i>N,N,N',N'</i> - tetrametylomocznik	1,85	0,493	-8,89	0,972	-372,3	225
<i>N</i> -etylomocznik	-2,35	0,312	-3,21	0,920	-9,68	3,23
<i>N,N'</i> - dietylomocznik	-1,22	0,308	-5,62	1,07	-57,85	5,07

a – wartość entalpii oddziaływania soli sodowej kwasu deoksyrybonukleinowego (NaDNA) z osmolitem ekstrapolowana do nieskończonego rozcieńczenia osmolitu

b – niepewność rozszerzona pomiaru dla poziomu ufności równego 95%

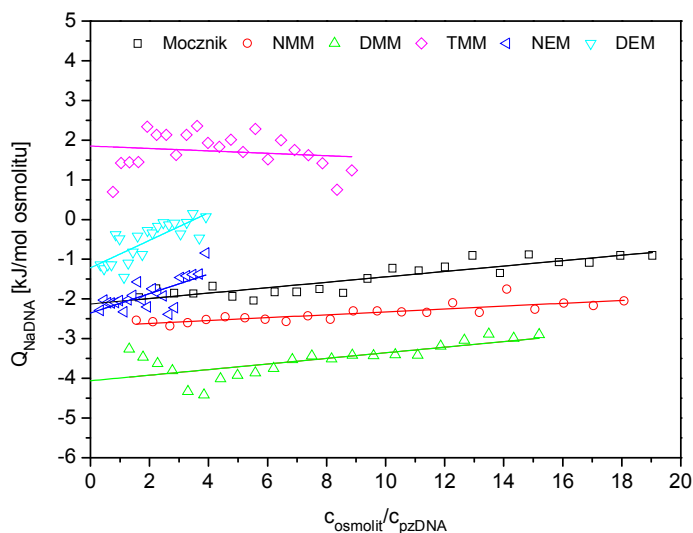
c - wartość entalpii oddziaływania jonów sodowych z osmolitem ekstrapolowana do nieskończonego rozcieńczenia osmolitu

d - wartość entalpii oddziaływania wody z osmolitem ekstrapolowana do nieskończonego rozcieńczenia osmolitu

Entalpia oddziaływania soli sodowej DNA z mocznikami przedstawiłam w przeliczeniu na 1 mol badanego osmolitu w zależności od stosunku stężeń osmolitu oraz par zasad DNA (Rysunek 22).

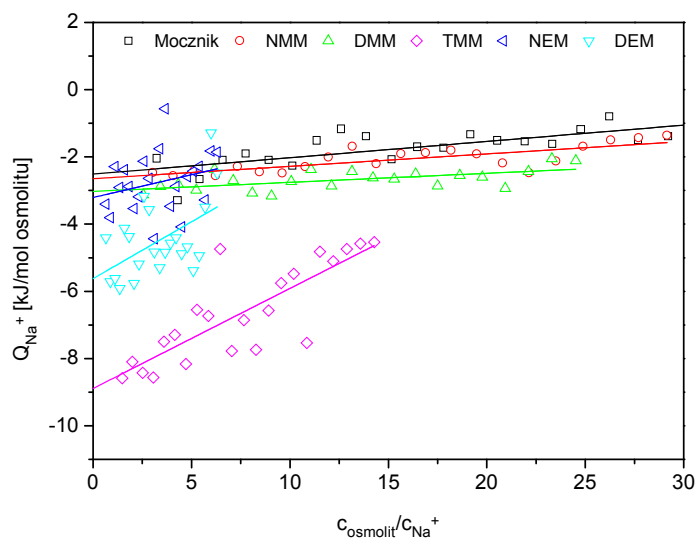
Mocznik oraz jego jedno- i dwupodstawione pochodne dodane do roztworu wodnego soli sodowej DNA wywołują niewielki efekt egzotermiczny. Jednocześnie niska wartość tych efektów energetycznych wskazuje na brak

bezpośrednich oddziaływań mocznika i jego pochodnych z DNA. Wyjątek w tej grupie badanych związków stanowi *N,N,N',N'*-tetrametylomocznik, którego oddziaływanie z DNA jest procesem endotermicznym o niewielkiej wartości.

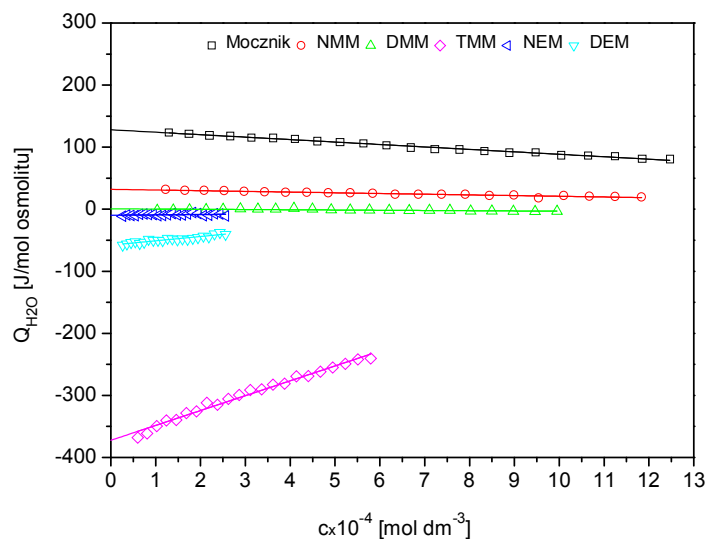


Rysunek 22. Zależność entalpii oddziaływania soli sodowej DNA z mocznikiem i jego *N*-alkilowymi pochodnymi od stosunku stężeń osmolitu i par zasad DNA w roztworze. Punkty zostały przybliżone prostymi, które posłużyły do ekstrapolowania otrzymanych zależności do nieskończenie niskiego stężenia osmolitu.

Jak widać na Rysunku 23, proces oddziaływania jonów sodowych z każdym z badanych osmolitów jest egzotermiczny. Można na podstawie tego wyniku wywnioskować, że dla wszystkich badanych układów oddziaływania jonów sodowych z wodą są słabsze niż powstające oddziaływania pomiędzy tymi kationami a osmolitami. Zwiększanie wartości tego efektu następuje w kolejności: mocznik < *N*-metylomocznik < *N,N'*-dimetylomocznik < *N*-etylomocznik < *N,N'*-dietylomocznik < *N,N,N',N'*-tetrametylomocznik. Szereg wskazuje na występowanie zależności oddziaływania tych związków z jonami sodu od liczby i długości podstawników w cząsteczce mocznika. Zwiększanie liczby i rozmiaru podstawników powoduje zwiększanie zasadowego charakteru tlenu karbonylowego w cząsteczce mocznika, z którym jony sodu oddziałują¹⁹⁵.



Rysunek 23. Zależność entalpii oddziaływania jonów sodowych z mocznikiem i jego *N*-alkilowymi pochodnymi od stosunku stężeń osmolitu i jonów sodowych w roztworze. Punkty zostały przybliżone prostymi, które posłużyły do ekstrapolowania otrzymanych zależności do nieskończenie niskiego stężenia osmolitu.



Rysunek 24. Zależność entalpii rozcieńczania roztworu mocznika i jego *N*-alkilowych pochodnych od stężenia osmolitów w roztworze. Punkty zostały przybliżone prostymi, które posłużyły do ekstrapolowania otrzymanych zależności do nieskończenie niskiego stężenia osmolitu.

Z obserwacji zależności ciepła rozcieńczania poszczególnych osmolitów od ich stężenia w badanym roztworze (Rysunek 24) można zauważyć, że rozcieńczanie zarówno mocznika, *N*-metylomocznika, jak i *N,N'*-dimetylomocznika jest procesem endotermicznym. Największą wartość osiąga efekt towarzyszący rozcieńczaniu mocznika, natomiast dla *N,N'*-dimetylomocznika jest on zbliżona do zera.

Rozcieńczanie *N*-etylomocznika, *N,N'*-dietylomocznika oraz *N,N,N',N'*-tetrametylomocznika wywołuje efekt egzotermiczny, przy czym dla *N,N,N',N'*-tetrametylomocznika obserwujemy efekt o dużej wartości, który maleje w wyniku dodawania tego związku do roztworu. W pozostałych przypadkach osmolitów z tej grupy rozcieńczanie wywołuje efekt cieplny utrzymujący się na stałym poziomie niezależnie od ich stężenia w roztworze.

Wnioskowanie na podstawie wyznaczonych wartości ciepła rozcieńczania na temat energii oddziaływania moczników z wodą jest zawodne w związku z koniecznością uwzględnienia, również w tym przypadku, przesunięć równowagi kwasowo – zasadowej w roztworze oraz zmianą liczebności cząsteczek wody w sferze hydratacyjnej na skutek rozcieńczania.

8.1.3 Spermidyna

Spermidyna, obok sperminy i putrescyny, należy do poliamin najczęściej spotykanych w komórkach ssaków. Są to małe cząsteczki polikationów, które biorą udział w wielu ważnych procesach biologicznych, takich jak regulacja ekspresji genów oraz aktywności enzymów, aktywacja syntezy DNA, czy proliferacja i różnicowanie komórek^{128, 197-202}. Z mojego punktu widzenia najbardziej interesującą funkcją poliamin jest ochrona DNA przez różnorodnymi czynnikami zewnętrznymi, poprzez bezpośrednie oddziaływanie z kwasami nukleinowymi^{128, 139}. Jednoznaczny mechanizm tego oddziaływania nie został jeszcze rozstrzygnięty i istnieje wiele hipotez na ten temat.

Jedno z najwcześniejszych odkryć, dotyczących wpływu poliamin na DNA, dokonanych przez Tabora¹³², dotyczy stabilizacji dwuniciowego DNA poprzez podwyższenie jego temperatury denaturacji nawet o 40 °C, w obecności dodatku buforu i soli w roztworze, w stosunku do takiego samego roztworu bez poliamin. Na podstawie tych obserwacji postulowano, że mechanizm tego efektu oparty jest zarówno na oddziaływaniach elektrostatycznych pomiędzy protonowanymi grupami aminowymi poliamin,

a ujemnie naładowanymi grupami fosforanowymi^{115, 203}, jak również na bezpośrednich oddziaływaniach poliamin z zasadami DNA^{204, 205}.

Tabela 8. Parametry temperaturowe charakteryzujące zmianę temperatury denaturacji DNA w obecności spermidyny.

	c^a $mol\ dm^{-3}$	T_m^b $^{\circ}C$	ΔT_m^c $^{\circ}C$	$(dT_m/dc)_{c \rightarrow 0}^d$ $^{\circ}C \cdot dm^3 \cdot mol^{-1}$
DNA	0	50,99	0	0
Spermidyna	0,011	64,70	+13,71	1246

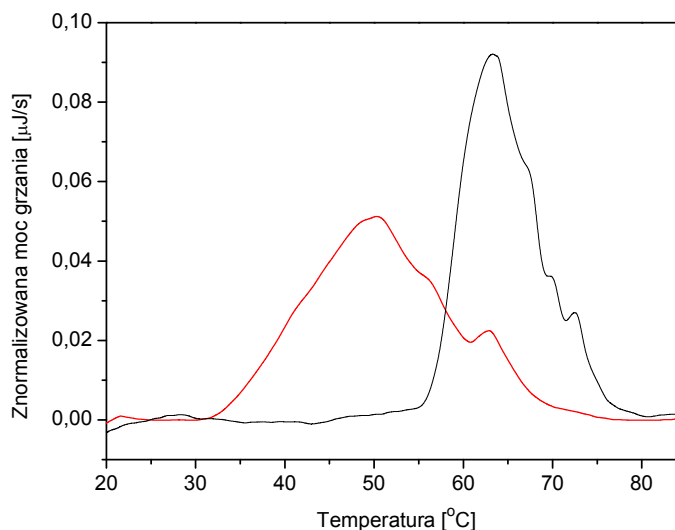
a – stężenie osmoliotów

b – temperatura denaturacji DNA

c – zmiana temperatury denaturacji DNA w obecności określonego stężenia osmoliotu w stosunku do czystego DNA

d – wartość pochodnej zależności temperatury denaturacji DNA w obecności osmoliotu od jego stężenia w roztworze, wyznaczona dla nieskończonego rozcieńczenia osmoliotu

Spermidyna została użyta przeze mnie, jako związek o potwierdzonym bezpośrednim oddziaływaniu z kwasami nukleinowymi. Wyniki uzyskane z wykorzystaniem tej poliaminy miały potwierdzić bądź wykluczyć ewentualną tezę o bezpośrednim oddziaływaniu badanych przeze mnie osmoliotów z DNA.



Rysunek 25. Znormalizowany termogram DSC przedstawiający denaturację DNA w obecności spermidyny – linia czarna. Linia czerwoną zaznaczony jest termogram denaturacji DNA w roztworze wodnym bez spermidyny.

Jak wynika na podstawie parametrów temperaturowych uzyskanych z wykorzystaniem kalorymetrii DSC (Tabela 8), obecność spermidyny w roztworze z DNA podnosi jego temperaturę denaturacji o prawie 14 °C. Różnica w stosunku do przedstawionych powyżej danych literaturowych wynika prawdopodobnie z faktu, że w przypadku moich badań analizie poddany został roztwór wodny nie buforowy. W odróżnieniu od pozostałych badanych przeze mnie związków, czyli glicyny, mocznika i ich pochodnych, spermidyna wyraźnie stabilizuje DNA, co widać również na Rysunkach 15 i 20.

Na termogramie DSC (Rysunek 25), poza przesunięciem maksimum piku w kierunku wyższych wartości temperatury, widać również wyraźne zwężenie profilu denaturacji przy zachowaniu złożoności jego konturu. Można stąd wywnioskować, że spermidyna wzmacnia strukturę DNA i nie powoduje uniezależnienia jego temperatury denaturacji od sekwencji zasad. Za zdolność do silnego podwyższania temperatury denaturacji DNA odpowiedzialne są bezpośrednio oddziaływania dodatnio naładowanej cząsteczki spermidyny z dwuniciowym łańcuchem DNA.

Uzyskane z wykorzystaniem kalorymetrii ITC dane zostały zamieszczone w Materiałach uzupełniających (Rozdział 13). Potwierdzają one, że mechanizm oddziaływania DNA ze spermidyną znacząco różni się od obserwowanego w przypadku pozostałych związków.

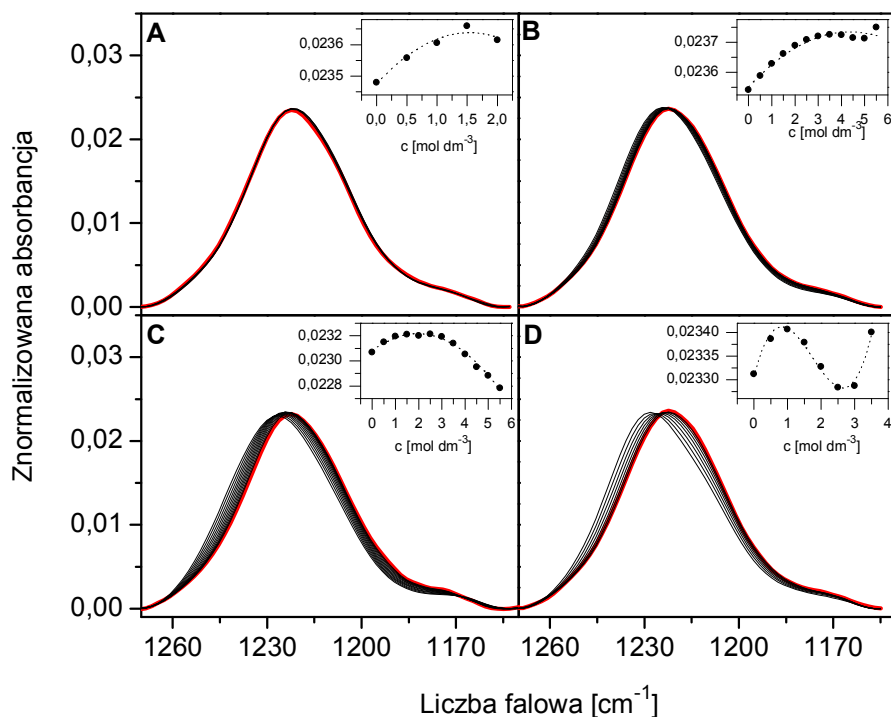
8.2 Analiza danych widmowych FTIR

8.2.1 Zmiany widmowe DNA w funkcji stężenia osmolitów

8.2.1.1 Glicyna i jej *N*-metylo pochodne

Na wstępie chciałam zaznaczyć, że od tego momentu na rysunkach prezentujących zależności między różnymi wielkościami charakterystyki zmian strukturalnych i oddziaływań w badanych układach przedstawiono liniowe linie regresji, bądź nieliniowe reprezentacje uzyskanych zależności. Sugerowane zależności nieliniowe mają na celu przede wszystkim, ułatwienie sposobu prowadzenia dyskusji w aspekcie interpretacji wyników. Mają one znaczenie pomocnicze i nie pretendują do pełnienia roli „korelacji” między odpowiednimi wielkościami.

Przesunięcie pasma 1222 cm^{-1} zależy wyraźnie od liczby grup metylowych w cząsteczce osmolitu. Jak widać na Rysunku 26, pasmo będące głównym markerem formy B-DNA nie zmienia swojego położenia pod wpływem glicyny w badanym zakresie stężeń, natomiast zwiększanie stężenia *N*-metyloglicyny w roztworze wodnym DNA powoduje przesunięcie tego pasma o 3 cm^{-1} , *N,N*-dimetyloglicyny o 5 cm^{-1} , a *N,N,N*-trimetyloglicyny aż o 8 cm^{-1} w kierunku wyższych liczb falowych. Należy zaznaczyć, że tak duże przesunięcie pasma pod wpływem *N,N,N*-trimetyloglicyny następuje przy stężeniu $3.5\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ tego osmolitu podczas, gdy w przypadku *N*-metyloglicyny i *N,N*-dimetyloglicyny, nawet wyższe stężenie nie powoduje większego przesunięcia. Intensywność pasma zmienia się podobnie dla wszystkich osmolitów. Początkowo wysokość pasma zwiększa się powoli, osiąga punkt maksymalny i zaczyna maleć. W przypadku *N*-metyloglicyny i *N,N,N*-trimetyloglicyny udało się uzyskać stężenie, powyżej którego intensywność pasma zaczyna ponownie rosnać. Na przykładzie zależności intensywności pasma od stężenia osmolitu widać, że mechanizm wpływu glicyn na DNA jest złożony i podzielony na etapy, których przebieg zależy od stężenia osmolitu.

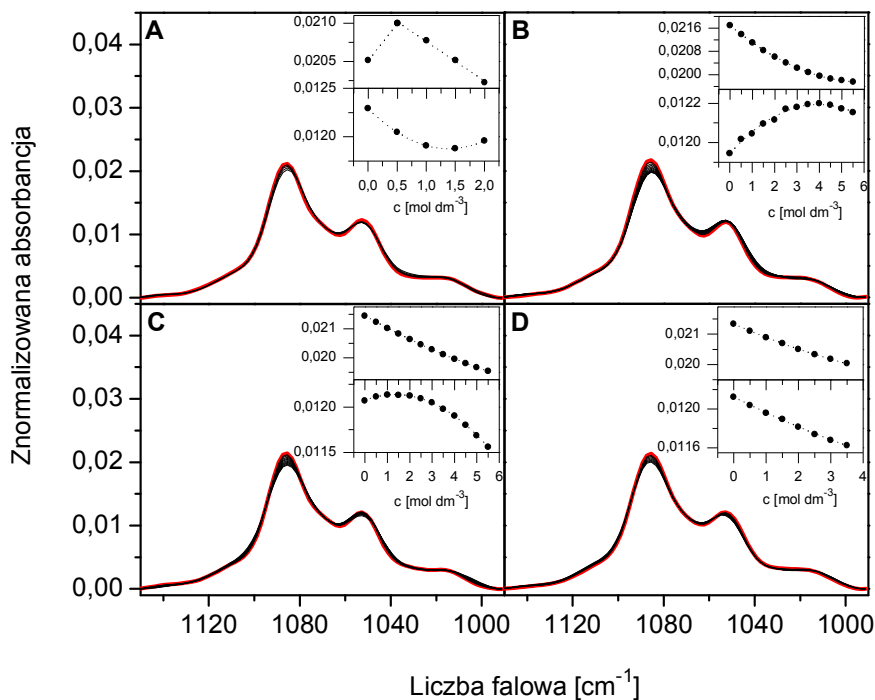


Rysunek 26. Seria widm DNA w zakresie pasma 1222 cm^{-1} w obecności osmolitów ($0.0\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ stężenie – linia czerwona, pozostałe stężenia – linia czarna). Widma dla glicyny (A), *N*-metyloglicyny (B), *N,N*-dimetyloglicyny (C) i *N,N,N*-trimetyloglicyny (D). We wstawkach znajdują się zależności wysokości pasma 1222 cm^{-1} od stężenia osmolitu.

Dodatek poszczególnych osmolitów powoduje stopniowe zmniejszanie intensywności kolejnego rozważanego pasma przy 1086 cm^{-1} wraz ze wzrostem stężenia osmolitu (Rysunek 27). W tym przypadku glicyna wywołuje niewielki efekt, w przypadku *N*-metyloglicyny obniżenie intensywności pasma jest dużo bardziej widoczne. *N,N*-dimetyloglicyna oraz *N,N,N*-trimetyloglicyna już przy najniższym stężeniu powodują znaczne obniżenie intensywności pasma 1086 cm^{-1} względem czystego DNA w wodzie, a w miarę wzrostu stężenia, podobnie jak w przypadku pozostałych osmolitów, następuje stopniowe zmniejszenie jego intensywności.

Pasmu 1086 cm^{-1} towarzyszy pasmo przy 1053 cm^{-1} (Rysunek 27). Intensywność tego pasma zmniejsza się w wyniku zwiększania stężenia poszczególnych osmolitów i tylko *N*-metyloglicyna odbiega od tego trendu. W przypadku *N,N,N*-trimetyloglicyny następuje niewielki przesunięcie pasma

w kierunku wyższych liczb falowych. Należy również zauważyć, że te dwa pasma z rozważanego zakresu, pomimo zauważalnych zmian, są w porównaniu z pozostałymi rozpatrywanymi pasmami, mało wrażliwe na wpływ osmolitów.

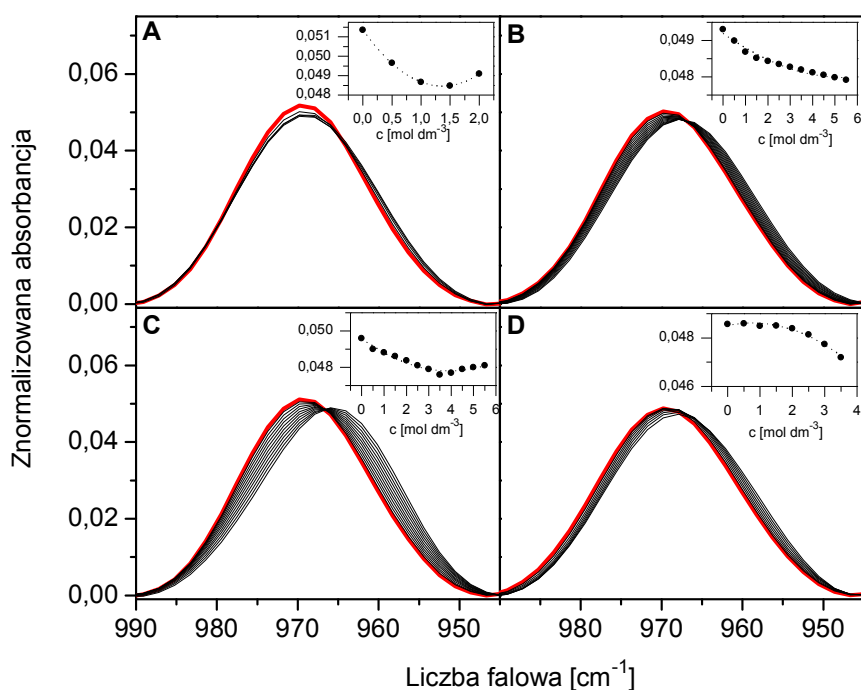


Rysunek 27. Seria widm DNA w zakresie pasm 1086 i 1053 cm^{-1} w obecności osmolitów (0.0 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ stężenie – linia czerwona, pozostałe stężenia – linia czarna). Widma dla glicyny (A), *N*-metyloglicyny (B), *N,N*-dimetyloglicyny (C) i *N,N,N*-trimetyloglicyny (D). We wstawkach znajdują się zależności wysokości pasma 1086 cm^{-1} (górną) i 1053 cm^{-1} (dół) od stężenia osmolitu.

Zwiększanie stężenia glicyny w roztworze powoduje niewielkie przesunięcie kolejnego pasma przy 970 cm^{-1} w kierunku niższych liczb falowych oraz zmniejszenie jego intensywności i poszerzenie. Podobne efekty, ale znacznie silniej zaznaczone, mają miejsce przy zwiększaniu stężenia *N*-metyloglicyny, *N,N*-dimetyloglicyny oraz *N,N,N*-trimetyloglicyny (Rysunek 28). Na uwagę zasługuje fakt, że największe zmiany zauważamy w przypadku *N,N*-dimetyloglicyny.

Pasma w widmie DNA są silniejsze i węższe przy niskich stężeniach osmolitu, co oznacza, że struktura DNA jest wtedy bardziej uporządkowana¹⁸². Można stąd wnioskować, że zmniejszenie intensywności oraz poszerzenie rozpatrywanych pasm związane jest z postępującą, w wyniku zwiększania

stężenia osmolitów, dehydratacją DNA. Podczas dehydratacji oprócz poszerzenia pasm zachodzą także zmiany w ich położeniu. Falk⁶² wykazał, że podczas zwiększania wilgotności próbki DNA zachodzi przesunięcie pasma $1240 \pm 1.5 \text{ cm}^{-1}$ do 1220 cm^{-1} . Podobnie dzieje się w przypadku pozostałych rozpatrywanych pasm. Hydratacja powoduje przesunięcie pasma $1089 \pm 1 \text{ cm}^{-1}$ do $1086 \pm 1 \text{ cm}^{-1}$, a pasmo przy $1066 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$ do $1052 \pm 1 \text{ cm}^{-1}$. Jedynie pasmo $962 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$ przesuwa się w wyniku zwiększania wilgotności próbki w kierunku wyższych liczb falowych do $970 \pm 1 \text{ cm}^{-1}$.



Rysunek 28. Seria widm DNA w zakresie pasma 970 cm^{-1} w obecności osmolitów ($0.0 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ stężenie – linia czerwona, pozostałe stężenia – linia czarna). Widma dla glicyny (A), *N*-metyloglicyny (B), *N,N*-dimetyloglicyny (C) i *N,N,N*-trimetyloglicyny (D). We wstawkach znajdują się zależności wysokości pasma 970 cm^{-1} od stężenia osmolytu.

Przesunięcia wymienionych pasm w przeciwnych kierunkach, niż opisane powyżej, są zatem spowodowane dehydratacją badanej próbki DNA, co potwierdza tezę, że dodatek osmolitów do roztworu wodnego DNA powoduje jego stopniowe odwodnienie. Proces ten jest zależny od rodzaju użytego osmolytu oraz jego stężenia w roztworze. W przypadku pasm: 1222 cm^{-1} , 1086 cm^{-1} i 1053 cm^{-1} , najmniejsze zmiany powoduje glicyna, a największe

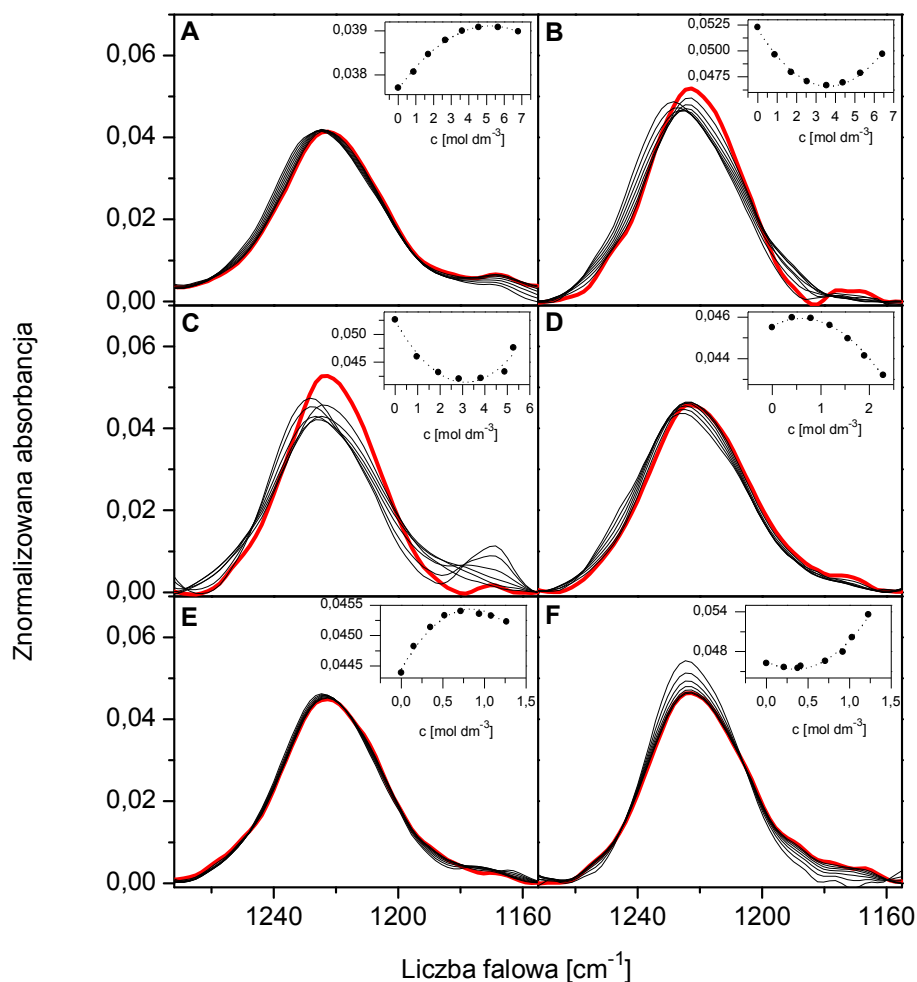
N,N,N-trimetyloglicyna. Zależy to od liczby grup metylowych obecnych w cząsteczce osmolitu. Im jest ich więcej, tym większe zmiany zauważamy w położeniu i kształcie poszczególnych pasm, świadczące o pogłębiającej się dehydratacji DNA. Tsuboi¹⁸² donosi, że od stopnia uwodnienia próbki DNA zależy jego konformacja. Forma A-DNA występuje w przewodzie przy wilgotności próbki powyżej 75% natomiast powyżej 92% przeważa forma B-DNA. Zatem można wnioskować, że odwodnienie próbki powoduje stopniowe przechodzenie formy B-DNA do formy A. Taka zmiana konformacji potwierdza również zachowanie pasma przy 970 cm⁻¹, jako pasma charakterystycznego dla formy B-DNA, związanego z drganiami wiązań C-C w szkieletie DNA. Przesunięcie tego pasma w kierunku niższych liczb falowych oznacza rozluźnienie struktury szkieletu DNA, czyli powstanie formy A-DNA. Na uwagę zasługuje fakt, że w przypadku tego pasma największe zmiany zauważamy dla *N,N*-dimetyloglicyny.

8.2.1.2 Mocznik i jego *N*-alkilowe pochodne

Kształt widma DNA niezaburzonego bez obecności osmolitu, przedstawionego dla wszystkich osmolitów, różni się w zależności od użytego osmolitu ze względu na oddzielny proces wstępnego opracowania widm, ale jest on spójny wewnątrz serii dla określonego osmolitu. Zachowanie pasma 1222 cm⁻¹ zależy od rodzaju podstawnika w cząsteczce mocznika (Rysunek 29). Dla podstawników metylowych zauważyć można wyraźne poszerzenie pasma oraz przesunięcie jego maksimum w kierunku wyższych liczb falowych. Dla mocznika jest to przesunięcie o 5 cm⁻¹, dla *N*-metylomocznika o 6 cm⁻¹ przy takim samym stężeniu, w obecności *N,N'*-dimetylomocznika przesuwa się o 6 cm⁻¹ i *N,N,N',N'*-tetrametylomocznika powoduje przesunięcie o 4 cm⁻¹ w stosunku do pasma DNA zmierzonego w czystej wodzie. Dodatkowo obserwujemy wyraźne zmniejszenie intensywności pasma 1222 cm⁻¹ dla metylowych pochodnych mocznika, przy czym w przypadku *N*-metylomocznika i *N,N*-dimetylomocznika obserwujemy wyraźną zmianę mechanizmu oddziaływania z DNA po przekroczeniu określonego stężenia.

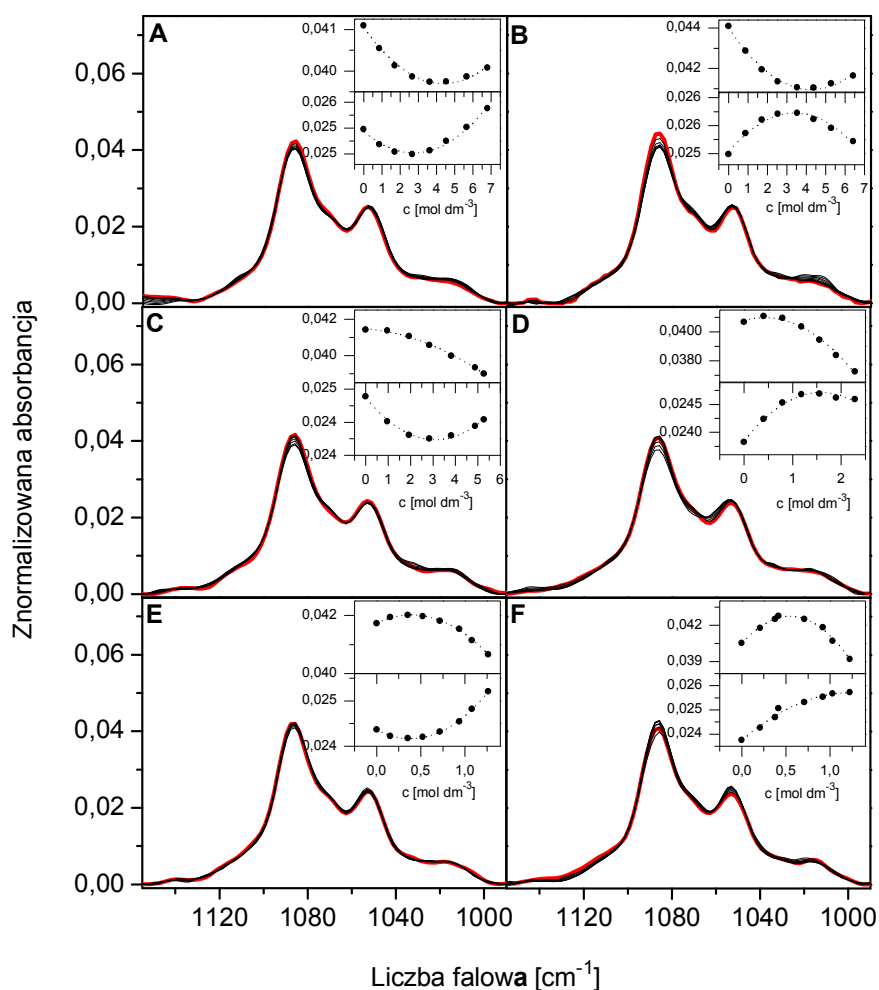
Pochodne etylowe mocznika powodują natomiast wzrost intensywności pasma 1222 cm⁻¹. Efekt ten jest szczególnie wyraźny w przypadku *N,N'*-dietylomocznika. Ponadto ma miejsce nieznaczne przesunięcie tego pasma

w kierunku wyższych liczb falowych. W przeciwieństwie do pochodnych metylowych, nie obserwujemy tutaj poszerzenia konturu pasma.



Rysunek 29. Seria widm DNA w zakresie pasma 1222 cm⁻¹ w obecności osmolitów (0.0 mol·dm⁻³ stężenie – linia czerwona, pozostałe stężenia – linia czarna). Widma dla mocznika (A), *N*-metylomocznika (B), *N,N'*-dimetylomocznika (C) i *N,N,N',N'*-tetrametylomocznika (D), *N*-etylomocznika (E), *N,N'*-dietylomocznika (F). We wstawkach znajdują się zależności wysokości pasma 1222 cm⁻¹ od stężenia osmolytu.

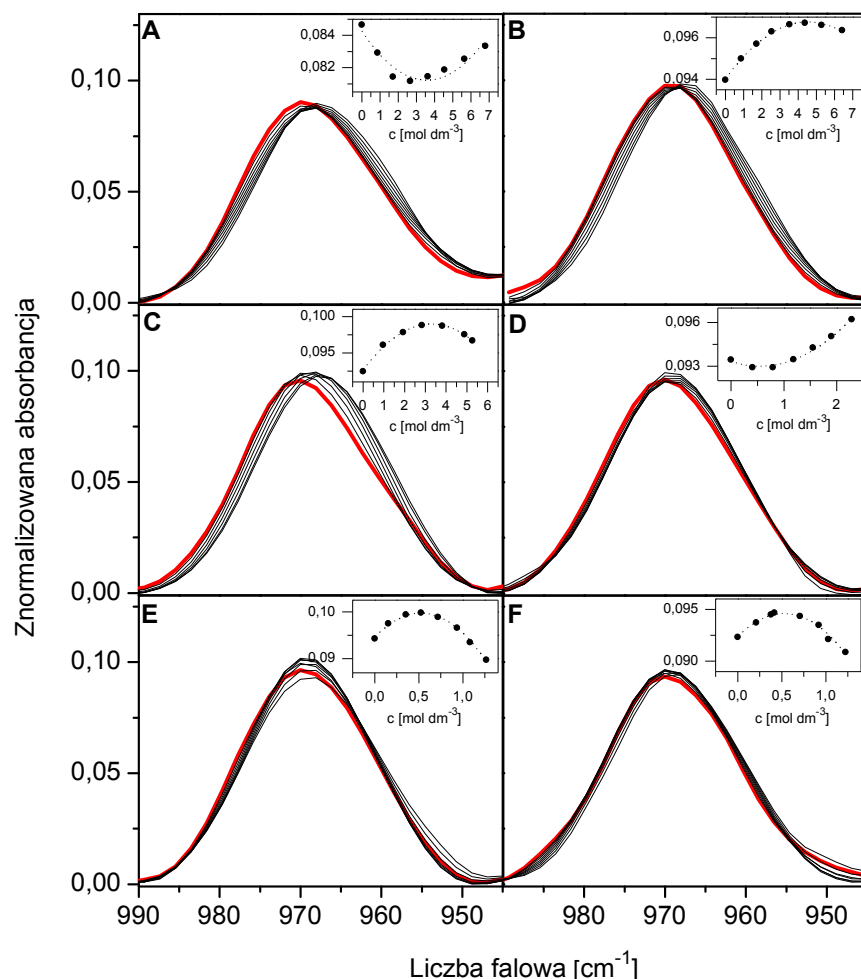
Obserwacja zależności wysokości pasma od stężenia osmolytu pozwala zauważyć, że proces oddziaływania moczników z DNA przebiega etapowo i zależy od stężenia osmolytu oraz rodzaju podstawnika alkilowego w cząsteczce mocznika.



Rysunek 30. Seria widm DNA w zakresie pasm 1086 i 1053 cm⁻¹ w obecności osmolitów (0.0 mol·dm⁻³ stężenie – linia czerwona, pozostałe stężenia – linia czarna). Widma dla mocznika (A), *N*-metylomocznika (B), *N,N*'-dimetylomocznika (C) i *N,N,N',N'*-tetrametylomocznika (D), *N*-etylomocznika (E), *N,N'*-dietylomocznika (F). We wstawkach znajdują się zależności wysokości pasma 1086 cm⁻¹ (góra) i 1053 cm⁻¹ (dół) od stężenia osmolytu.

Dodatek mocznika oraz jego pochodnych do roztworu wodnego DNA powoduje nieduże zmniejszenie intensywności pasma przy 1086 cm⁻¹, odpowiadającego drganiom symetrycznym grup PO₂⁻ w szkielecie DNA (Rysunek 30). Pasmu przy 1086 cm⁻¹ towarzyszy pasmo położone przy 1053 cm⁻¹. Jego zmiany wywołane przez analizowane osmolyty są również

niewielkie. Zatem można stwierdzić, że obszar ten jest mało wrażliwy na obecność w roztworze mocznika i jego pochodnych.



Rysunek 31. Seria widm DNA w zakresie pasma 970 cm^{-1} w obecności osmolitów ($0.0 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ stężenie – linia czerwona, pozostałe stężenia – linia czarna). Widma dla mocznika (A), *N*-metylomocznika (B), *N,N'*-dimetylomocznika (C) i *N,N,N',N'*-tetrametylomocznika (D), *N*-etylomocznika (E), *N,N'*-dietylomocznika (F). We wstawkach znajdują się zależności wysokości pasma 970 cm^{-1} od stężenia osmolytu.

W przypadku ostatniego analizowanego pasma przy 970 cm^{-1} (Rysunek 31) obserwujemy, wywołane przez wszystkie osmolyty, przesunięcie w kierunku mniejszych liczb falowych. Największe przesunięcie wywołał dodatek *N,N'*-dimetylomocznika do roztworu wodnego DNA, natomiast

najmniejsze zmiany tego rodzaju obserwujemy dla etylowych pochodnych mocznika. Ponadto zauważyć można, że *N,N,N',N'*-tertrametylomocznik zachowuje się podobnie, jak mocznik i oba te związki powodują spadek intensywności pasma, a po przekroczeniu określonego stężenia, jej wzrost. W obecności pozostałych pochodnych mocznika następuje początkowy wzrost intensywności, a po przekroczeniu określonego stężenia, spadek.

Zmniejszenie intensywności poszczególnych pasm oraz ich poszerzenie wywołane obecnością osmolitów związane jest z dehydratacją badanego DNA, postępującą w miarę zwiększania stężenia osmolitów. Dehydratacja DNA wywołuje rozluźnienie jego struktury i stopniowe przekształcenie formy B-DNA w kierunku formy A-DNA, a w skrajnym przypadku denaturację tej makrocząsteczki.

Analizując wpływ wszystkich badanych pochodnych mocznika oraz samego mocznika można stwierdzić, że największe zmiany wywołuje *N,N'*-dimetylomocznik. Etylowe pochodne mocznika powodują odmienne zachowanie analizowanego pasma przy 1222cm^{-1} .

8.2.2 Analiza chemometryczna wpływu osmolitów na widmo zaburzonego DNA

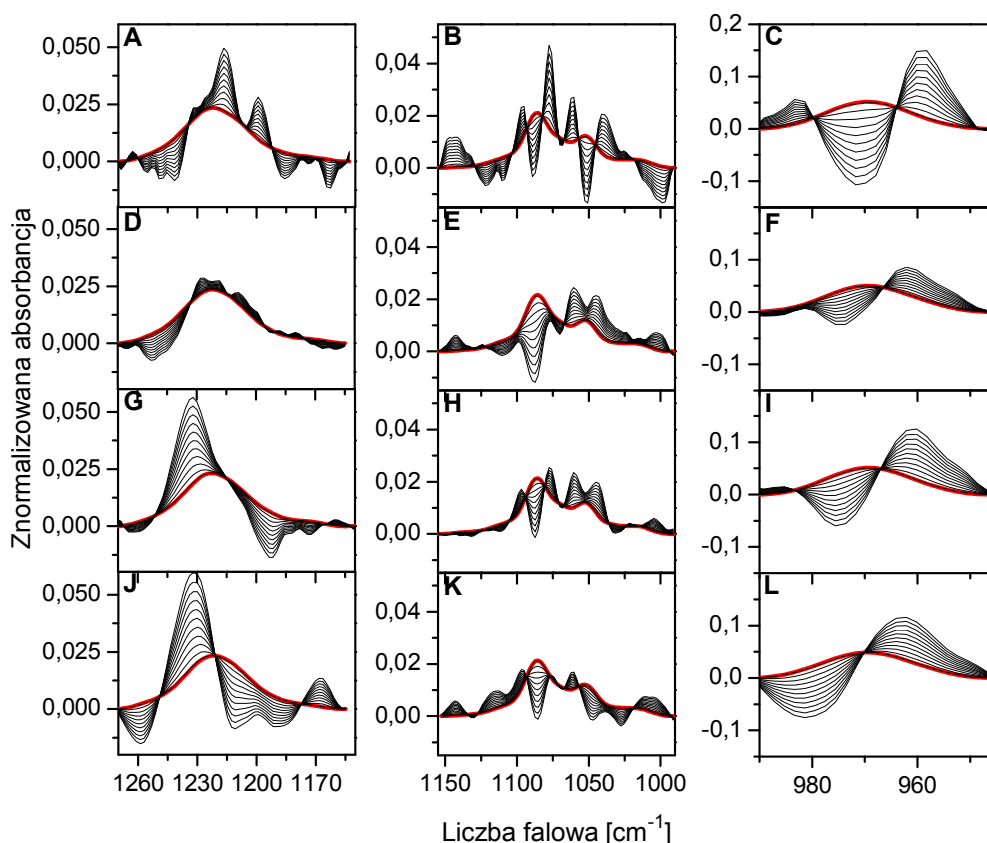
8.2.2.1 Glicyna i jej *N*-metylo pochodne

Otrzymano serie wyizolowanych i znormalizowanych widm DNA w obecności: glicyny i jej metylo pochodnych w zakresie występowania pasm: 1222 , 1086 , 1053 i 970 cm^{-1} przedstawione odpowiednio na Rysunkach 33, 35, 37.

Uzyskano również, w określonym zakresie wartości parametru $1/x_a$, serie próbnych widm DNA zaburzonego przez wybrane osmolity, z których jedynie kilka zostało przedstawionych na Rysunku 32A-L. Zwykle jednakże otrzymuje się i analizuje kilkaset próbnych widm zaburzonych dla każdego rozpatrywanego przypadku, aby uzyskać dobrą rozdzielczość map parametru $\Sigma\chi^2$.

Sposób wyznaczenia właściwego parametru $1/x_a$ został przedstawiony w rozdziale 7.4.6. Określenie wartości $1/x_a$ pozwala odnaleźć właściwe widmo zaburzone DNA w obecności osmolitu. Dla wszystkich widm zaburzonych przez glicynę i jej *N*-metylowe pochodne o różnych stężeniach zostały przeprowadzone analogiczne analizy. Z każdej z map można odczytać

właściwy parametr I/x_a odpowiadający określonemu stężeniu osmolitu. Możliwe jest dzięki temu uzyskanie dla każdego badanego stężenia właściwego widma zaburzonego DNA.

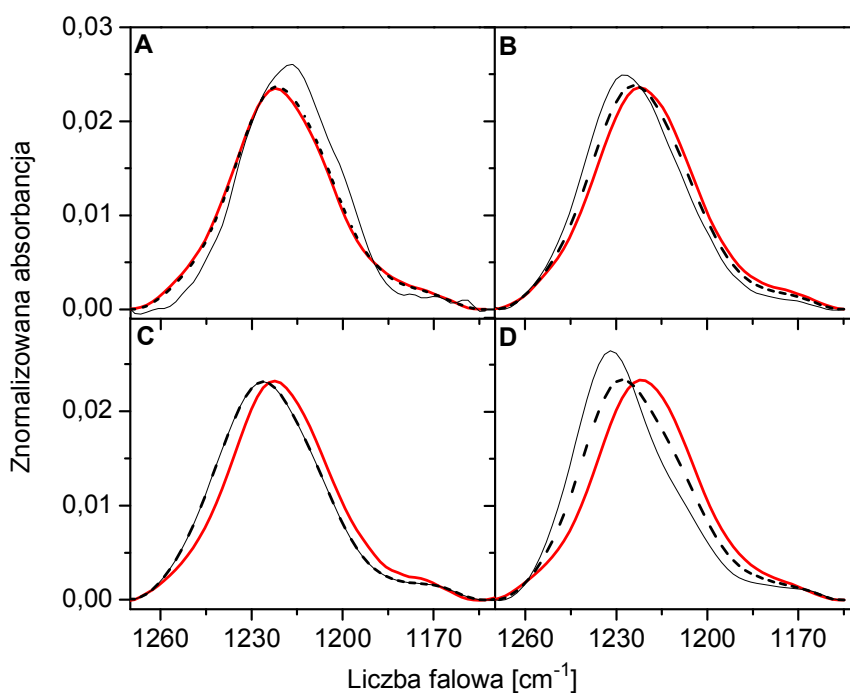


Rysunek 32. Niezaburzone widma DNA (czerwona linia) oraz serie próbnych widm zaburzonych (czarna linia) dla stężenia $0.5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ każdego z osmolitów: glicyna (A-C), *N*-metyloglicyna (D-F), *N,N*-dimetyloglicyna (G-I) i *N,N,N*-trimetyloglicyna (J-L). Przedstawione jest każde z rozpatrywanych pasm w trzech zakresach: $1270 - 1150 \text{ cm}^{-1}$ (A, D, G, J), $1150-990 \text{ cm}^{-1}$ (B, E, H, K), $990-945 \text{ cm}^{-1}$ (C, F, I, L)

Kształt wszystkich uzyskanych widm zaburzonych DNA różni się dla każdego z trzech badanych regionów w zależności od użytego osmolitu, jak i również od jego stężenia. Należy zatem przypuszczać, że w obrębie jednego badanego układu mechanizm oddziaływania osmolitu na DNA jest ściśle związany ze stężeniem danego związku w roztworze.

Widmo DNA w zakresie pasma przy 1222 cm^{-1}

W dyskusji wpływu osmolitów na DNA trzeba wyraźnie rozróżnić kwestię stopnia zmiany parametrów pasma oscylacyjnego oraz kwestię udziału zaburzenia (wyrażonego w %) w całej makrocząsteczce. W aspekcie interpretacji oddziaływań międzycząsteczkowych, stopień zaburzenia struktury jest parametrem ważniejszym. Wskazuje on na bezpośrednie, często specyficzne oddziaływanie. Wysoki udział zaburzenia może być natomiast skutkiem oddziaływań pośrednich, bądź zwyczajnym efektem zmiany otoczenia molekularnego cząsteczki zaburzonej.

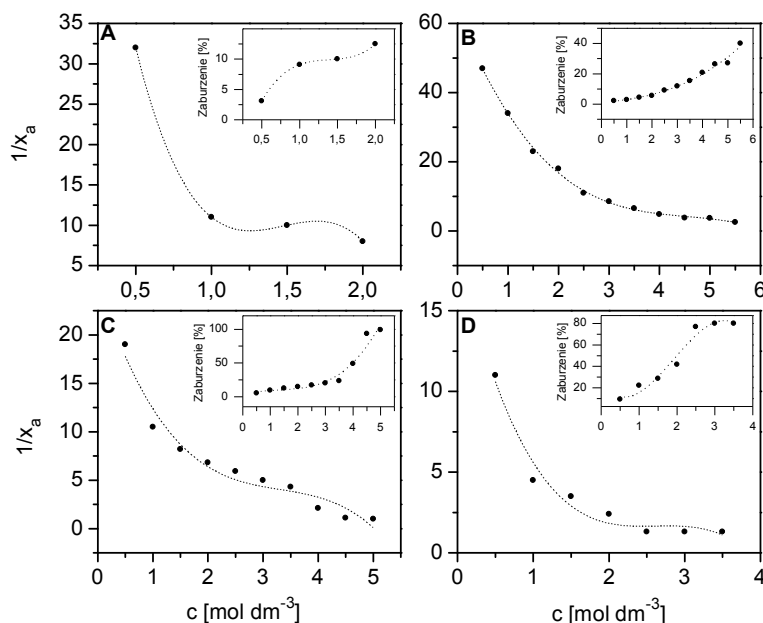


Rysunek 33. Widmo DNA w zakresie pasma 1222 cm^{-1} bez udziału osmolitu (linia czerwona), widmo DNA w obecności osmolitu (linia przerywana) i widmo zaburzone DNA (linia czarna) przy A - $2.0 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ glicyny, B - $5.5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ *N*-metyloglicyny, C - $5.0 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ *N,N*-dimetyloglicyny i D - $3.5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ *N,N,N*-trimetyloglicyny.

Pasmo przy ok. 1222 cm^{-1} jest charakterystyczne dla dwuniciowej formy B-DNA (Rysunek 33). Z serii uzyskanych dla tego obszaru widm zaburzonych można zauważyć, że ich położenie i kształt zależą od występującego w układzie osmolitu.

W przypadku glicyny widmo zaburzone przesunięte jest w stronę niższych liczb falowych i ma wyższą intensywność niż widmo DNA bez udziału glicyny (Rysunek 33A, linia czarna). Zwiększanie stężenia osmolitu powoduje wzrost zawartości procentowej formy zaburzonej DNA, która dla najwyższego stężenia osiąga 12.5 % (Tabela 16, Rysunek 34A - wstawka).

W przypadku *N*-metyloglicyny obserwujemy przesunięcie pasma DNA zaburzonego w kierunku wyższych liczb falowych (Rysunek 33B). Ponadto widmo zaburzone DNA dla *N*-metyloglicyny wraz ze wzrostem stężenia zwiększają swoją intensywność i poszerza się. Ostateczna zawartość procentowa formy zaburzonej dla najwyższego badanego stężenia tego osmolitu wynosi 40% (Tabela 16).



Rysunek 34. Parametr $1/x_a$ wyznaczony dla pasma 1222 cm^{-1} DNA w obecności: glicyny (A), *N*-metyloglicyny (B), *N,N*-dimetyloglicyny (C), *N,N,N*-trimetyloglicyny (D). We wstawkach znajduje się procentowe zaburzenie struktury DNA w obserwowanym zakresie w obecności odpowiednich osmolitów.

Zawartość procentowa formy zaburzonej DNA dla *N,N*-dimetyloglicyny rośnie liniowo do stężenia $3.5\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, a potem gwałtownie wzrasta osiągając wartość 99 % przy najwyższym stężeniu osmolitu (Tabela 16, Rysunek 34 C). Na Rysunku 33C widoczne jest, że widmo formy zaburzonej DNA pokrywa się prawie całkowicie z widmem DNA w obecności *N,N*-dimetyloglicyny

o najwyższym z badanych stężeń. Oznacza to, że prawie cała forma badanego DNA została zaburzona przez obecną w roztworze *N,N*-dimetyloglicynę. Ponadto, podobnie jak w przypadku *N*-metyloglicyny obserwujemy przesunięcie pasma formy zaburzonej w kierunku wyższych liczb falowych.

N,N,N-trimetyloglicyna powoduje także stopniowy wzrost intensywności i przesuwanie widma zaburzonego DNA w kierunku wyższych liczb falowych. Jednakże w przypadku tego osmolitu obserwujemy największe przesunięcie pasma aż do ok. 1232 cm^{-1} , przy maksymalnym stężeniu osmolitu (Rysunek 33D). Zawartość procentowa formy zaburzonej DNA osiąga maksymalną wartość 80%. Przebieg jej zależności od stężenia jest złożony i wskazuje, że *N,N,N*-trimetyloglicyna powoduje najszybsze zmiany struktury w tym zakresie widma spośród rozpatrywanych osmolitów. Po osiągnięciu stężenia $2\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ilość struktury zaburzonej gwałtownie wzrasta, a od $2.5\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ dalszy wzrost stężenia osmolitu nie powoduje już znacznych zmian (Tabela 16, Rysunek 34D).

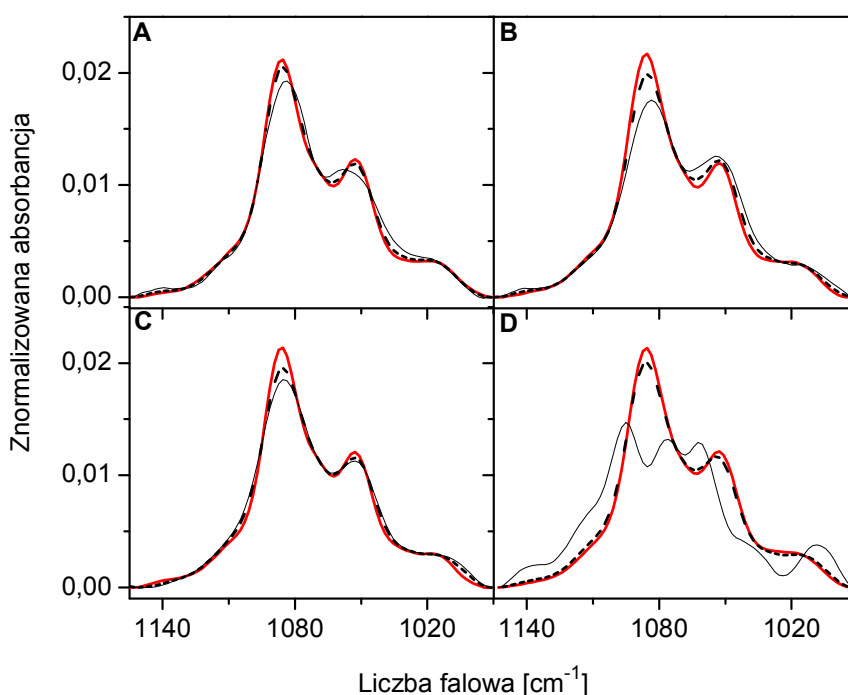
Podsumowanie

Pasmo przy ok. 1222 cm^{-1} związane jest z asymetrycznymi drganiami rozciągającymi grup fosforanowych w DNA. Jego przesunięcie w kierunku wyższych liczb falowych jest skutkiem zmniejszenia aktywności wody w próbce, a co za tym idzie, zmniejszenia oddziaływań wody z grupami fosforanowymi i częściowym przejściem z formy B do A-DNA⁶². Na podstawie wyizolowanych pasm DNA zaburzonego wnioskować można, że największe zaburzenie struktury DNA w obrębie grup fosforanowych wywołuje *N,N,N*-trimetyloglicyna, która nawet przy niskich stężeniach powoduje szybko postępujące zmiany. Analizując zmiany wartości parametru $1/x_a$ oraz procentowej zawartości struktury zaburzonego DNA, zauważyć można dwa wyraźne etapy oddziaływania DNA z osmolitami zależne od ich stężenia.

W przypadku *N,N,N*-trimetyloglicyny obserwujemy największe przesunięcie pasma formy zaburzonej, które związane jest z przekształceniem B-DNA w A-DNA. Maksimum pasma zaburzonego osiąga położenie 1232 cm^{-1} , które jest zbliżone do wartości, przy której występuje pasmo będące markerem formy A-DNA¹⁸¹. Można zatem stwierdzić, że spośród badanych osmolitów, *N,N,N*-trimetyloglicyna jest czynnikiem, który w najwyższym stopniu powoduje zmianę konformacji DNA. Najmniej rozległy wpływ

(procentowy udział zaburzenia) na grupy fosforanowe DNA mają *N*-metyloglicyna i glicyna. Glicyna wyróżnia się spośród pozostałych osmolitów tej grupy wyjątkowym przesunięciem pasma zaburzonego w kierunku niższych liczb falowych. Może to oznaczać silniejsze oddziaływania DNA z wodą w obecności glicyny lub bezpośrednie tworzenie wiązania wodorowego między grupą aminową glicyny i grupą fosforanową DNA.

Widmo DNA w zakresie pasm 1086 i 1054 cm^{-1}

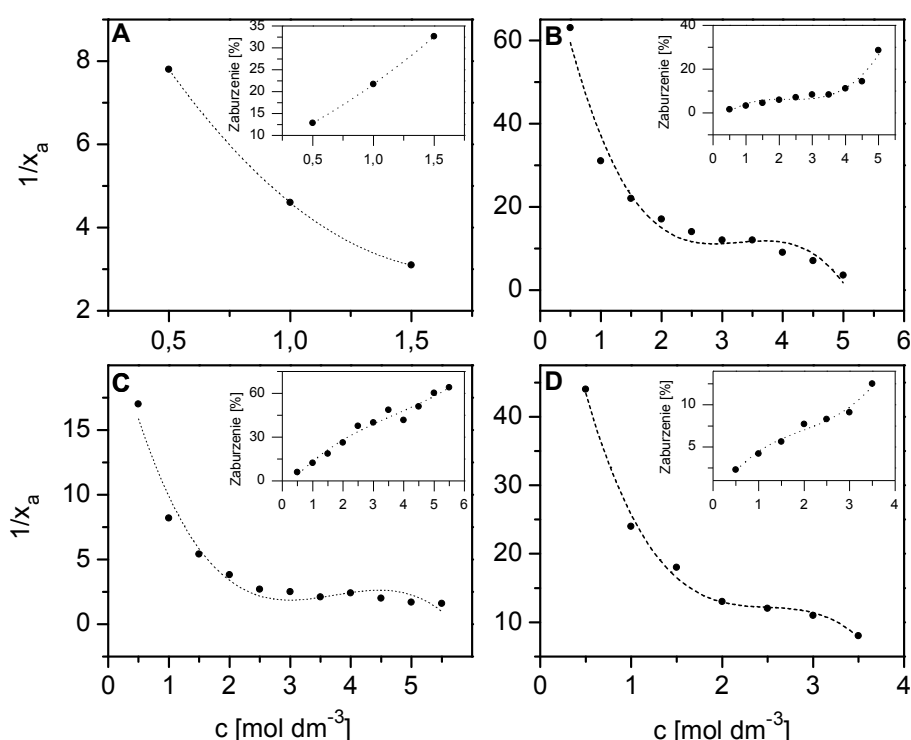


Rysunek 35. Widmo DNA w zakresie pasm 1086 i 1053 cm^{-1} bez udziału osmolitu (linia czerwona), widmo DNA w obecności osmolitu (linia przerywana) i widmo zaburzone DNA (linia czarna) przy A - 1.5 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ glicyny, B - 4.5 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ *N*-metyloglicyny, C - 5.5 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ *N,N*-dimetyloglicyny i D - 3.5 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ *N,N,N*-trimetyloglicyny.

Drugi z badanych obszarów widma DNA obejmuje dwa pasma: 1086 i 1053 cm^{-1} , pojawiające się odpowiednio w wyniku symetrycznych drgań rozciągających grup fosforanowych w szkieletcie DNA oraz drgań rozciągających wiązań C-O reszt deoksyrybozy.

Widma zaburzone uzyskane dla badanych stężeń glicyny są w całym zakresie bardzo zbliżone do widma DNA bez obecności glicyny (Rysunek

35A). Wpływ tego związku powoduje jedynie nieznaczne obniżenie intensywności widma zaburzonego i poszerzenie poszczególnych pasm. Zawartość procentowa formy zaburzonej rośnie liniowo wraz ze wzrostem stężenia i osiąga wartość maksymalną 32.6 % dla stężenia $1.5 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ (Tabela 16, Rysunek 36A – wstawka). Przy wyższym stężeniu glicyny nie ma już możliwości wyznaczenia widma zaburzonego z wykorzystaniem mapy parametru $\Sigma\chi^2$.



Rysunek 36. Parametr $1/x_a$ wyznaczony w zakresie pasm 1086 i 1054 cm^{-1} DNA w obecności: glicyny (A), *N*-metyloglicyny (B), *N,N*-dimetyloglicyny (C), *N,N,N*-trimetyloglicyny (D). We wstawkach znajduje się procentowe zaburzenie struktury DNA w obserwowanym zakresie w obecności odpowiednich osmolitów.

W tym obszarze widmo zaburzone DNA uzyskane dla najwyższego możliwego stężenia *N*-metyloglicyny, czyli $5.0 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, wykazuje jedynie niższą intensywność i poszerzenie składowych pasm względem widma czystego DNA bez udziału osmolitu (Rysunek 35B). Maksymalna wartość procentowego zaburzenia struktury DNA w tym układzie wynosi 28.6%. Zaburzenie rośnie stopniowo wraz ze wzrostem stężenia osmolitu powodując

bardzo powolne zmiany struktury DNA do stężenia $4 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, powyżej zmiany są szybsze (Tabela 16, Rysunek 36B).

Uzyskane widma zaburzone dla *N,N*-dimetyloglicyny również wykazują duże podobieństwo do widma czystego DNA bez udziału osmolitu (Rysunek 35C). *N,N*-dimetyloglicyna także w tym zakresie widma wywołuje rozległe zaburzenie struktury DNA, osiągając wartość 64.1 % dla najwyższego uzyskanego stężenia (Tabela 16, Rysunek 36C).

Zawartość procentowa zaburzonej struktury DNA w obecności *N,N,N*-trimetyloglicyny rośnie dwuetapowo ze wzrostem stężenia osmolitu i osiąga maksymalną wartość 12.5 %, przy czym nachylenie linii obrazującej tę zależność jest małe, co wskazuje na powolne zmiany w obserwowanej strukturze DNA pod wpływem zwiększania stężenia osmolitu. Sama zmiana struktury jest natomiast największa spośród pozostałych osmolitów w tej grupie – kontur pasma zaburzonego jest najbardziej zmieniony względem czystego DNA. Uzyskany wynik wskazuje zatem, że oddziaływanie *N,N,N*-trimetyloglicyny z DNA ma charakter bardziej bezpośredni.

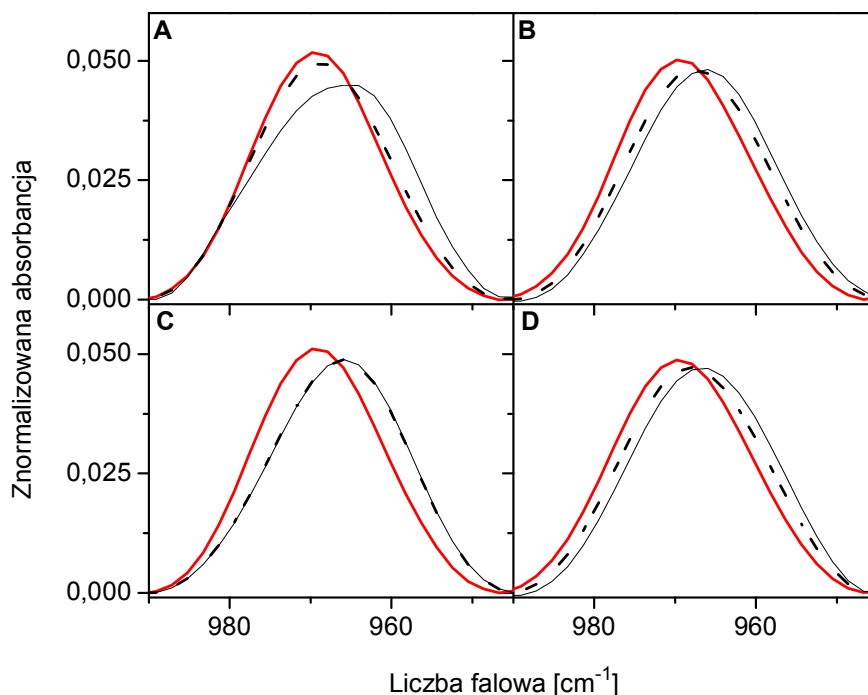
Podsumowanie

W rozpatrywanym zakresie występują pasma związane z dwoma różnymi strukturami DNA. Należy zatem wziąć pod uwagę, że zaburzenia widoczne w uzyskanych widmach mogą mieć różne pochodzenie. Spośród badanych osmolitów największy wpływ na DNA w tym zakresie widma ma *N,N,N*-trimetyloglicyna oraz *N*-metyloglicyna, przy czym *N,N,N*-trimetyloglicyna najbardziej zmienia strukturę formy zaburzonej DNA, co widoczne jest na widmach (Rysunek 35D).

Podobnie, jak w poprzednim badanym zakresie widma i tutaj obserwujemy dwustopniowy przebieg zależności parametru $1/x_a$ oraz procentowej zawartości formy zaburzonej DNA od stężenia osmolitu. Brak takiego przebiegu w przypadku glicyny może wynikać ze zbyt małego zakresu stężenia osmolitu.

Widmo DNA w zakresie pasma 970 cm^{-1}

Pasmo przy 970 cm^{-1} , podobnie jak pasmo 1222 cm^{-1} , jest charakterystyczne dla formy B-DNA.

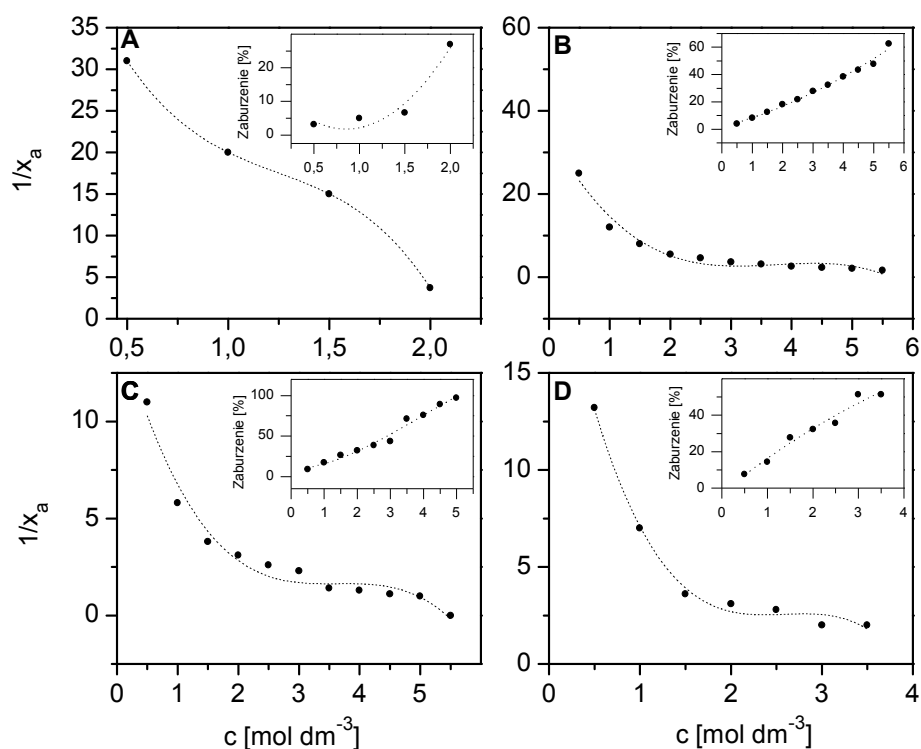


Rysunek 37. Widmo DNA w zakresie pasma 970 cm^{-1} bez udziału osmolytu (linia czerwona), widmo DNA w obecności osmolytu (linia przerywana) i widmo zaburzone DNA (linia czarna) przy A - 2.0 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ glicyny, B - 5.5 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ *N*-metyloglicyny, C - 5.0 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ *N,N*-dimetyloglicyny i D - 3.5 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ *N,N,N*-trimetyloglicyny.

Każdy z rozpatrywanych osmolytów powoduje w tym zakresie przesunięcie pasma zaburzonego DNA w kierunku niższych liczb falowych (Rysunek 37). Obserwujemy również nieznaczne zmniejszenie intensywności pasma wywołane wpływem każdego z osmolytów, a w przypadku glicyny dodatkowo pasmo to ulega znacznemu poszerzeniu (Rysunek 37A). Kontur pasma DNA zaburzonego przez glicynę najbardziej spośród osmolytów w tej grupie odbiega od konturu DNA niezaburzonego – co świadczy o najsilniejszej zmianie struktury. Analiza wartości procentowego zaburzenia struktury DNA pokazuje, że glicyna jest związkiem, który powoduje najmniejszy procent zaburzenia (27 %) dla najwyższego z badanych stężeń glicyny oraz najmniejszą

wartość nachylenia linii obrazującej zależność procentowego zaburzenia struktury DNA od stężenia osmolitu (Tabela 16, Rysunek 38A).

N-metyloglicyna wywołuje w tym zakresie widma wyraźne zmiany (Tabela 16, Rysunek 37B). Wartość procentowego zaburzenia struktury DNA przez ten osmolit rośnie prawie liniowo wraz ze wzrostem jego stężenia, osiągając maksymalną wartość 62.5 %.



Rysunek 38. Parametr $1/x_a$ wyznaczony w zakresie pasma 970 cm^{-1} DNA w obecności: glicyny (A), *N*-metyloglicyny (B), *N,N*-dimetyloglicyny (C), *N,N,N*-trimetyloglicyny (D). We wstawkach znajduje się procentowe zaburzenie struktury DNA obserwowane w zakresie pasma 970 cm^{-1} w obecności odpowiednich osmolitów.

N,N-dimetyloglicyna powoduje największe procentowe zaburzenie w tym zakresie widma. Pasma DNA w obecności tego osmolitu jest przesunięte w kierunku niższych liczb falowych i pokrywa się prawie całkowicie z zaburzonym widmem DNA uzyskanym dla najwyższego stężenia *N,N*-dimetyloglicyny (Rysunek 37C). Oznacza to, że prawie cała struktura DNA została zaburzona, co potwierdza wartość procentowej zawartości struktury

zaburzonej, która osiąga 97.1 % dla najwyższego z badanych stężeń osmolitu (Tabela 16, Rysunek 38C).

Ostatni z rozpatrywanych osmolitów, *N,N,N*-trimetyloglicyna, wywołuje podobne zmiany w widmach zaburzonych DNA w tym regionie, jak *N,N*-dimetyloglicyna. Dla najwyższego stężenia tego osmolitu uzyskujemy 51.3 % zaburzonej struktury badanego DNA.

Podsumowanie

Przesunięcie rozpatrywanego pasma 970 cm^{-1} w kierunku niższych liczb falowych, zmniejszenie intensywności i poszerzenie związane są, jak już wspomniano wcześniej, z rozluźnieniem struktury DNA. Każdy z badanych osmolitów powoduje w tym regionie dość duże zaburzenie struktury, największe jest ono w przypadku glicyny. Podobnie, jak w poprzednich zakresach, obserwujemy tutaj dwuetapowy przebieg wpływu osmolitów na DNA.

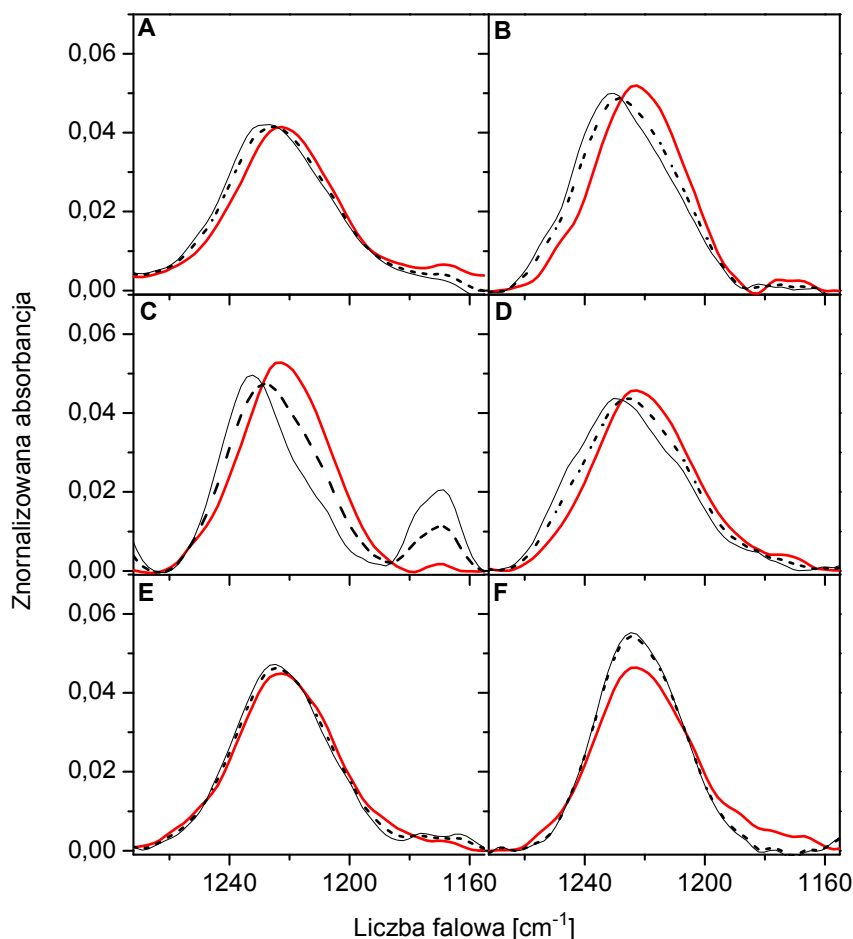
8.2.2.2 Mocznik i jego *N*-alkilowe pochodne

Widmo DNA w zakresie pasma 1222 cm^{-1}

W przypadku mocznika zaobserwować można przesunięcie w kierunku wyższych wartości liczb falowych pasma zaburzonego DNA (Rysunek 39A). Zauważalne jest również poszerzenie pasma. Analizując zmianę zawartości procentowej formy zaburzonej DNA ze wzrostem stężenia mocznika można zauważyć, występujący również w przypadku glicyn, dwuetapowy przebieg tej zależności. Ponadto w porównaniu do pochodnych mocznika, sam mocznik wywołuje bardzo powolne zmiany struktury DNA, które osiągają 15.4 % struktury zaburzonej przy maksymalnym stężeniu tego osmolitu (Rysunek 40A, Tabela 17).

N-metylomocznik natomiast (Rysunku 39B) spowodował duże zaburzenie procentowe struktury DNA, co widać na podstawie prawie całkowitego pokrycia konturu widma DNA zaburzonego przez osmolit z wyizolowanym widmem formy zaburzonej DNA. Ma to odzwierciedlenie w procentowej zawartości formy zaburzonej DNA, która osiąga wartość powyżej 70 % dla maksymalnego stężenia tego osmolitu w roztworze (Rysunek

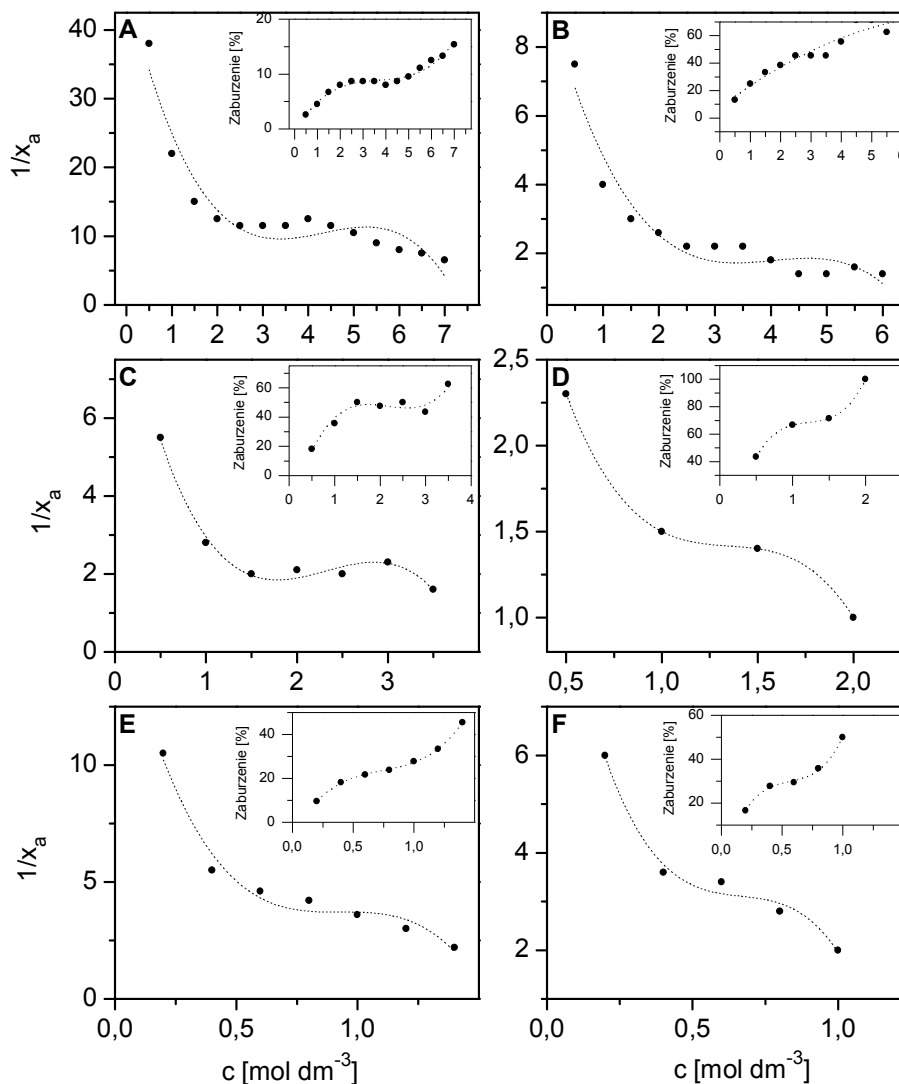
40B, Tabela 17). Ponadto obserwujemy obniżenie intensywności oraz przesunięcie pasma 1222 cm^{-1} w kierunku wyższych wartości liczb falowych.



Rysunek 39. Widmo DNA w zakresie pasma 1222 cm^{-1} bez udziału osmolytu (linia czerwona), widmo DNA w obecności osmolytu (linia przerywana) i widmo zaburzone DNA (linia czarna) przy $7.0\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ mocznika (A), $6.0\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ *N*-metylomocznika (B), $3.5\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ *N,N'*-dimetylomocznika (C), $2.0\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ *N,N,N',N'*-tetrametylomocznika (D), $1.4\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ *N*-etylomocznika (E) i $1.0\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ *N,N'*-dietylomocznika (F).

Początkowe nachylenie zależności zawartości procentowej struktury zaburzonej od stężenia *N,N'*-dimetylomocznika (Rysunek 40C) wskazuje, że zmiany w DNA wywołane tym osmolytem zachodzą znacznie szybciej niż pod wpływem dwóch poprzednich związków. Pasma zaburzone DNA obserwowane w tym zakresie jest przesunięte w kierunku wyższych liczb falowych (Rysunek

39C). Zauważyć można także obniżenie ich intensywności oraz pojawienie się nowego pasma ok. 1170 cm^{-1} . Maksymalna zawartość procentowa formy zaburzonej DNA, 62.5 %, została osiągnięta dla roztworu o stężeniu $3.5\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ osmolitu (Tabela 17). *N,N'*-dimetylomocznik powoduje największą w tej grupie osmolitów zmianę parametrów pasma zaburzonego DNA.



Rysunek 40. Parametr $1/x_a$ wyznaczony w zakresie pasma 1222 cm^{-1} DNA w obecności: mocznika (A), *N*-metylomocznika (B), *N,N'*-dimetylomocznika (C), *N,N,N',N'*-tetrametylomocznika (D), *N*-etylomocznika (E) i *N,N'*-dietylomocznika (F). We wstawkach znajduje się procentowe zaburzenie struktury DNA w obserwowanym zakresie w obecności odpowiednich osmolitów.

Dodatek N,N,N',N' -tetrametylomocznika do roztworu DNA spowodował przesunięcie pasma 1222 cm^{-1} w kierunku wyższych liczb falowych oraz obniżenie jego intensywności (Rysunek 39D). Osmolit ten powoduje największe w rozpatrywanym zakresie zaburzenie procentowe struktury DNA. W porównaniu do pozostałych metylowych pochodnych mocznika, zmiany w strukturze DNA zachodzą najszybciej w obecności N,N,N',N' -tetrametylomocznika (Rysunek 40D, Tabela 17). Są one także istotne pod względem zmiany parametrów pasma zaburzonego.

Porównując dwie pochodne etylowe mocznika można zauważyć, że N -etylomocznik ma mniejszy wpływ na DNA, co widać na podstawie profilu wyizolowanej formy zaburzonej, który jest bardzo zbliżony do widma czystego DNA (Rysunek 39E). Jednakże zmiana procentowej zawartości formy zaburzonej DNA w zależności od stężenia tego osmolitu zachodzi z porównywalną szybkością, jak w przypadku N,N,N',N' -tetrametylomocznika (Rysunek 40E) i osiąga maksymalną wartość 45.4 % już przy stężeniu $1.4\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ (Tabela 17).

N,N' -dietylomocznik spowodował, poza nieznacznym przesunięciem pasma w kierunku wyższych liczb falowych, wyraźne zwiększenie jego intensywności (Rysunek 39F). Spośród wszystkich rozpatrywanych osmolitów N,N' -dietylomocznik powoduje w tym zakresie najszybsze zmiany struktury DNA i zawartość formy zaburzonej DNA osiąga wartość 50 % już dla stężenia $1.0\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ (Rysunek 40F, Tabela 17).

Podsumowanie

W przypadku wszystkich analizowanych tutaj moczników zauważyć można wywołane ich obecnością w roztworze, przesunięcie pasma 1222 cm^{-1} w kierunku wyższych liczb falowych. Jest to skutkiem odwodnienia próbki i częściowego przejścia DNA z formy B w kierunku formy A. Ponadto analiza zależności zawartości procentowej formy zaburzonej DNA od stężenia pokazuje, że szybkość przemian w strukturze DNA jest związana z liczbą podstawników w pochodnych mocznika obecnych w roztworze. Najwolniejsze zmiany obserwujemy w przypadku mocznika, znaczny wzrost szybkości powoduje podstawienie jednego atomu wodoru aminowego podstawnikiem metylowym lub etylowym, natomiast najszybciej zmienia się struktura DNA pod wpływem N,N,N',N' -tetrametylomocznika i N,N' -dietylomocznika

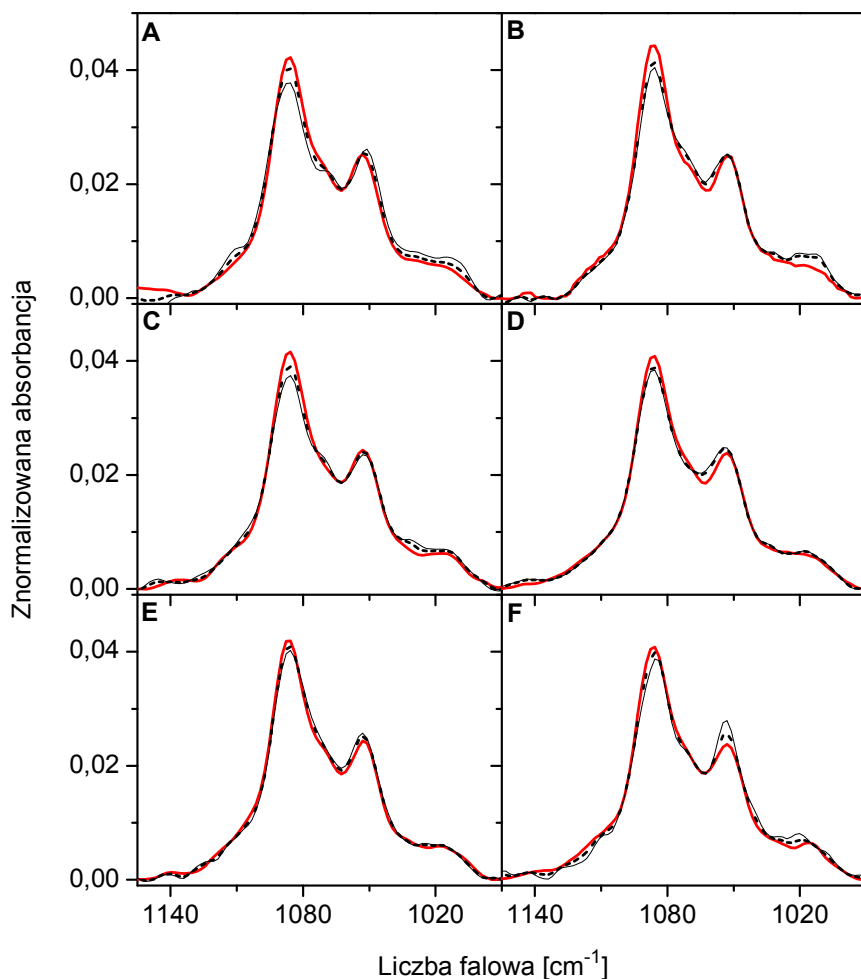
Obserwując zależności przedstawione na Rysunku 40, zauważyć można również, że struktura DNA pod wpływem moczników zmienia się etapowo, co widoczne było również w przypadku glicyn.

Mocznik wykazuje najmniej rozległy wpływ na grupy fosforanowe z całej grupy badanych związków. Zastąpienie aminowych atomów wodoru podstawnikami metylowymi powoduje znaczny wzrost wpływu na strukturę DNA, obserwowanego jako przesunięcie i obniżenie intensywności pasma DNA zaburzonego. Efekt ten jest najsilniej zaznaczony w przypadku *N,N'*-dimetylomocznika. Największe, 100 % zaburzenie struktury DNA wywołał natomiast *N,N,N',N'*-tetrametylomocznik. Etylowe pochodne mocznika również silnie zaburzają strukturę DNA, ale mechanizm ich wpływu na grupy fosforanowe może być inny ponieważ wzrost intensywności analizowanego pasma mogłaby przemawiać za wzmacnianiem oddziaływań DNA z wodą, szczególnie widocznym w przypadku *N,N'*-dimetylomocznika.

Widmo DNA w zakresie pasm przy 1086 i 1053 cm^{-1}

Widma zaburzone uzyskane dla badanych stężeń mocznika i jego pochodnych mają kontur zbliżony do widma DNA niezaburzonego w tym zakresie. Różnice pojawiają się głównie w obszarze pasma 1086 cm^{-1} i we wszystkich przypadkach są związane głównie z obniżeniem jego intensywności.

Tak, jak w poprzednim rozpatrywanym zakresie, najmniejszy wpływ na grupy fosforanowe i C-O reszt deoksyrybozy, wykazuje mocznik (Rysunek 41A). Zawartość procentowa struktury zaburzonej przy najwyższym stężeniu tego osmolitu wynosi 28.6 % i zmiany te zachodzą bardzo wolno w miarę zwiększania stężenia mocznika (Rysunek 42A, Tabela 17).

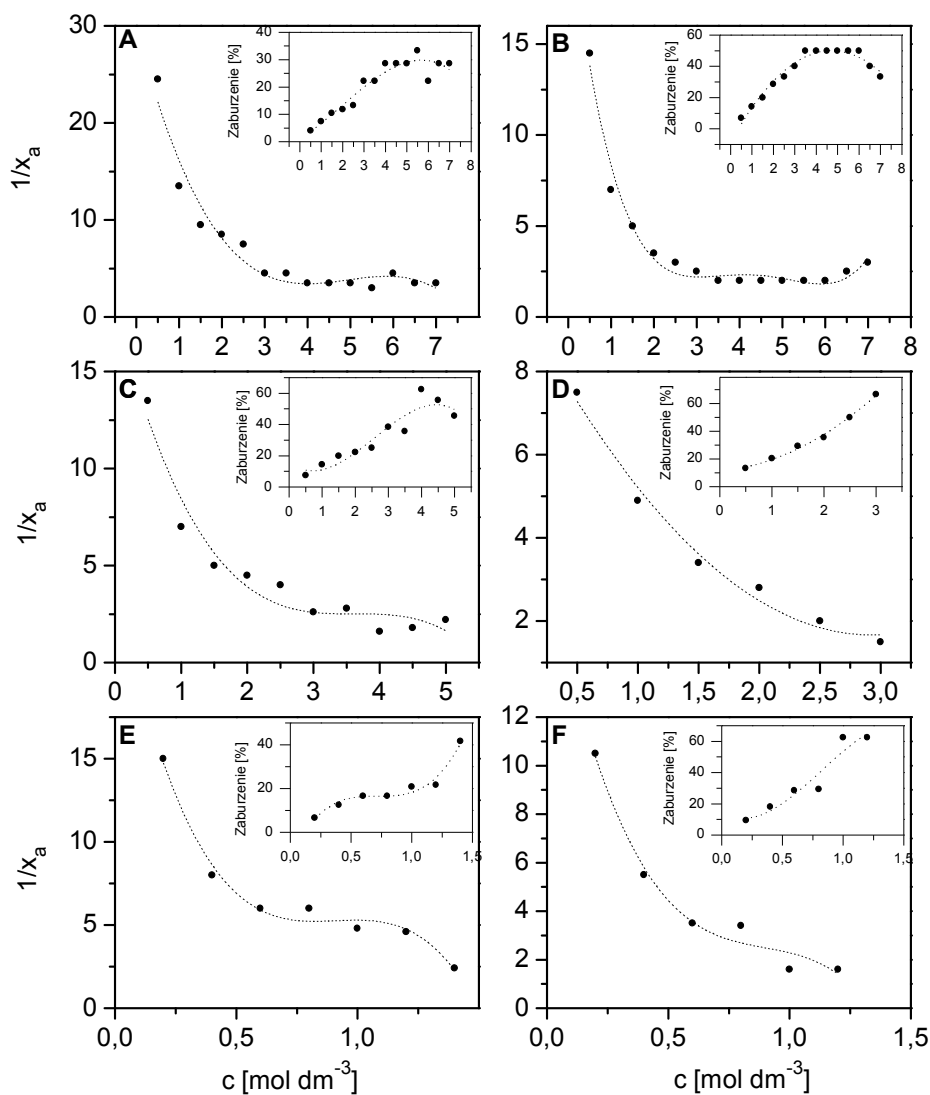


Rysunek 41. Widmo DNA w zakresie pasm 1086 i 1053 cm^{-1} (linia czerwona), widmo DNA w obecności osmolitu (linia przerywana) i widmo zaburzone DNA (linia czarna) przy 7.0 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ mocznika (A), 7.0 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ *N*-metylomocznika (B), 5.0 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ *N,N*-dimetylomocznika (C), 3.0 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ *N,N,N',N'*-tetrametylomocznika (D), 1.4 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ *N*-etylomocznika (E) i 1.2 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ *N,N*-dietylomocznika (F).

Dodanie podstawnika metylowego zwiększa wpływ osmolitu na DNA, powodując, że jakkolwiek stopień zmiany struktury jest podobny to stopień zaburzenia struktury kwasu deoksyrybonukleinowego wzrasta do ponad 50 % (Rysunek 42B, Tabela 17).

Podobny wpływ na DNA obserwujemy także w przypadku *N,N*-dimetylomocznika (Rysunek 41C i 42C, Tabela 17). Szybkość zmian

zachodzących w DNA pod wpływem tego osmolitu jest również porównywalna z poprzednim.



Rysunek 42. Parametr $1/x_a$ wyznaczony w zakresie pasm 1086 i 1053 cm⁻¹ DNA w obecności: mocznika (A), *N*-metylomocznika (B), *N,N'*-dimetylomocznika (C), *N,N,N',N'*-tetrametylomocznika (D), *N*-etylomocznika (E) i *N,N'*-dietylomocznika (F). We wstawkach znajduje się procentowe zaburzenie struktury DNA w obserwowanym zakresie w obecności odpowiednich osmolitów.

N,N,N',N'-tetrametylomocznik pomimo niskiego stężenia użytego do badań (w porównaniu do pozostałych metylowych pochodnych) wywołał

w tym zakresie największe zmiany w DNA. W efekcie uzyskano 66.7 % zaburzonej struktury kwasu deoksyrybonukleinowego. Również szybkość zachodzenia tych zmian w wyniku zwiększania stężenia osmolytu była największa spośród wszystkich metylowych pochodnych mocznika (Rysunek 41D i 42D, Tabela 17).

Pochodne etylowe mocznika, mimo, że zostały użyte w stosunkowo niskich stężeniach w roztworze DNA, powodują rozległość zaburzenia jego struktury w większym stopniu niż pozostałe osmolyty z tej grupy. Dla stężenia $1.4 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ *N*-etylomocznika procentowa zawartość struktury zaburzonej DNA osiąga wartość 41.7 %, czyli zbliżoną do tej, która została osiągnięta dla *N,N'*-dimetylomocznika. Jednakże ze względu na różnicę maksymalnych użytych stężeń tych osmolytów, dla pochodnej etylowej wartość ta została osiągnięta znacznie szybciej niż dla pochodnej metylowej (Rysunek 41E i 42E, Tabela 17).

Najbardziej rozległy wpływ na DNA w tym zakresie wykazuje *N,N'*-dietylomocznik, który przy stężeniu $1.2 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ zaburza 62 % struktury badanego DNA (Rysunek 41F i 42F, Tabela 17).

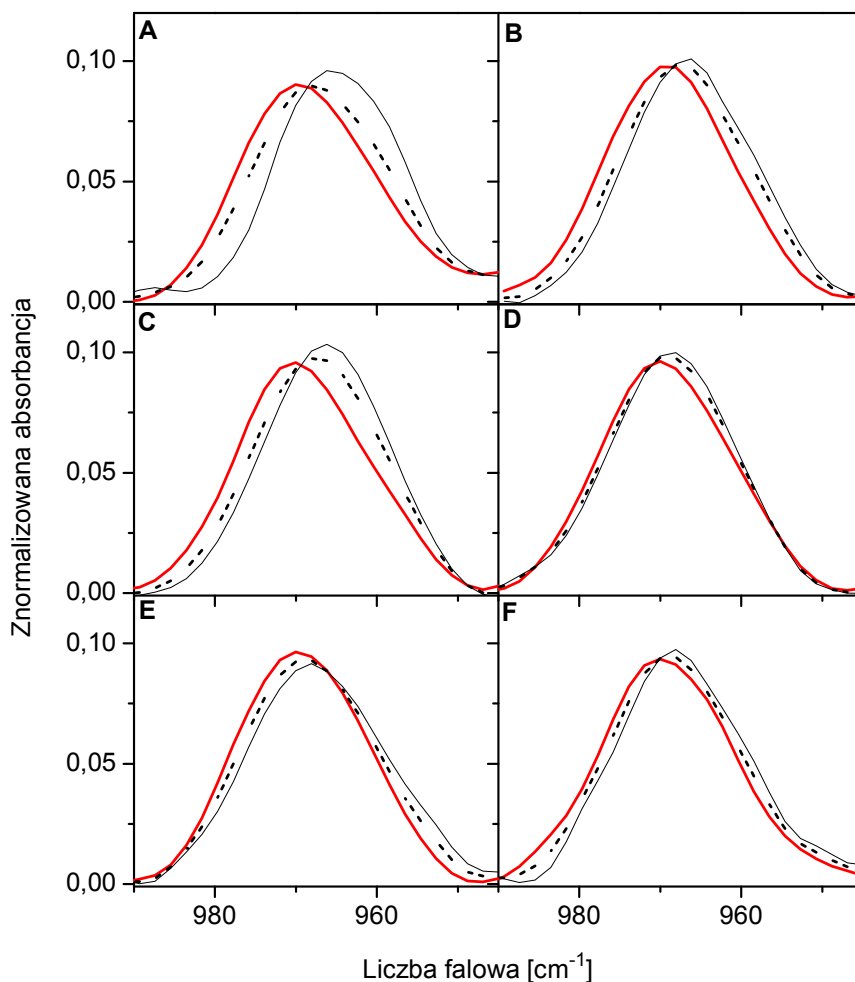
Podsumowanie

Analiza porównawcza widm DNA w wodzie i widm zaburzonych DNA uzyskanych w wyniku dodania do roztworu mocznika lub jego pochodnych, pokazuje, że w rozpatrywanym zakresie mocznika wywołują niewielkie zmiany parametrów pasm DNA zaburzonego. W niewielkim stopniu wpływają zatem na symetryczne drgania rozciągające grup fosforanowych w szkielecie DNA oraz drgania rozciągające wiązań C-O reszt deoksyrybozy. Najmniejszy wpływ na DNA wywołuje mocznik. Podstawienie aminowego atomu wodoru podstawnikiem metylowym lub etylowym wielokrotnie zwiększa szybkość zmian w DNA zachodzących w wyniku zwiększania stężenia osmolytów. Największy wpływ na DNA w tym obszarze ma *N,N'*-dietylomocznik.

Widmo DNA w zakresie pasma przy 970 cm^{-1}

W obszarze tym znajduje się kolejne pasmo, które jest charakterystyczne dla formy B-DNA. Wszystkie rozpatrywane tutaj osmolyty powodują

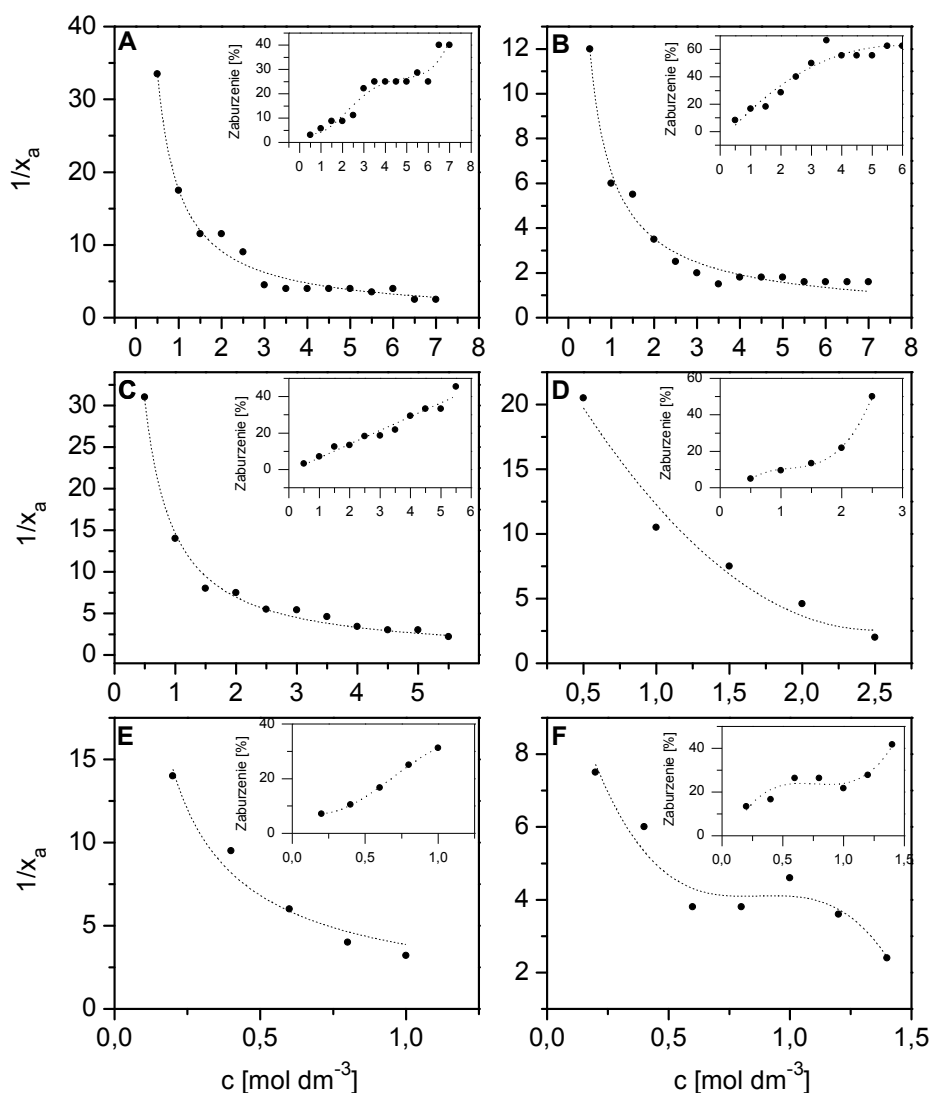
przesunięcie tego pasma w kierunku niższych wartości liczb falowych (Rysunek 43).



Rysunek 43. Widmo DNA w zakresie pasma 970 cm^{-1} bez udziału osmolytu (linia czerwona), widmo DNA w obecności osmolytu (linia przerywana) i widmo zaburzone DNA (linia czarna) przy $7.0\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ mocznika (A), $7.0\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ *N*-metylomocznika (B), $5.5\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ *N,N'*-dimetylomocznika (C), $2.5\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ *N,N,N',N'*-tetrametylomocznika (D), $1.0\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ *N*-etylomocznika (E) i $1.4\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ *N,N'*-dietylomocznika (F).

Mocznik poza przesunięciem powoduje także wyraźne poszerzenie pasma (Rysunek 43A). Przy największym użytym stężeniu $7\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ obserwujemy 40 % formy zaburzonej DNA. Na tej podstawie otrzymujemy najmniejsze

nachylenie zależności procentowej zawartości formy zaburzonej DNA od stężenia osmolutu spośród wszystkich osmolutów w tej grupie (Rysunek 44A, Tabela 17). Towarzysząca temu zaburzeniu zmiana parametrów pasma zaburzonego jest natomiast największa w tej grupie osmolutów – oddziaływanie mocznika z DNA powoduje w jego strukturze bardzo poważne zmiany.



Rysunek 44. Parametr $1/x_a$ wyznaczony dla pasma 970 cm^{-1} DNA w obecności: mocznika (A), *N*-metylomocznika (B), *N,N'*-dimetylomocznika (C), *N,N,N',N'*-tetrametylomocznika (D), *N*-etylomocznika (E) i *N,N'*-dietylomocznika (F). We wstawkach znajduje się procentowe zaburzenie struktury DNA w obserwowanym zakresie w obecności odpowiednich osmolutów.

N-metylomocznik przy takim samym stężeniu wywołuje znacznie większe procentowe zaburzenie DNA. Szybkość zmian zachodzących w DNA pod jego wpływem jest największa w grupie metylowych pochodnych mocznika (Rysunek 43B i 44B, Tabela 17).

Analiza wartości procentowego zaburzenia struktury DNA pokazuje, że *N,N'*-dimetylomocznik wykazuje najmniejszą wartość nachylenia prostej obrazującej zależność procentowego zaburzenia struktury DNA od stężenia osmolitu wśród metylowych pochodnych mocznika (Tabela 17, Rysunek 44C). Stopień zmiany parametrów pasma zaburzonego jest natomiast porównywalny z efektem wywołanym przez mocznik.

Ze zgromadzonych danych (Tabela 17, Rysunek 44D) wynika, że wartość procentowego zaburzenia struktury DNA przez *N,N,N',N'*-tetrametylomocznik rośnie wraz ze wzrostem jego stężenia, osiągając maksymalną wartość 50 %.

Pochodne etylowe mocznika powodują najszybciej postępujące zaburzenie w tym zakresie. Już przy stężeniu $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ *N*-etylomocznik zaburza 31.3 % struktury DNA (Rysunek 44E, Tabela 17).

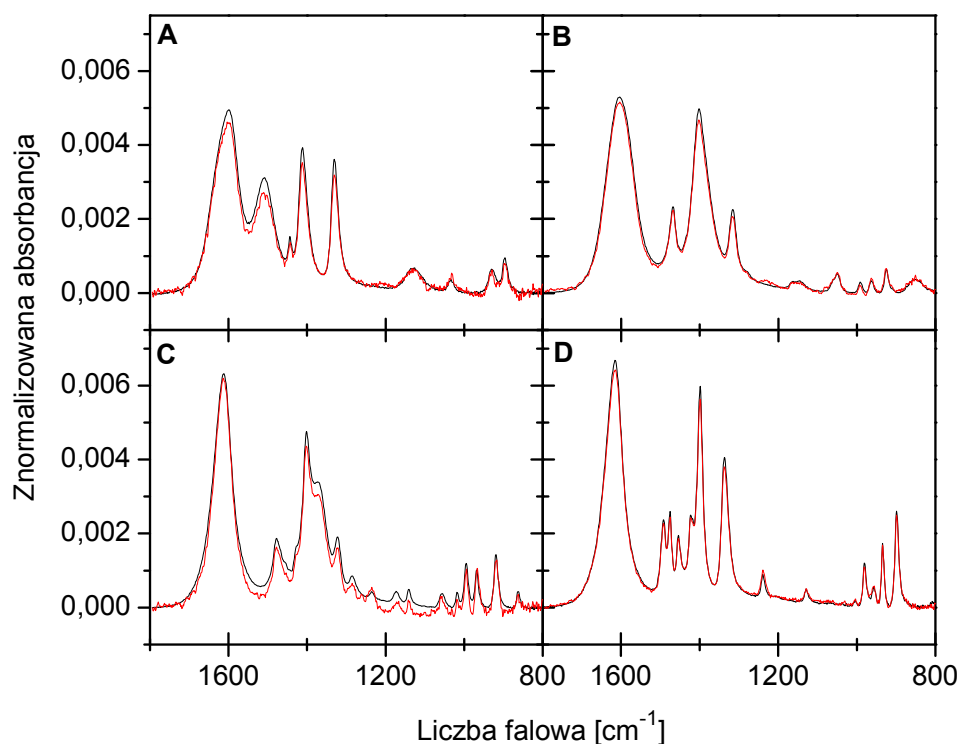
Ostatni z rozpatrywanych osmolitów, *N,N'*-dietylomocznik, wywołuje podobne zmiany w widmach zaburzonych DNA w tym regionie, jak *N*-etylomocznik. Dla najwyższego stężenia tego osmolitu uzyskujemy 41.7 % zaburzonej struktury badanego DNA (Rysunek 44F, Tabela 17).

Podsumowanie

Zarówno mocznik, jak i jego pochodne powodują przesunięcie pasma przy 970 cm^{-1} w kierunku niższych liczb falowych. Poszerzenie tego pasma związane z rozluźnieniem struktury jest wyraźnie widoczne w przypadku mocznika. Ponadto mocznik oraz *N,N'*-dimetylomocznik wywołują najbardziej rozległe zaburzenie tego obszaru związanego z drganiami wiązań C-C w szkielecie DNA

8.2.3 Analiza widm osmolitów zaburzonych przez DNA

Otrzymałam, w określonym zakresie wartości parametru *N*, serie kilkuset próbnych widm każdego z osmolitów zaburzonego przez DNA, aby uzyskać dobrą rozdzielczość map parametru $\Sigma\chi^2$ (Rozdział 7.4.6).



Rysunek 45. Zestawienie widma osmolytu w wodzie (linia czarna) z widmem osmolytu zaburzonego przez DNA (linia czerwona) dla glicyny (A), *N*-metyloglicyny (B), *N,N*-dimetyloglicyny (C) oraz *N,N,N*-trimetyloglicyny (D).

Sposób wyznaczenia właściwego parametru N został przedstawiony w rozdziale 7.4.6. Wyznaczenie wartości N pozwala odnaleźć właściwe widmo zaburzone osmolytu w obecności DNA (Rysunek 45 i 46). Z każdej z map można odczytać właściwy parametr N .

Analizą nie został objęty zakres widma $4000 - 2500 \text{ cm}^{-1}$ odpowiadający drganiom rozciągającym C-H i N-H osmolytów. Pokrywa się on z zakresem drgań rozciągających wody i w związku z tym bardzo intensywne pasma wody należałoby z tego zakresu wyeliminować. Biorąc pod uwagę udział wody zaburzonej obecnością osmolytu i DNA, nie można tego zabiegu przeprowadzić na tyle ilościowo, aby móc we właściwy sposób wyznaczyć widmo zaburzone osmolytu przez DNA w tym zakresie widma.

Uzyskane widma zaburzone osmolytów, zarówno w grupie glicyn, jak i moczników, wykazują bardzo duże podobieństwo do widm odpowiednich osmolytów w wodzie czystej (Rysunek 45 i 46). Widzimy zatem brak w widmie

zaburzonym jakichkolwiek przesunięć względem widma niezaburzonego. Wynika to najprawdopodobniej z braku bezpośrednich, specyficznych oddziaływań osmolitów z DNA.

Tabela 9. Wartości parametru N uzyskanego metodą chemometryczną dla badanych osmolitów zaburzonych w roztworze przez DNA.

Osmolit	N^a
Glicyna	2,9
N -metyloglicyna	7,5
N,N -dimetyloglicyna	3,5
N,N,N -trimetyloglicyna	6,4
Mocznik	1,0
N -metylomocznik	1,2
N,N' -dimetylomocznik	1,7
N,N,N',N' -tetrametylomocznik	6,4
N -etylomocznik	2,2
N,N' -dietylomocznik	4,9

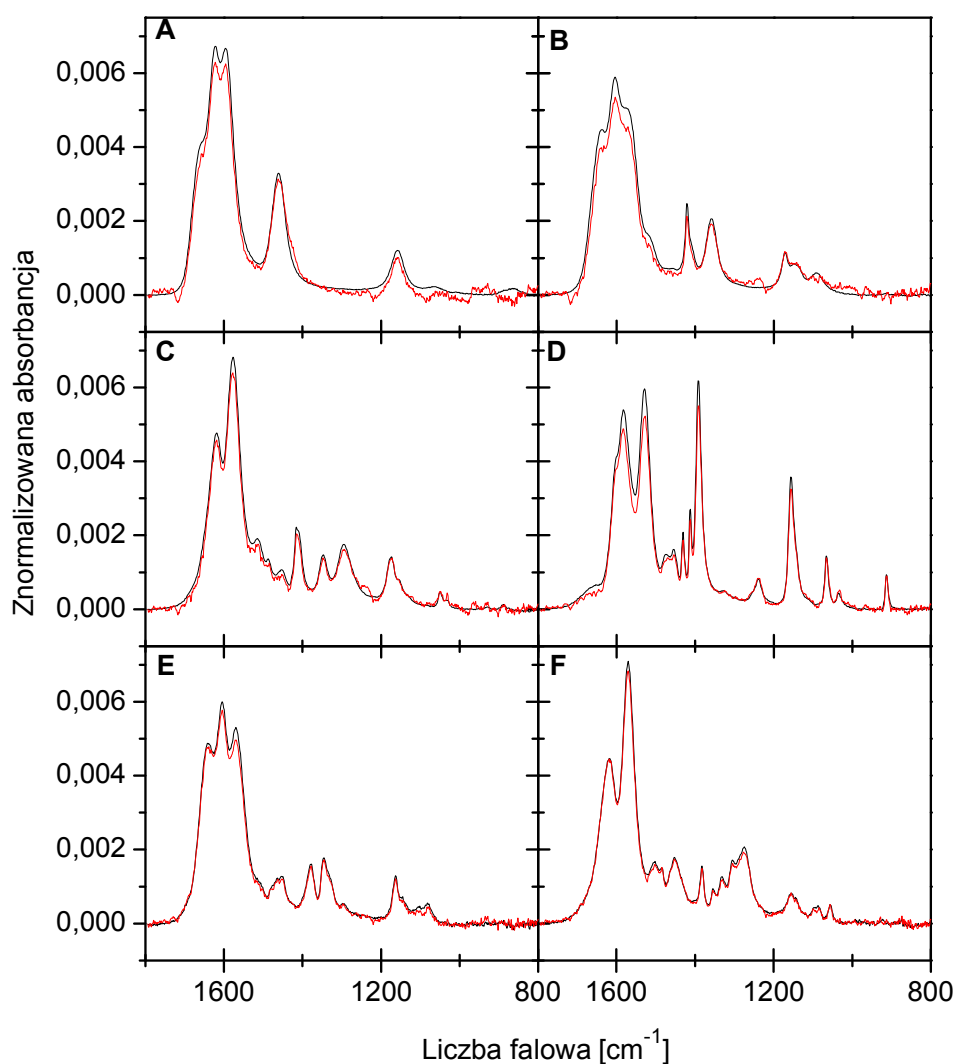
a – liczba cząsteczek zaburzonych osmolitu, równa liczbie moli osmolitu zaburzonych przez jeden nukleotyd

W przypadku glicyn (Tabela 9) wartość parametru N rośnie w następującej kolejności: glicyna < N,N -dimetyloglicyna < N,N,N -trimetyloglicyna < N -metyloglicyna. Zauważyć można, że w najmniejszej liczbie zaburzona przez DNA jest glicyna. Zastępowanie aminowych atomów wodoru podstawnikami metylowymi powoduje, że wzrasta liczba cząsteczek osmolitu zaburzonego przez DNA. Z trendu tego wyłamuje się N -metyloglicyna, która wydaje się mieć właściwości zbliżone do cząsteczki N,N,N -trimetyloglicyny, w której wszystkie aminowe wodory zostały podstawione grupami metylowymi.

Wśród moczników parametr N zmienia się następująco: mocznik < N -metylomocznik < N,N' -dimetylomocznik < N -etylomocznik < N,N' -dietylomocznik < N,N,N',N' -tetrametylomocznik. W najmniejszej liczbie przez

DNA w roztworze wodnym zaburzane są cząsteczki mocznika. Osłabianie charakteru kwasowego, które następuje w wyniku dodawania kolejnych podstawników do cząsteczki mocznika powoduje, że więcej moli osmolitu jest zaburzanych przez obecność DNA w roztworze.

Najważniejszą obserwacją wynikającą z wyznaczenia widm zaburzonych osmolitów obecnością DNA w roztworze jest brak bezpośrednich specyficznych oddziaływań tych osmolitów z makrocząsteczką.



Rysunek 46. Zestawienie widma osmolitu w wodzie (linia czarna) z widmem osmolitu zaburzonego przez DNA (linia czerwona) dla mocznika (A), N-metylomocznika (B), N,N'-dimetylomocznika (C), N,N,N',N'-tetrametylomocznika (D), N-etylomocznika (E) oraz N,N'-dietylomocznika (F).

8.3 Analiza wyników obliczeń teoretycznych DFT

Struktury wszystkich badanych osmolitów zostały zoptymalizowane z wykorzystaniem obliczeń wykonanych w ramach teorii funkcjonału gęstości (DFT). Struktury wstępnie zoptymalizowane były w fazie gazowej. Uzyskane w ten sposób struktury stanowiły dane wejściowe do dalszej optymalizacji geometrii cząsteczek z zastosowaniem modelu polaryzowalnego kontinuum rozpuszczalnika (PCM). Otrzymane w ten sposób struktury posłużyły do wyznaczenia wartości momentów dipolowych poszczególnych cząsteczek osmolitów (Tabela 10). Na ogół oddziaływania dipol – dipol w roztworach są znacznie słabsze niż wiązania wodorowe. Jednakże okazało się, że wartości uzyskanych momentów dipolowych wykazują interesujące korelacje z otrzymanymi danymi, dotyczącymi oddziaływania osmolitów z DNA. Wnioski dotyczące tych zależności zostaną przedstawione w kolejnym rozdziale.

Tabela 10. Wartości momentów dipolowych uzyskanych w wyniku obliczeń teoretycznych optymalnej geometrii cząsteczek badanych osmolitów w środowisku wodnym.

Osmolit	Moment dipolowy [D]
Glicyna	14,1
<i>N</i> -metyloglicyna	15,1
<i>N,N</i> -dimetyloglicyna	14,8
<i>N,N,N</i> -trimetyloglicyna	15,4
Mocznik	6,1
<i>N</i> -metylomocznik	6,3
<i>N,N'</i> -dimetylomocznik	6,2
<i>N,N,N',N'</i> -tetrametylomocznik	5,2
<i>N</i> -etylomocznik	6,3
<i>N,N'</i> -dietylomocznik	6,1
<i>N,N'</i> -dietylomocznik	6,1

Na uwagę zasługują wysokie wartości momentów dipolowych, uzyskane dla glicyn. Wynikają one z faktu, iż związki te w roztworze wodnym występują w formie jonów obojnaczych, co powoduje, że ładunki elektrostatyczne w ich cząsteczkach są bardzo wyraźne rozdzielone.

Obliczenia teoretyczne dla cząsteczek izolowanych w fazie gazowej posłużyły mi także do uzyskania zoptymalizowanych struktur par zasad tworzących helisę DNA, ze szczególnym uwzględnieniem długości wiązań wodorowych, które tworzą się pomiędzy komplementarnymi parami: adenina – tymina oraz guanina - cytozyna.

Obliczenia DFT pozwoliły mi określić teoretyczny wpływ osmolitów na wiązania wodorowe pomiędzy poszczególnymi parami zasad oraz zmiany w trwałości tych wiązań zachodzące w wyniku wymiany cząsteczki wody na cząsteczkę osmolitu. W tym celu wybrałam po jednym przedstawicielu z każdej badanej grupy osmolitów: *N,N,N*-trimetyloglicynę (TMG) oraz mocznik. Ze względu na duży rozmiar zoptymalizowanych struktur zostały one zaprezentowane w rozdziale Materiały uzupełniające, jako Rysunki 60-63.

Tabela 11. Długości wiązań wodorowych tworzących parę zasad guanina – cytozyna w cząsteczce DNA oraz parametry dla tych samych wiązań zaburzonych przez cząsteczki wody. Podkreślone zostały długości wiązań wodorowych bezpośrednio zaburzonych przez osmolit.

	$R_{X-H...Y}^a$			$\bar{R}_{X-H...Y}^b$
	(G-C6=O6-- H ₂ N4-C)	(G-N1H--N3-C)	(G-N2H ₂ -- O2=C2-C)	
GC	2.81803	2.95725	2.92818	2.90112
GC-N4H ₂ --- H ₂ O (2.96250)	<u>2.85234</u>	2.95348	2.91260	2.90614
CG-N2H ₂ --- H ₂ O (2.90445)	2.82468	2.96589	<u>2.94078</u>	2.90105
CG-C6=O6 --- H ₂ O (2.98336)	<u>2.84186</u>	2.95443	2.90198	2.89942
GC-C2=O2 --- H ₂ O (2.86196)	2.81012	2.97396	<u>2.95003</u>	2.91137

a – długość wiązania wodorowego pomiędzy parami zasad [Å]

b – średnia długość wiązania wodorowego pomiędzy parami zasad [Å]

Na wstępie należy zauważyć, na podstawie danych zestawionych w Tabeli 11 oraz 13, że cząsteczki wody znajdujące się w sąsiedztwie grup będących donorami lub akceptorami wiązania wodorowego, różnie wpływają na poszczególne wiązania wodorowe pomiędzy komplementarnymi parami zasad. Celem pokazania globalnego efektu posłużyłam się średnią długością wiązań wodorowych pomiędzy zasadami.

Tabela 12. Długości wiązań wodorowych tworzących parę zasad guanina – cytozyna w cząsteczce DNA oraz parametry dla tych samych wiązań zaburzonych przez wybrane osmolity. Podkreślone zostały długości wiązań wodorowych bezpośrednio zaburzonych przez osmolit.

	$R_{X-H...Y}^a$			$\overline{R}_{X-H...Y}^b$	$\overline{\Delta R}_{X-H...Y}^c$
	(G-C6=O6- - H ₂ N4-C)	(G-N1H- - N3-C)	(G-N2H ₂ - - O2=C2-C)		
GC	2.81803	2.95725	2.92818	2.90112	0
GC-N4H₂- - TMG (2.78765)	<u>2.90266</u>	2.94442	2.85984	2.90231	0.00383
CG-N2H₂- - TMG (2.86528)	2.81789	2.97596	<u>2.97226</u>	2.92204	-0.02099
CG-C6=O6- -mocznik (2.95319)	<u>2.83286</u>	2.95231	2.89724	2.89414	0.00529
CG-N2H₂- - mocznik (2.92731)	2.81986	2.96936	<u>2.95935</u>	2.91619	-0.01515
GC-C2=O2- -mocznik (3.04554)	2.80229	2.98994	<u>2.99733</u>	2.92985	-0.01848

a – długość wiązania wodorowego pomiędzy parami zasad [Å]

b – średnia długość wiązania wodorowego pomiędzy parami zasad [Å]

c – różnica średnich długości wiązań wodorowych przy wymianie cząsteczki wody na cząsteczkę osmolitu [Å]

Między guaniną i cytozyną tworzą się trzy wiązania wodorowe, które według wykonanych obliczeń mają długości odpowiednio: 2,81803 (X), 2,95725 (Y), 2,92818 (Z) Å (Tabela 11). Wymiana cząsteczki wody na *N,N,N*-

trimetyloglicynę, która tworzy wiązanie wodorowe z aminowym (N4) wodorem cytozyny powoduje, średnie wzmocnienie wiązań wodorowych między guaniną i cytozyną, mierzone jako różnica średnich długości wiązań wodorowych pomiędzy zasadami w obecności wody i w obecności osmolitu (wartości $\overline{\Delta R_{X-H...Y}}$ w Tabeli 12). Podobny efekt wzmocnienia oddziaływań między parami GC obserwuje się jeszcze w przypadku oddziaływania mocznika z grupą karbonylową (O6) guaniny. We wszystkich pozostałych rozpatrywanych przypadkach bezpośredniego oddziaływania osmolitów z grupami funkcyjnymi par GC obserwuje się osłabienie oddziaływań między zasadami. Najsilniejsze osłabienie oddziaływań pomiędzy zasadami powoduje *N,N,N*-trimetyloglicyna tworząc wiązanie wodorowe z grupą aminową (N2) guaniny. W przypadku mocznika wiązanie wodorowe z tlenem karbonylowym (O2) cytozyny w największym stopniu destabilizuje parę guanina-cytozyna.

Tabela 13. Długości wiązań wodorowych tworzących parę zasad adenina – tymina w cząsteczce DNA oraz parametry dla tych samych wiązań zaburzonych przez cząsteczkę wody. Podkreślone zostały długości wiązań wodorowych bezpośrednio zaburzonych przez osmolit.

	$R_{X-H...Y}^a$		$\overline{R}_{X-H...Y}^b$
	(A-N6H ₂ - -O4=C4-T)	(A-N1- -H-N3-T)	
AT	2.94786	2.88043	2.91415
TA-N6H ₂ - -H ₂ O (2.91002)	<u>2.98388</u>	2.88127	2.93258
AT-C4=O4- - H ₂ O (2.88373)	<u>2.97285</u>	2.87102	2.92194

a – długość wiązania wodorowego pomiędzy parami zasad [Å]

b – średnia długość wiązania wodorowego pomiędzy parami zasad [Å]

Para: adenina – tymina jest połączona przez dwa wiązania wodorowe (Tabela 13): pomiędzy wodorem aminowym (N6) adeniny a tlenem karbonylowym (O4) cytozyny o wyznaczonej długości 2.94786 Å (X) oraz pomiędzy azotem (N1) adeniny a wodorem aminowym (N3) tyminy o długości 2.88043 (Y). *N,N,N*-trimetyloglicyna (Tabela 14) zastępując cząsteczkę wody oddziałującą z aminowym (N6) atomem wodoru w cząsteczce adeniny, powoduje bardzo silne osłabienie średniego oddziaływania między parami AT.

Mniejszy efekt osłabienia obserwujemy w przypadku oddziaływania mocznika z atomem O4 grupy karbonylowej tyminy. Jedyne przypadek wzmocnienia średniego oddziaływania między parami AT powoduje mocznik oddziałujący z grupa aminową (N6) adeniny.

Tabela 14. Długości wiązań wodorowych tworzących parę zasad adenina – tymina w cząsteczce DNA oraz parametry dla tych samych wiązań zaburzonych przez wybrane osmolity. Podkreślone zostały długości wiązań wodorowych bezpośrednio zaburzonych przez osmolit.

	$R_{X-H...Y}^a$		$\overline{R}_{X-H...Y}^b$	$\Delta\overline{R}_{X-H...Y}^c$
	(A-NH ₂ - - - O=C-T)	(A-N - - - H-N-T)		
AT	2.94786	2.88043	2.91415	0
TA-N6H ₂ - - - TMG (2.84294)	<u>3.15464</u>	2.85213	3.00339	-0.07081
AT-C4=O4 - - - mocznik (3.02532)	<u>2.98580</u>	2.86448	2.92514	-0.00321
TA-N6H ₂ - - - mocznik (3.10372)	<u>2.96998</u>	2.88577	2.92788	0.00470

a – długość wiązania wodorowego pomiędzy parami zasad [Å]

b – średnia długość wiązania wodorowego pomiędzy parami zasad [Å]

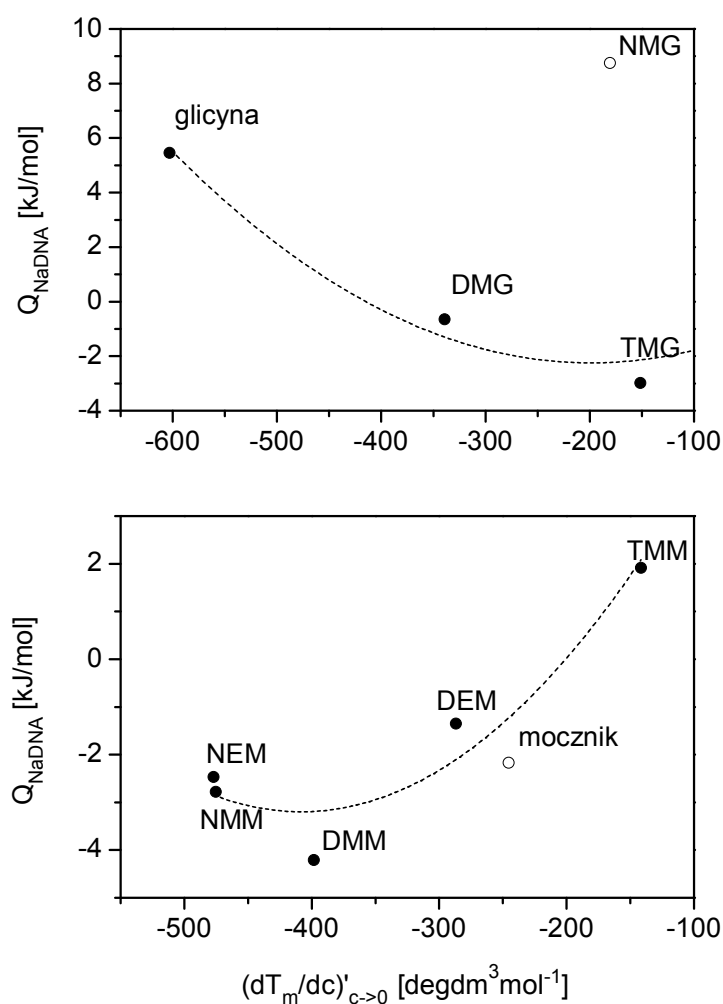
c – różnica średnich długości wiązań wodorowych przy wymianie cząsteczki wody na cząsteczkę osmolitu [Å]

N,N,N-trimetyloglicyna powodując dehydratację zasad pirymidynowych powoduje silną globalną destabilizację tworzonych przez nie wiązań wodorowych z komplementarnymi zasadami. Jednocześnie tworzy znacznie silniejsze wiązania wodorowe z grupami funkcyjnymi wszystkich zasad niż woda. Wyniki te sugerują antykooperatywność wiązania wodorowego między pirymidyną a osmolitem oraz wiązań wodorowych pomiędzy komplementarnymi zasadami DNA. Dehydratacja cytozyny przez *N,N,N*-trimetyloglicynę powoduje natomiast bardzo słabe wzmocnienie jej oddziaływania z guaniną.

Mocznik natomiast generalnie tworzy znacznie słabsze wiązania wodorowe z grupami funkcyjnymi zasad DNA niż woda. Wyjątkiem jest tlen karbonylowy (O6) guaniny, gdzie mocznik tworzy z DNA nieznacznie silniejsze wiązanie wodorowe niż cząsteczka wody. Wymiana wody na mocznik w tym położeniu powoduje globalny efekt niewielkiego wzmocnienia wiązań wodorowych pomiędzy zasadami GC, taki sam efekt jest wynikiem oddziaływania mocznika z adeniną. W pozostałych przypadkach dehydratacja DNA przez mocznik powoduje jego destabilizację.

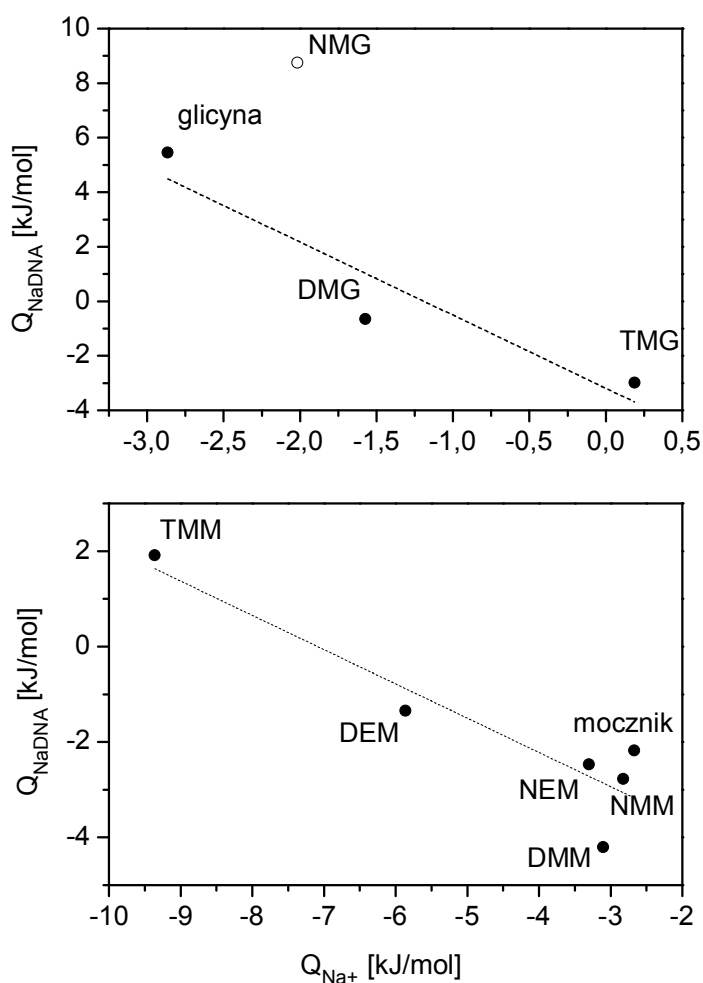
9 Dyskusja wpływu osmolitów na DNA

Zarówno glicyna, jak i moczniki powodują obniżenie temperatury denaturacji DNA. Jak widać na Rysunku 47, DNA w obecności glicyn w roztworze jest tym silniej destabilizowane, im słabsze jest oddziaływanie tych osmolitów z kwasem nukleinowym (bardziej dodatnia jest wartość entalpii oddziaływania). Najślabiej oddziałującym z DNA związkem jest glicyna i ona powoduje największe obniżenie temperatury denaturacji. Zastępowanie kolejnych wodorów aminowych grupami metylowymi wzmacnia oddziaływanie osmolitów z DNA, jednocześnie zmniejszając różnicę temperatury denaturacji DNA w obecności osmolitu w stosunku do czystego DNA (wyjątkiem jest *N*-metyloglicyna).



Rysunek 47. Zależność entalpii oddziaływania soli sodowej DNA z osmolitami od parametru $(dT_m/dc)'_{c \rightarrow 0}$.

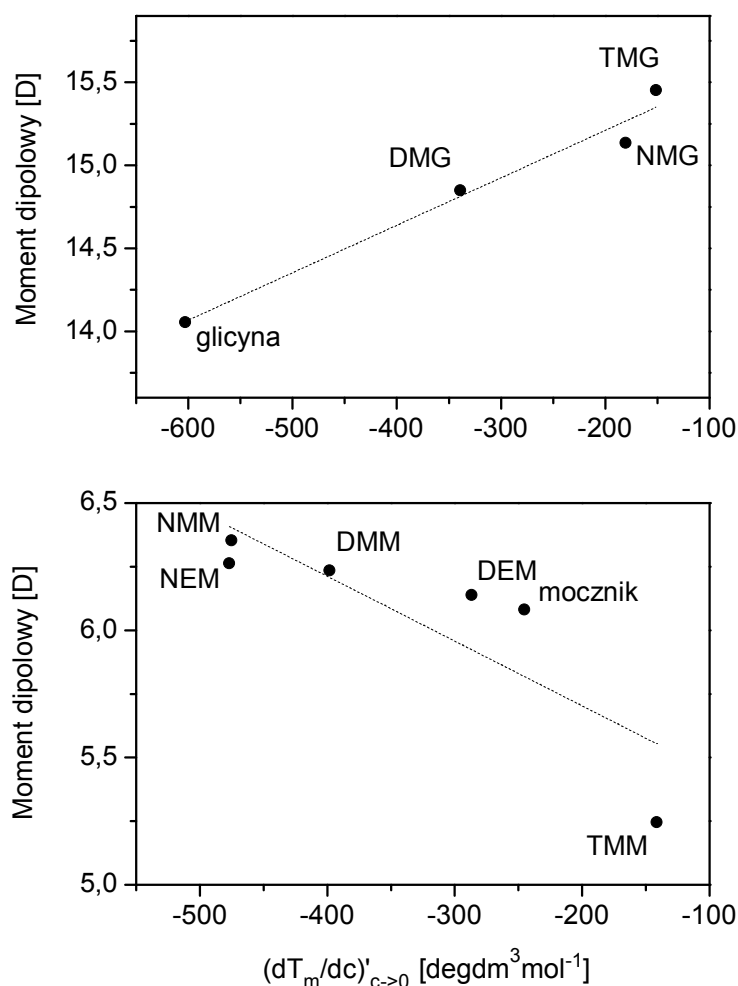
W przypadku moczników obserwujemy zależność odwrotną, im silniej oddziałują one z DNA (bardziej ujemna entalpia oddziaływania), tym bardziej destabilizują tę makrocząsteczkę, obniżając jej temperaturę denaturacji. Najsilniej temperaturę denaturacji DNA obniżają pochodne mocznika z jednym atomem wodoru aminowego zastąpionym podstawnikiem alkilowym. Dodanie kolejnych podstawników osłabia ten efekt. Podobny efekt wywołuje zwiększenie długości podstawnika.



Rysunek 48. Zależność entalpii oddziaływania soli sodowej DNA z osmolitami od entalpii oddziaływania tych osmolitów z jonami sodu.

Z zależności entalpii oddziaływania soli sodowej DNA z osmolitami od ciepła ich oddziaływania z samym jodem sodu (Rysunek 48), zarówno dla

glicyn, jak i moczników, widać, że osłabieniu oddziaływania tych osmolitów z sodem towarzyszy wzmocnienie oddziaływania z DNA. Właściwe jest zatem stwierdzenie (pomijając i tym razem *N*-metyloglicynę), że osmolity słabiej oddziałujące z jonami sodu mają silniejszy wpływ na sól sodową DNA. Z obserwacji tej wynika, że oddziaływanie osmolitu z jonem sodowym nie determinuje jego oddziaływania z solą sodową DNA. Temperatura denaturacji DNA ma związek z momentem dipolowym osmolitów obu typów. W przypadku metylopo pochodnych glicyny zależność przedstawiona na Rysunku 49 ma nachylenie przeciwnego znaku niż w przypadku alkilowych pochodnych mocznika.



Rysunek 49. Korelacja pomiędzy wartościami momentów dipolowych osmolitów a parametrem $(dT_m/dc)'_{c \rightarrow 0}$.

Zatem wśród moczników zauważyć można, iż zwiększaniu wartości momentu dipolowego osmolitu towarzyszy obniżanie temperatury denaturacji (Rysunek 49) oraz silniejsze oddziaływania z DNA. Glicyny natomiast przy dużej wartości momentu dipolowego również silniej oddziałują z DNA, ale jego destabilizacja jest słabsza (Rysunek 47 i 49).

Tabela 15. Parametry rozkładu odległości tlen–tlen na podstawie ¹⁹⁵.

Związek	N_{H_2O} ^{a, d}	R_{oo} ^{a, b, d} Å	R_{oo}^w ^c Å
woda objętościowa	0	2.843±0.003	2.843±0.003
glicyna	11.0±0.5	2.831±0.003	2.841±0.003
N-metyloglicyna	5.0±0.5	2.813±0.003	2.840±0.003
N,N-dimetyloglicyna	4.8±0.5	2.826±0.003	2.842±0.003
N,N,N-trimetyloglicyna	4.0±0.5	2.828±0.003	2.842±0.003
mocznik	5.0±0.5	2.838±0.003	2.843±0.003
N-metylomocznik	1.8±0.5	2.821±0.003	2.842±0.003
N,N'-dimetylomocznik	2.7±0.5	2.823±0.003	2.842±0.003
N,N,N',N'-tetrametylomocznik	6.2±0.5	2.833±0.003	2.842±0.003
N-etylomocznik	2.4±0.5	2.828±0.003	2.842±0.003
N,N-dietylomocznik	3.2±0.5	2.823±0.003	2.842±0.003

a – liczba moli cząsteczek wody zaburzonych przez jeden mol osmolitu

b – średnia odległość międzycząsteczkowa wody zaburzonej mierzona pomiędzy atomami tlenu

c – średnia ważona odległość międzycząsteczkowa wody w roztworze mierzona pomiędzy atomami tlenu

d – na podstawie ¹⁹⁵

Prowadzone w naszej Katedrze badania nad hydratacją osmolitów, pozwoliły na sformułowanie wniosku, iż obie grupy badanych przez mnie związków powodują wzmocnienie struktury otaczającej je wody. Woda w otoczeniu tych osmolitów tworzy więcej wiązań wodorowych niż w czystej wodzie. Ponadto zwiększa się populacja mocniejszych wiązań wodorowych, charakteryzowanych przez funkcje rozkładu odległości tlen–tlen cząsteczek wody zaburzonych przez glicyny i moczniki. Funkcje te posłużyły do

wyznaczenia odległości średniej tlen–tlen, R_{OO} , pomiędzy cząsteczkami wody (Tabela 15). Wykorzystując wyznaczone przez dr Anetę Panuszko¹⁹⁵ wartości liczb moli cząsteczek wody zaburzonej przez jeden mol osmolitu (N_{H_2O} , Tabela 15), wyznaczyłam średnią ważoną odległość tlen–tlen, R_{OO}^w , w roztworze wodnym 1 molalnym o właściwościach roztworu doskonale rozcieńczonego. Z wymogu zachowania stałej długości wiązań wodorowych wody wynika, że:

$$(n_a + n_b)R_{OO}^w = n_a R_{OO}^a + n_b R_{OO}^b$$

(Rów. 12)

gdzie R_{OO}^a i R_{OO}^b oznaczają odległości tlen–tlen pomiędzy cząsteczkami wody, odpowiednio zaburzonej przez osmolit (a) oraz niezaburzonej (b), a n_a i n_b to liczba moli wody odpowiednio zaburzonej i niezaburzonej. Dzielać równanie 12 przez (n_a+n_b) otrzymujemy:

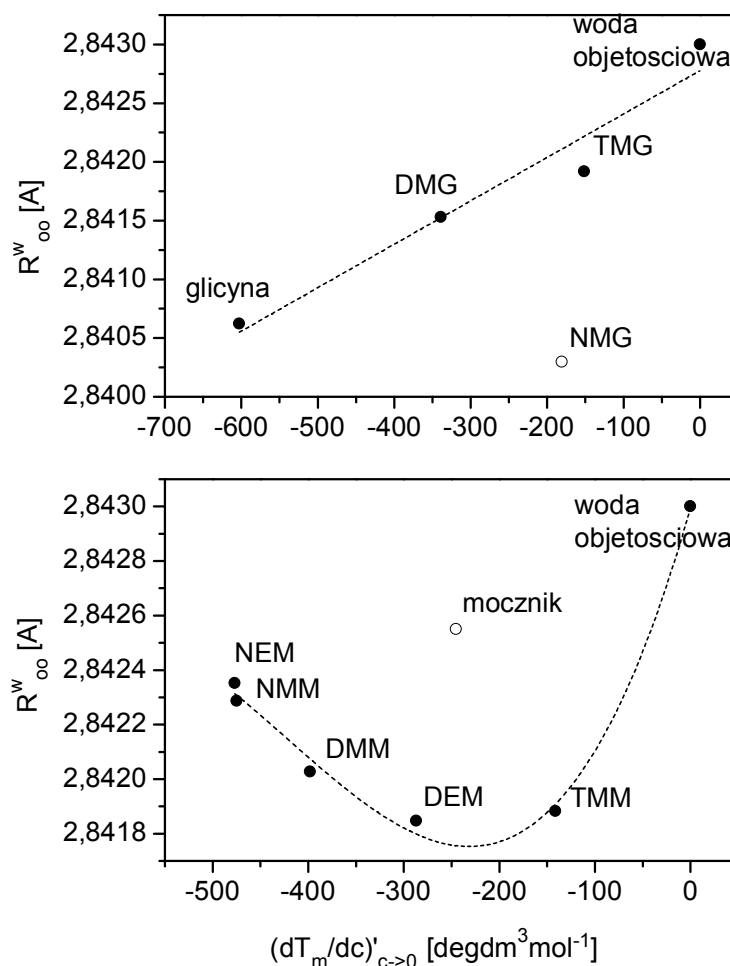
$$R_{OO}^w = R_{OO}^a x^a + R_{OO}^b x^b$$

(Rów. 13)

gdzie x^a i x^b to ułamki molowe odpowiednio wody zaburzonej i niezaburzonej w roztworze. Udział wody zaburzonej przez osmolit wyraziłam wykorzystując z liczby moli cząsteczek wody zaburzonych przez jeden mol osmolitu (N_{H_2O}). Średnia ważona odległość tlen–tlen uwzględnia udział cząsteczek zaburzonych wody w całej populacji cząsteczek wody w roztworze. Wszystkie badane osmolity powodują, że średnia odległość tlen–tlen wody w ich obecności, ma wartość mniejszą niż w przypadku wody objętościowej.

Zależność pomiędzy średnią ważoną odległością tlen–tlen a parametrem charakteryzującym wpływ osmolitów na temperaturę denaturacji DNA, wskazuje na odmienne zachowanie glicyn i moczników (Rysunek 50).

Glicyna powodując najsilniejsze wzmocnienie wiązań wodorowych wody, najsilniej w grupie obniża temperaturę denaturacji DNA, jednocześnie najslabiej z nim oddziałując (Rysunek 47). Kolejne podstawniki metylowe w cząsteczce glicyny, zbliżają strukturę wody zaburzonej do struktury wody objętościowej, co koresponduje z mniejszą destabilizacją DNA i silniejszym oddziaływaniem z tą makrocząsteczką. Podobnie, jak we wcześniejszych korelacjach, również tutaj z trendu wyłamuje się *N*-metyloglicyna. W grupie pochodnych mocznika z trendu wyłamuje się natomiast sam mocznik.

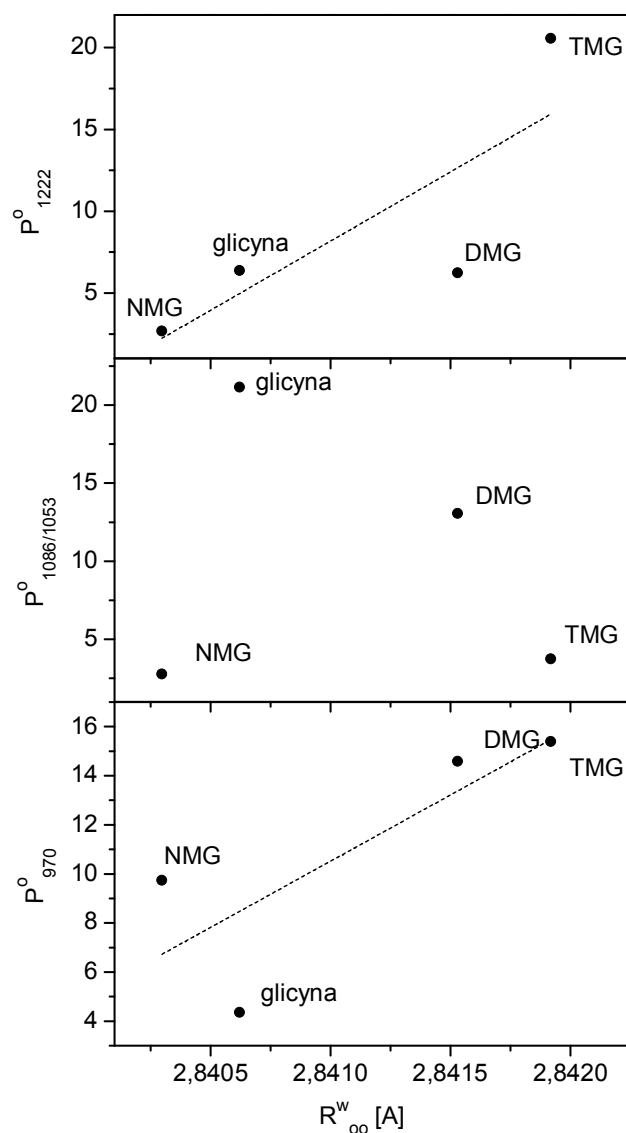


Rysunek 50. Zależność pomiędzy średnią ważoną odległością tlen – tlen, R_{oo}^w a parametrem $(dT_m/dc)'_{c \rightarrow 0}$.

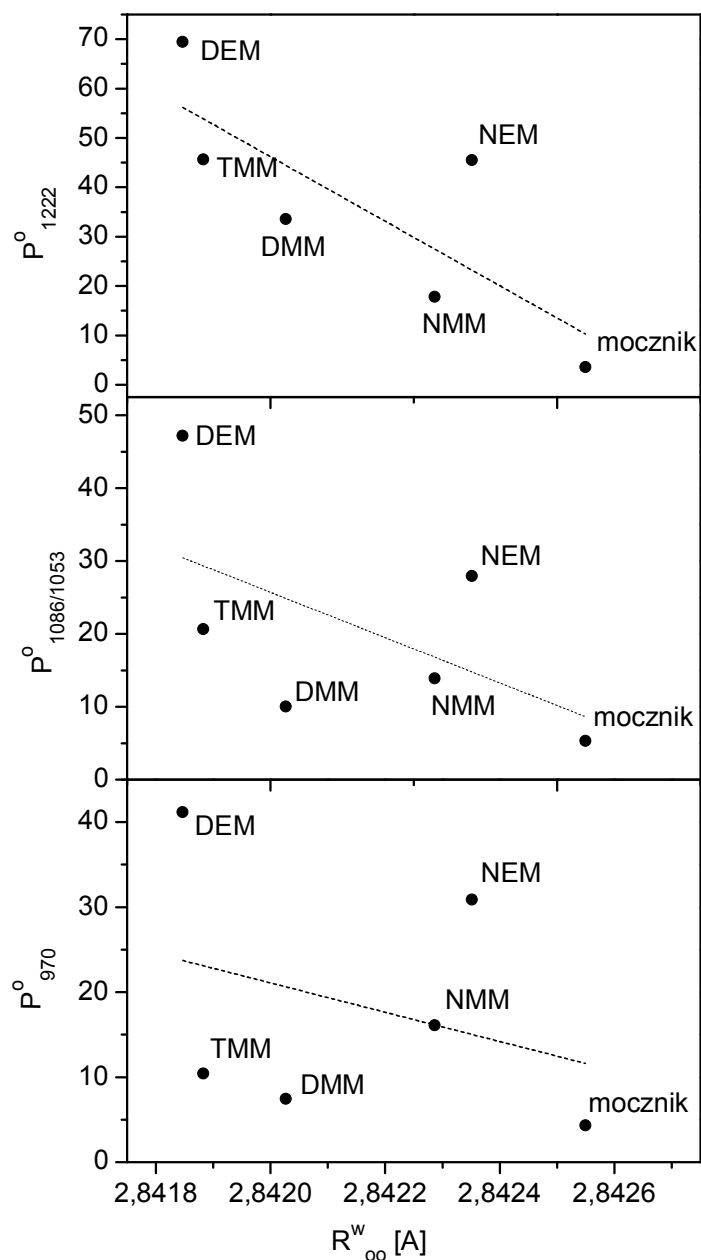
Wśród moczników najsilniejszy wpływ na temperaturę denaturacji DNA mają monopodstawione pochodne. Znaczne obniżenie temperatury denaturacji wiąże się z silnym oddziaływaniem z cząsteczką DNA (Rysunek 47) i większymi średnimi odległościami tlen – tlen (Rysunek 50).

Opisywana w rozdziale 8.2.2 zależność procentowej zawartości struktury zaburzonej DNA przez osmolit od stężenia tego osmolitu, określona dla poszczególnych pasm oscylacyjnych DNA, posłużyła mi do wyznaczenia pochodnej tej zależności dla nieskończonego rozcieńczenia każdego z osmolitów, P^0 . Korelacja tej wartości ze średnimi ważonymi odległościami

tlen–tlen dla glicyn, pozwala na przeanalizowanie wpływu stopnia ustrukturyzowania wody przez osmolity na pasma oscylacyjne DNA, świadczące o jego strukturze (Rysunek 51).



Rysunek 51. Zależność parametru P^o dla pasm 1222, 1086/1053 i 970 cm^{-1} DNA od średniej ważonej odległości tlen–tlen w roztworach w obecności pochodnych glicyny.



Rysunek 52. Zależność parametru P° dla pasm 1222, 1086/1053 i 970 cm^{-1} DNA od średniej ważonej odległości tlen–tlen w roztworach w obecności pochodnych mocznika.

Spośród glicyn, osmolity, które słabiej oddziałują z wodą, powodują silniejsze zaburzenie w obrębie pasm 1222 i 970 cm^{-1} , będących markerami formy B-DNA. Jak wcześniej zostało wspomniane, DNA w wyniku

oddziaływania z osmolitami zmienia swoją strukturę z formy B na formę A-DNA. Efekt ten jest szczególnie widoczny w przypadku glicyn. Pasma 1086/1053 cm^{-1} , czułe także na bezpośrednie oddziaływanie z grupą fosforanową²⁰⁶, może wskazywać na wiązanie wodorowe glicyny z grupą fosforanową DNA. Wniosek ten może ewentualnie dotyczyć także *N,N*-dimetyloglicyny.

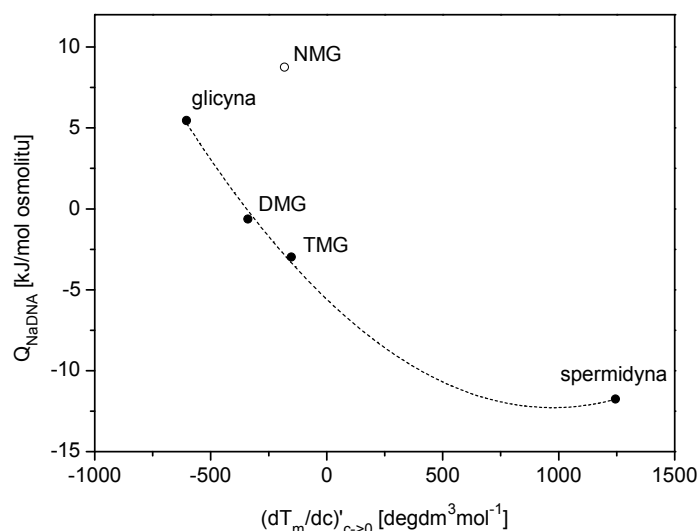
Moczniki najsilniej wzmacniające wiązania wodorowe w wodzie, powodują również największe zaburzenie struktury DNA (Rysunek 52), ale w niewielkim stopniu wpływają na jego temperaturę denaturacji (Rysunek 50). Jest to widoczne na podstawie pasm oscylacyjnych DNA, które reprezentują stan grup fosforanowych w widmie DNA. Mocznik, w otoczeniu którego woda ma strukturę najbardziej zbliżoną do czystej wody, powoduje jednocześnie minimalne zaburzenie w zakresie grup fosforanowych. Zastępowanie w cząsteczce mocznika atomów wodoru podstawnikami, powoduje że sfera hydratacyjna osmolitu staje się silniejsza, a DNA w roztworze ulega dehydratacji, przez co ulega silniejszemu zaburzeniu.

Uogólnienie obserwacji

Glicyny są silniejszymi donorami wiązania wodorowego niż akceptorami tego wiązania. Oba centra tworzenia wiązania wodorowego są silniejsze względem tych, którymi dysponują cząsteczki wody. Moczniki są natomiast silniejszymi akceptorami wiązania wodorowego niż donorami tego wiązania. Moczniki są słabszym donorem wiązania wodorowego niż woda, lecz nieco silniejszym niż woda akceptorem tego wiązania. Stwierdzenia te wynikają z obliczeń DFT hydratacji obu grup osmolitów oraz analizy widm HDO zaburzonej obecnością osmolitów w roztworze wodnym¹⁹⁵.

Wartość pH badanych roztworów oscyluje w granicach 5.5 – 6.0, co sprawia, że pochodne glicyny występują w tych warunkach jako jony obojnacze. Fakt ten skutkuje ponad dwukrotnie wyższym momentem dipolowym tych cząsteczek względem cząsteczek badanych pochodnych mocznika. Dodatni biegun dipola glicyn pokrywa się z lokalizacją grupy aminowej, będącej dodatkowo silnym donorem wiązania wodorowego (z wyjątkiem *N,N,N*-trimetyloglicyny). Okoliczności te sprawiają, że glicyny mogą oddziaływać z grupami fosforanowymi DNA sposobem dipol-dipol. Najlepszą tego ilustracją jest zależność, na której dodatkowo naniesiono punkt

dla spermidyny, stabilizatora DNA oddziałującego z grupami fosforanowymi (Rysunek 53). Im silniejsze jest oddziaływanie glicyn z DNA, tym mniejsza destabilizacja tej makrocząsteczki. Im więcej jest protonów aminowych, tym większa destabilizacja w grupie glicyn oraz bardziej dodatnia entalpia oddziaływania z DNA (wyjątkiem jest *N*-metyloglicyna). Wydaje się, że tworzenie wiązań wodorowych przez glicyny z grupą fosforanową DNA wymaga odsunięcia jonu sodowego z otoczenia grupy fosforanowej, co jest niekorzystne dla stabilności DNA i wymaga nakładu energii. Zatem czysto elektrostatyczne oddziaływanie momentu dipolowego glicyn z grupą fosforanową jest prawdopodobnie bardziej korzystne.



Rysunek 53. Rozszerzenie zależności entalpii oddziaływania soli sodowej DNA z osmolitami od parametru $(dT_m/dc)'_{c \rightarrow 0}$ o spermidynę.

N-metyloglicyna zachowuje się tak, jakby miała mniej wodorów aminowych niż *N,N*-dimetyloglicyna i była podobna do *N,N,N*-trimetyloglicyny. *N*-metyloglicyna charakteryzuje się szczególnie silną sferą hydratacyjną w grupie pochodnych glicyny (R_{OO}). Strefa hydratacyjna tej cząsteczki wykazuje największą średnią energię wiązań wodorowych otaczającej wody. Badania przeprowadzone w naszej Katedrze²⁰⁷ wskazują, że ugrupowanie aminowe typu $-N(CH_3)H$ charakteryzuje się szczególnie trwałą sferą hydratacyjną, wykazującą właściwość wzmacniania struktury wody. Obserwacja ta oparta jest na wynikach badań widmowych FTIR

metylo pochodnych moczników a także amidów¹⁹⁵. Jeszcze bardziej nieoczekiwana jest obserwacja, że podstawienie drugiego atomu wodoru przez grupę metylową redukuje ten efekt. Zgodnie z postawioną hipotezą w tym zakresie, struktura pseudoklatratowa (wnęka w strukturze własnej wody) zawierająca grupę metylową mieści w swoim wnętrzu także sąsiadujący atom wodoru, a omawiane ugrupowanie szczególnie stabilizuje tę strukturę klatratową (wnękę w strukturze wody). Obecnie prowadzone są w Katedrze badania teoretyczne, mające na celu weryfikację tej hipotezy. Wydaje się wielce prawdopodobne, że podobnego typu efekt może tłumaczyć także szczególną trwałość strefy hydratacyjnej *N*-metyloglicyny względem pozostałych metylowych pochodnych glicyny, a tym samym łamanie wielu z przedstawionych w tej pracy zależności.

Oddziaływanie moczników z grupami fosforanowymi DNA mogłoby być tylko bardzo słabe, ze względu na znacznie niższy niż w przypadku glicyn moment dipolowy oraz słabe zdolności donorowe wiązania wodorowego. Odmienne zachowanie się moczników względem glicyn w stosunku do DNA praktycznie wyklucza taką możliwość. Uogólniając uzyskane wyniki można uznać, że wpływ moczników polega na dehydratacji DNA. Dehydratacja DNA skutkuje zaburzeniem struktury tej makrocząsteczki. Powyższy wniosek potwierdza zależność przedstawiona na Rysunku 52, pokazującym wartości zaburzenia pasm DNA przy 1222, 1086/1053 cm^{-1} odzwierciedlające zaburzenie pasma drgań rozciągających grupy fosforanowej.

W tym miejscu trzeba odróżnić dyskusję wyników w aspekcie przemian strukturalnych DNA oraz tych w aspekcie stabilności tej makrocząsteczki.

W przypadku glicyn zdolność oddziaływania z grupami fosforanowymi DNA sprzyja stabilizacji. Zdolność ta wynika z bardzo wysokiego momentu dipolowego pochodnych glicyny i oddziaływań typu dipol – dipol z grupami fosforanowymi. Możliwość tworzenia bezpośredniego wiązania wodorowego glicyn z grupami fosforanowymi już nie sprzyja stabilności temperaturowej DNA. Utworzenie wiązania wodorowego prawdopodobnie wiąże się z odsunięciem jonu Na^+ ze sfery solwatacyjnej grupy fosforanowej DNA, co wymaga dodatkowego nakładu energii (Rysunek 47) i jest niekorzystne dla stabilności DNA.

W przypadku pochodnych mocznika większa liczba grup alkilowych oraz ich wielkość sprzyja stabilizacji DNA (Rysunek 47) – w mniejszym stopniu

obniża temperaturę denaturacji. Wydaje się, że obecność tych grup w cząsteczce osmolitu sprzyja asocjacji do niepolarnych fragmentów struktury DNA. Tego typu oddziaływanie mogłoby być korzystne i wpływać stabilizująco na makrocząsteczkę. Tę ogólną tendencję łamie mocznik, który charakteryzuje się zdolnością jednoczesnego oddziaływania z obiema komplementarnymi zasadami DNA poprzez grupę aminową (pozbawioną zawady przestrzennej) oraz grupę karboksylową (struktury DFT przedstawione w Materiałach uzupełniających). W przypadku pochodnych mocznika, grupy alkilowe w grupie aminowej osmolitu mogą asocjować z grupami cukrowymi DNA oraz z grupą metylową tyminy w przypadku oddziaływania z parą AT DNA. Oddziaływanie tego typu może być korzystne energetycznie, lecz niesie pewien koszt entropowy. Wniosek dotyczący asocjacji i wynikającej stąd stabilizacji DNA może być traktowany jako hipoteza robocza do dalszych badań w tym zakresie, głównie metodami symulacji komputerowej.

Efekt dehydratacji wywierany przez moczniki obniża stabilność DNA, a przede wszystkim sprzyja zmianom struktury tej makrocząsteczki (Rysunek 52).

Biorąc pod uwagę ogólnie krótsze wartości R_{00}^w w przypadku glicyn względem moczników (Tabela 15), glicyny ogólnie wykazują silniejszą sferę hydratacyjną niż moczniki, przez co silniej obniżają aktywność wody. Zatem glicyny powinny charakteryzować się nawet silniejszą zdolnością do dehydratacji niż moczniki. Złożenie obu efektów, stabilizacji przez oddziaływania typu dipol-dipol z grupami fosforanowymi oraz efektu dehydratacji, skutkuje obniżeniem trwałości DNA.

Pewne modyfikacje zachowań osmolitów obu grup od wyżej sugerowanych zachowań, uzasadniających rozrzut punktów większy niż wynikający z błędów eksperymentalnych, mogą wynikać z ewentualnych oddziaływań osmolitów z zasadami aminowymi. Jak wynika z obliczeń DFT przeprowadzonych w pracy, oddziaływania takie mogą zarówno destabilizować podwójną helisę DNA, ją i ją stabilizować. Analiza widm osmolitów zaburzonych obecnością DNA w roztworze nie wskazuje jednak na obecność bezpośrednich specyficznych oddziaływań. Ogólnie osmolity mogą wpływać w różny sposób na zachowanie się DNA w roztworze. Obecność wzajemnie kompensujących się wpływów bardzo utrudnia interpretację zjawisk w tym skomplikowanym układzie.

Sugerowany w konkluzjach pracy wpływ badanych osmolitów na zmiany struktury i stabilności DNA jest, według mojej wiedzy, pierwszą próbą zgłębienia zagadnienia na podstawie badań układów pozbawionych udziału buforów. Jak wynika z przeprowadzonych w pracy prób, udział substancji buforujących radykalnie wpływa na stabilność i zmiany strukturalne DNA, nieporównywalnie silniej niż czynią to osmolity badane w tej pracy. Uzyskane dotąd wnioski pomimo, że liczne, są wciąż bardzo fragmentaryczne. Poznanie w bardziej satysfakcjonującym stopniu molekularnego wpływu osmolitów na DNA wymaga dalszych pogłębionych badań zarówno eksperymentalnych, jak i teoretycznych ze szczególnym uwzględnieniem symulacji komputerowych.

10 Podsumowanie i wnioski końcowe

W niniejszej pracy doktorskiej zbadany i omówiony został wpływ dwóch grup osmolitów na strukturę i stabilność DNA w roztworach wodnych. Dane strukturalne otrzymano z wykorzystaniem spektroskopii FTIR oraz chemometrycznej analizy uzyskanych widm. W celu scharakteryzowania wpływu osmolitów na stabilność termiczną DNA zastosowano kalorymetrię DSC, natomiast efekty entalpowe oddziaływania osmolitów z DNA oraz towarzyszących temu procesów, uzyskano za pomocą kalorymetrii ITC. Uzupełnienie tych wyników stanowiły obliczenia teoretyczne DFT w układach DNA-woda oraz DNA-osmolit.

Uzyskane dane kalorymetryczne pozwoliły na potwierdzenie słuszności pominięcia buforu w badanych układach. Pokazały one bardzo duży wpływ buforu na stabilność termiczną DNA, znacznie silniejszy niż efekt działania samych osmolitów. Konieczność uwzględnienia tego zjawiska znacznie utrudniałaby interpretację uzyskanych wyników na poziomie molekularnym w przypadku tak złożonego układu.

Badania kalorymetryczne potwierdziły także destabilizujący wpływ osmolitów na DNA, ujawniając jednocześnie różnice w mechanizmie tego procesu wywołane przez metyloglicyny oraz alkilowe pochodne mocznika. W grupie glicyn zauważyć można, że silniejsze oddziaływanie z DNA powoduje jego stabilizację termiczną względem pochodnych słabiej oddziałujących. Natomiast moczniki, które silnie oddziałują na DNA powodują jednocześnie silniejsze obniżenie jego temperatury denaturacji.

Na podstawie danych spektroskopowych oraz uzyskanych, z wykorzystaniem analizy chemometrycznej, widm zaburzonych osmolitów udało mi się wykazać brak bezpośrednich, specyficznych oddziaływań tych związków z makrocząsteczką. Widma zaburzone DNA wskazują natomiast, że mimo odmiennego działania glicyn i moczników na DNA, obie te grupy związków zaburzają strukturę kwasów nukleinowych.

Optymalizacja struktur osmolitów metodą obliczeń teoretycznych DFT w rozpuszczalniku wodnym, w ramach modelu polaryzowalnego kontinuum (PCM), pozwoliła na wyznaczenie ich momentów dipolowych. W obu grupach osmolitów zaobserwowano, że większa wartość momentu dipolowego odpowiada silniejszym oddziaływaniom z DNA. Glicyny w środowisku o pH zbliżonym do neutralnego występują jako jony obojnacze, co warunkuje ich bardzo wysoki moment dipolowy, ponad dwukrotnie większy niż w przypadku

moczników. Okoliczności te wskazują, że glicyny mogą oddziaływać z grupami fosforanowymi DNA sposobem dipol-dipol od strony grupy aminowej.

Uzyskane dane eksperymentalne porównałam z otrzymanymi w zespole profesora Stangreta wynikami dotyczącymi wpływu badanych osmolitów na strukturę wody. Korelacja średniej ważonej odległości tlen-tlen cząsteczek wody w roztworze z parametrem charakteryzującym ich wpływ na temperaturę denaturacji DNA ujawniła odmienne zachowanie obu grup osmolitów wobec kwasów nukleinowych. Glicyny powodujące silne wzmocnienie wiązań wodorowych wody jednocześnie silnie obniżają stabilność termiczną DNA, natomiast największe obniżenie temperatury denaturacji zaobserwować można wśród moczników, które najslabiej modyfikują strukturę wody.

W świetle otrzymanych wyników można stwierdzić, że wpływ moczników na DNA polega na jego dehydratacji, co powoduje zaburzenie struktury oraz obniżenie stabilności tej biocząsteczki. Jednocześnie obserwuje się, że zwiększanie liczby grup alkilowych w cząsteczce mocznika sprzyja stabilizacji DNA, co wskazuje, że grupy te mogą asocjować z niepolarnymi fragmentami DNA.

Glicyny wpływając na grupy fosforanowe DNA poprzez oddziaływania typu dipol-dipol powodują jego stabilizację. Jednocześnie osmolity te wykazują silną sferę hydratacyjną obniżając aktywność wody, co skutkuje dehydratacją i znaczną zmianą struktury DNA. Złożenie obu efektów prowadzi do obniżenia temperatury denaturacji tej biocząsteczki.

Celem przedstawienia pogłębionej teorii wpływu osmolitów na DNA w roztworze wodnym wymagane są dalsze eksperymentalne i teoretyczne badania.

1 1 Dorobek naukowy

Publikacje

Publikacje bezpośrednio dotyczące tematu pracy

Bruździak P, **Rakowska P W**, Stangret J, *Chemometrical method of spectra analysis leading to isolation of lysozyme and ctDNA spectra affected by osmolytes*. Applied Spectroscopy (2012) 66 (11): 1302-1310

Publikacje pośrednio dotyczące tematu pracy

Panuszko A, Wojciechowski M, Bruździak P, **Rakowska P W**, Stangret J, *Characteristics of hydration water around hen egg lysozyme as the protein model in aqueous solution. FTIR spectroscopy and molecular dynamics simulation*. Phys. Chem. Chem. Phys. (2012) 14: 15765-15773

Doniesienia konferencyjne

1. **Rakowska P**, Olszewski M, Kur J, *The use of infrared spectroscopy in thermal stability studies of TaqSSB protein and its complex with single-stranded DNA*. III Ogólnopolska Konferencja: Biotechnologia Molekularna: "Biotechnologia - od badań podstawowych do wdrożeń": BioMillenium 2009, Gdańsk 22-24 październik 2009
2. **Rakowska P**, Olszewski M, Stangret J, Kur J, *The use of FT-IR spectra in examination of structure and stability changes of TaqSSB protein and its complex with ssDNA*. 30th European Congress of Molecular Spectroscopy, Florencja, 29 sierpień – 3 wrzesień 2010
3. **Rakowska P**, Stangret J, *The influence of glycine and its N-methyl derivatives on the dsDNA*. IV Congress of Polish Biotechnology and IV EUROBIOTECH "Four Colours of Biotechnology", Krakow, Poland, October, 12th-15th 2011

4. **Rakowska P W**, Stangret J, *Characteristics of selected osmolytes effects on stability and structure of ctDNA*. BioTech Conference 2013, Sopot, Poland, June 28-29, 2013
5. **Rakowska P W**, Stangret J, *The use of FT-IR spectra in examination of stability and structure changes of DNA in the osmolyte – water – DNA system*, BioTech Conference 2013, Sopot, Poland, June 28-29, 2013

Rozdział w książce

Milewski S, Gabriel I, Kamiński M, Kot-Wasik A, Piątek R, Zalewska-Piątek B, Bruździak P, Jaszczółt M, Laskowski T, **Rakowska P**, *Instrumentalne metody badania struktury i aktywności biomolekuł*. Wyd. Politechniki Gdańskiej, Gdańsk 2013

Stypendia

Stypendium I edycji programu stypendialnego InterPhD – Rozwój interdyscyplinarnych studiów doktoranckich na Politechnice Gdańskiej w zakresie nowoczesnych technologii

12 Bibliografia

1. W. Saenger, *Principles of Nucleic Acid Structure*, 1 edn., Springer-Verlag New York, 1984.
2. H. M. Berman, *Biopolymers*, 1997, **44**, 23-44.
3. J. D. Watson and F. H. C. Crick, *Nature*, 1953, **171**, 737-738.
4. R. Franklin and R. G. Gosling, *The structure of sodium thymonucleate fibers. I, I*, Published for the International Union of Crystallography by Munksgaard, Copenhagen, 1953.
5. A. H. J. Wang, G. J. Quigley, F. J. Kolpak, J. L. Crawford, J. H. van Boom, G. van der Marel and A. Rich, *Nature*, 1979, **282**, 680-686.
6. A. Rich and S. Zhang, *Nat Rev Genet*, 2003, **4**, 566-572.
7. A. Herbert and A. Rich, *Genetica*, 1999, **106**, 37-47.
8. R. V. Gessner, C. A. Frederick, G. J. Quigley, A. Rich and A. H. J. Wang, *J Biol Chem*, 1989, **264**, 7921-7935.
9. J. A. Taboury and E. Taillandier, *Nucleic Acids Res*, 1985, **13**, 4469-4483.
10. S. Hanlon, *Biochem Biophys Res Communicat*, 1966, **23**, 861-867.
11. H. DeVoe and I. Tinoco Jr, *J Mole Biol*, 1962, **4**, 500-517.
12. T. T. Herskovits, *Biochemistry*, 1963, **2**, 335-340.
13. T. T. Herskovits, *Arch Biochem Biophys*, 1962, **97**, 474-484.
14. R. D. and R. R., in *Phys Chem Propert Nucl Acids*, ed. D. J., Academic Press, New York, 1973, pp. 237-318.
15. T. o. P. O. P., in *Basic Principles in Nucleic Acid Chemistry*, ed. T. o. P. O. P., Academic Press, New York, 1974, vol. I, pp. 453-584.
16. E. S. Kryachko and J. R. Sabin, *Int J Quantum Chem*, 2003, **91**, 695-710.
17. M. A. and N. F. F., *J Phys Chem A*, 2008, 281-295.
18. B. Pullman, P. Claverie and J. Caillet, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1966, **55**, 904-912.
19. Z. G. Kudritskaya and V. I. Danilov, *J Theor Biol*, 1976, **59**, 303-318.
20. Y. Kyogoku, R. C. Lord and A. Rich, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1967, **57**, 250-257.
21. D. Voet and A. Rich, *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 1970, **10**, 183-265.
22. T. o. P. O. P., M. I. S. and O. A. C., *J Am Chem Soc*, 1963, **85**, 1289-1296.
23. N. I. Nakano and S. J. Igarashi, *Biochemistry*, 1970, **9**, 577-583.
24. W. B. Gratzer, *Eur J Biochem*, 1969, **10**, 184-187.
25. T. N. Solie and J. A. Schellman, *J Mol Biol*, 1968, **33**, 61-77.
26. P. R. Mitchell and H. Sigel, *Eur J Biochem*, 1978, **88**, 149-154.
27. M. D. Topal and M. M. Warshaw, *Biopolymers*, 1976, **15**, 1775-1793.
28. C. A. Haasnoot and C. Altona, *Nucleic Acids Res*, 1979, **6**, 1135-1149.
29. D. F. Waugh, *Adv Protein Chem*, 1954, **9**, 325-437.
30. R. L. Ornstein, R. Rein, D. L. Breen and R. D. Macelroy, *Biopolymers*, 1978, **17**, 2341-2360.
31. J. Texter, *Prog Biophys Mol Biol*, 1978, **33**, 83-97.
32. E. Westhof, *Annu Rev Biophys Biophys Chem*, 1988, **17**, 125-144.
33. W. Saenger, *Annu Rev Biophys Biophys Chem*, 1987, **16**, 93-114.
34. T. V. Chalikian, G. E. Plum, A. P. Sarvazyan and K. J. Breslauer, *Biochemistry*, 1994, **33**, 8629-8640.
35. M. L. Kopka, C. Yoon, D. Goodsell, P. Pjura and R. E. Dickerson, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1985, **82**, 1376-1380.

36. M. Falk, K. A. Hartman and R. C. Lord, *J Am Chem Soc*, 1963, **85**, 391-&.
37. S. Arnott and E. Selsing, *J Mol Biol*, 1974, **88**, 509-521.
38. J. Pilet and J. Brahms, *Nat New Biol*, 1972, **236**, 99-100.
39. V. I. Ivanov, L. E. Minchenkova, A. K. Schyolkina and A. I. Poletayev, *Biopolymers*, 1973, **12**, 89-110.
40. F. M. Pohl, *Nature*, 1976, **260**, 365-366.
41. Y. Nishimura, C. Torigoe and M. Tsuboi, *Nucleic Acids Res*, 1986, **14**, 2737-2748.
42. V. I. Ivanov, L. E. Minchenkova, G. Burckhardt, E. Birch-Hirschfeld, H. Fritzsche and C. Zimmer, *Biophys J*, 1996, **71**, 3344-3349.
43. Y. Wang, G. A. Thomas and W. L. Peticolas, *J Biomol Struct Dyn*, 1989, **6**, 1177-1187.
44. Y. Kim, J. H. Geiger, S. Hahn and P. B. Sigler, *Nature*, 1993, **365**, 512-520.
45. S. C. Mohr, N. V. Sokolov, C. M. He and P. Setlow, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991, **88**, 77-81.
46. J. Texter, *Prog Biophys Mol Biol*, 1978, **33**, 83-97.
47. H. M. Berman, *Curr Opin Struc Biol*, 1994, **4**, 345-350.
48. M. Feig and B. M. Pettitt, *J Phys Chem*, 1997, **101**, 7361-7363.
49. P. Langan, V. T. Forsyth, A. Mahendrasingam, W. J. Pigram, S. A. Mason and W. Fuller, *J Biomol Struct Dyn*, 1992, **10**, 489-503.
50. M. W. Shotton, L. H. Pope, T. Forsyth, P. Langan, R. C. Denny, U. Giesen, M. T. Dauvergne and W. Fuller, *Biophys Chem*, 1997, **69**, 85-96.
51. H. R. Drew and R. E. Dickerson, *J Mol Biol*, 1981, **151**, 535-556.
52. H. Savage and A. Wlodawer, *Methods Enzymol*, 1986, **127**, 162-183.
53. M. L. Kopka, A. V. Fratini, H. R. Drew and R. E. Dickerson, *J Mol Biol*, 1983, **163**, 129-146.
54. M. C. Wahl and M. Sundaralingam, *Trends Biochem Sci*, 1997, **22**, 97-102.
55. D. B. Tippin and M. Sundaralingam, *Biochemistry*, 1997, **36**, 536-543.
56. X. Shui, L. McFail-Isom, G. G. Hu and L. D. Williams, *Biochemistry*, 1998, **37**, 8341-8355.
57. M. G. Kubinec and D. E. Wemmer, *J Am Chem Soc*, 1992, **114**, 8739-8740.
58. E. Liepinsh, G. Otting and K. Wüthrich, *Nucleic Acids Res*, 1992, **20**, 6549-6553.
59. E. Liepinsh, W. Leupin and G. Otting, *Nucleic Acids Res*, 1994, **22**, 2249-2254.
60. C. J. Alden and S. H. Kim, *J Mol Biol*, 1979, **132**, 411-434.
61. M. Falk, R. C. Lord and K. A. Hartman, *J Am Chem Soc*, 1962, **84**, 3843-&.
62. M. Falk, K. A. Hartman and R. C. Lord, *J Am Chem Soc*, 1963, **85**, 387-&.
63. M. Falk, A. G. Poole and C. G. Goymour, *Can J Chem*, 1970, **48**, 1536-&.
64. J. G. Milton and W. C. Galley, *Biopolymers*, 1986, **25**, 1673-1684.
65. V. A. Makarov, M. Feig, B. K. Andrews and B. M. Pettitt, *Biophys J*, 1998, **75**, 150-158.
66. T. V. Chalikian, A. P. Sarvazyan, G. E. Plum and K. J. Breslauer, *Biochemistry*, 1994, **33**, 2394-2401.
67. N. J. Tao, S. M. Lindsay and A. Rupprecht, *Biopolymers*, 1989, **28**, 1019-1030.
68. M. Harmouchi, G. Albiser and S. Premilat, *Eur Biophys J*, 1990, **19**, 87-92.

69. C. R. Robinson and S. G. Sligar, *J Mol Biol*, 1993, **234**, 302-306.
70. C. J. Alden and S.-H. Kim, *J Mol Biol*, 1979, **132**, 411-434.
71. B. Schneider, K. Patel and H. M. Berman, *Biophys J*, 1998, **75**, 2422-2434.
72. M. Feig and B. M. Pettitt, *J Mol Biol*, 1999, **286**, 1075-1095.
73. M.-J. B. Tunis and J. E. Hearst, *Biopolymers*, 1968, **6**, 1345-1353.
74. T. V. Chalikian, J. Volker, A. R. Srinivasan, W. K. Olson and K. J. Breslauer, *Biopolymers*, 1999, **50**, 459-471.
75. M. Feig and B. M. Pettitt, *Biopolymers*, 1998, **48**, 199-209.
76. T. Umehara, S. Kuwabara, S. Mashimo and S. Yagihara, *Biopolymers*, 1990, **30**, 649-656.
77. H. R. Drew and R. E. Dickerson, *J Mol Biol*, 1981, **151**, 535-556.
78. E. Clementi and G. Corongiu, *Gazz Chim Ital*, 1979, **109**, 201-205.
79. J. Pilet and J. Brahms, *Nat New Biol*, 1972, **236**, 99-&.
80. H. R. Drew, S. Samson and R. E. Dickerson, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1982, **79**, 4040-4044.
81. J. R. Quintana, K. Grzeskowiak, K. Yanagi and R. E. Dickerson, *J Mol Biol*, 1992, **225**, 379-395.
82. M. Eisenstein and Z. Shakked, *J Mol Biol*, 1995, **248**, 662-678.
83. A. D. MacKerell, J. Wiorcikiewicz-Kuczera and M. Karplus, *J Am Chem Soc*, 1995, **117**, 11946-11975.
84. P. H. Yancey, W. R. Blake and J. Conley, *Comp Biochem Physiol a-Mol Integr Physiol*, 2002, **133**, 667-676.
85. R. K. Kinne, *J Exp Zool*, 1993, **265**, 346-355.
86. P. H. Yancey, *Sci Prog*, 2004, **87**, 1-24.
87. P. H. Yancey, M. E. Clark, S. C. Hand, R. D. Bowlus and G. N. Somero, *Science*, 1982, **217**, 1214-1222.
88. L. Petraccone, S. Baiano, G. Fiorentino, G. Barone and C. Giancola, *Thermochim Acta*, 2004, **418**, 47-52.
89. M. B. Burg and J. D. Ferraris, *J Biol Chem*, 2008, **283**, 7309-7313.
90. W. Henke, K. Herdel, K. Jung, D. Schnorr and S. A. Loening, *Nucleic Acids Res*, 1997, **25**, 3957-3958.
91. K. Koumoto, H. Ochiai and N. Sugimoto, *Tetrahedron*, 2008, **64**, 168-174.
92. X. Q. Chen, X. D. Zhang, R. Q. Liang and M. Q. Cao, *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*, 2004, **20**, 715-718.
93. J. Kang, M. S. Lee and D. G. Gorenstein, *J Biochem Biophys Methods*, 2005, **64**, 147-151.
94. D. D. Pratyush, S. Tiwari, A. Kumar and S. K. Singh, *Gene*, 2012, **497**, 269-272.
95. M. Musso, R. Bocciardi, S. Parodi, R. Ravazzolo and I. Ceccherini, *J Mol Diagn*, 2006, **8**, 544-550.
96. K. Koumoto, H. Ochiai and N. Sugimoto, *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*, 2008, 257-258.
97. M. A. Jensen, M. Fukushima and R. W. Davis, *PLoS One*, 2010, **5**, e11024.
98. T. Arakawa, D. Ejima, Y. Kita and K. Tsumoto, *Biochim Biophys Acta*, 2006, **1764**, 1677-1687.
99. T. Arakawa, S. J. Prestrelski, W. C. Kenney and J. F. Carpenter, *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, **46**, 307-326.

100. A. Chakraborty, M. Sarkar and S. Basak, *J Colloid Interface Sci*, 2005, **287**, 312-317.
101. W. Xing and C. B. Rajashekar, *Environ Exp Bot*, 2001, **46**, 21-28.
102. C. Mueller-Dieckmann, B. Kauffmann and M. S. Weiss, *J Appl Crystallography*, 2011, **44**, 433-436.
103. S. Ohtake, R. Martin, A. Saxena, B. Pham, G. Chiueh, M. Osorio, D. Kopecko, D. Xu, D. Lechuga-Ballesteros and V. Truong-Le, *Vaccine*, 2011, **29**, 2761-2771.
104. W. A. Rees, T. D. Yager, J. Korte and P. H. Vonhippel, *Biochemistry*, 1993, **32**, 137-144.
105. G. Barone, P. DelVecchio, D. Esposito, D. Fessas and G. Graziano, *J Chem Soc Faraday T*, 1996, **92**, 1361-1367.
106. C. S. V. Rajendrakumar, T. Suryanarayana and A. R. Reddy, *FEBS Lett.*, **410**, 201-205.
107. L. R. Singh, N. K. Poddar, T. A. Dar, R. Kumar and F. Ahmad, *Life Sci*, 2011, **88**, 117-125.
108. J. Hong, M. W. Capp, C. F. Anderson, R. M. Saecker, D. J. Felitsky, M. W. Anderson and M. T. Record, *Biochemistry*, 2004, **43**, 14744-14758.
109. M. T. Record, Jr., W. Zhang and C. F. Anderson, *Adv Protein Chem*, 1998, **51**, 281-353.
110. L. J. Nordstrom, C. A. Clark, B. Andersen, S. M. Champlin and J. J. Schweinefus, *Biochemistry*, 2006, **45**, 9604-9614.
111. D. J. Felitsky, J. G. Cannon, M. W. Capp, J. Hong, A. W. Van Wynsberghe, C. F. Anderson and M. T. Record, Jr., *Biochemistry*, 2004, **43**, 14732-14743.
112. M. W. Capp, L. M. Pegram, R. M. Saecker, M. Kratz, D. Riccardi, T. Wendorff, J. G. Cannon and M. T. Record, Jr., *Biochemistry*, 2009, **48**, 10372-10379.
113. W. B. Melchior and P. H. Von Hippel, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1973, **70**, 298-302.
114. H. Klump and W. Burkart, *Biochim Biophys Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis*, 1977, **475**, 601-604.
115. A. M. Liquori, Costanti, L., Crescenzi, V., V. Elia, E. Giglio, R. Puliti, Desantis, M and Vitaglia, V., *J Mol Biol*, 1967, **24**, 113-&.
116. C. H. Spink, N. Garbett and J. B. Chaires, *Biophys Chem*, 2007, **126**, 176-185.
117. J. J. Schweinefus, R. J. Menssen, J. M. Kohler, E. C. Schmidt and A. L. Thomas, *Biochemistry*, 2013, **52**, 9339-9346.
118. Y. S. Babayan, *Mol Biol*, 1988 **22**, 1204-1210.
119. V. M. Aslanyan, Y. S. Babayan and S. G. Arutyunyan, *Biophysics*, 1984, **29**, 410-414.
120. J. J. Schweinefus, M. J. Kuprian, J. W. Lamppa, W. E. Merker, K. N. Dorn and G. W. Muth, *Biochemistry*, 2007, **46**, 9068-9079.
121. C. H. Spink and J. B. Chaires, *Biochemistry*, 1999, **38**, 496-508.
122. J. Hong, M. W. Capp, C. F. Anderson and M. T. Record, *Biophys Chem*, 2003, **105**, 517-532.
123. U. D. Priyakumar, C. Hyeon, D. Thirumalai and A. D. Mackerell, Jr., *J Am Chem Soc*, 2009, **131**, 17759-17761.

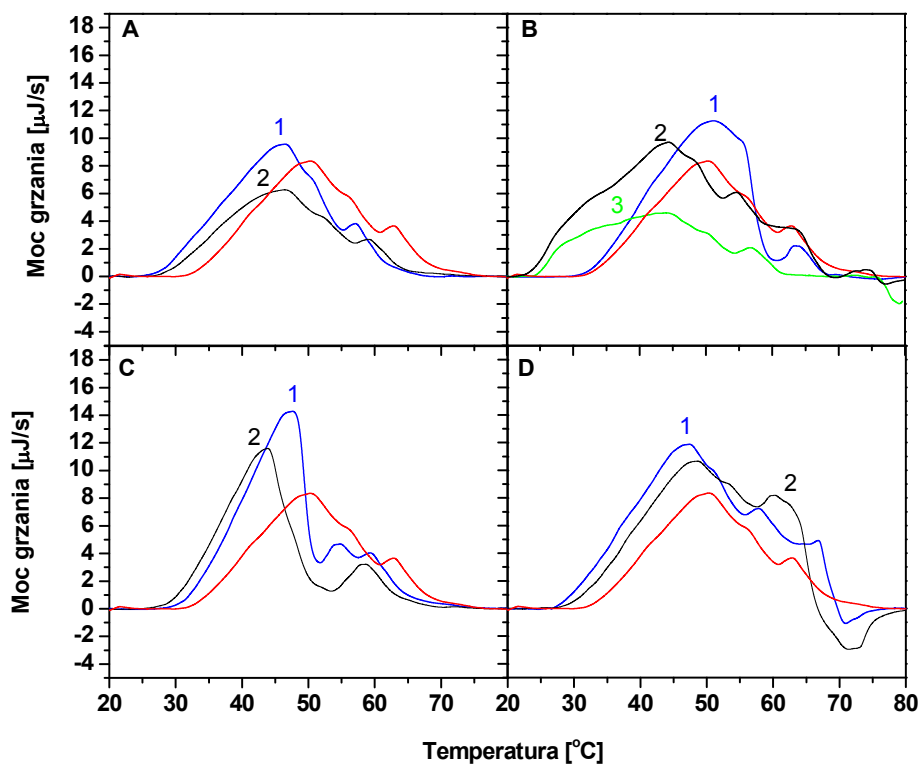
124. M. H. Goyns, *J Theor Biol*, 1982, **97**, 577-589.
125. A. E. Pegg, *IUBMB Life*, 2009, **61**, 880-894.
126. K. Igarashi and K. Kashiwagi, *Plant Physiol Biochem*, 2010, **48**, 506-512.
127. E. W. Gerner and F. L. Meyskens, *Nat Rev Cancer*, 2004, **4**, 781-792.
128. C. W. Tabor and H. Tabor, *Annu Rev Biochem*, 1984, **53**, 749-790.
129. S. Sarhan and N. Seiler, *Biol Chem Hoppe-Seyler*, 1989, **370**, 1279-1284.
130. B. G. Feuerstein, J. Szollosi, H. S. Basu and L. J. Marton, *Cancer Res*, 1992, **52**, 6782-6789.
131. P. M. Vertino, R. J. Bergeron, P. F. Cavanaugh and C. W. Porter, *Biopolymers*, 1987, **26**, 691-703.
132. H. Tabor, *Biochemistry*, 1962, **1**, 496-&.
133. H. R. Mahler, B. D. Mehrotra and C. W. Sharp, *Biochem Biophys Res Commun*, 1961, **4**, 79-&.
134. P. F. Cavanaugh, Z. P. Pavelic and C. W. Porter, *Cancer Res*, 1984, **44**, 3856-3861.
135. U. Bachrach and G. Eilon, *Biochim Biophys Acta*, 1969, **179**, 473-&.
136. D. T. Hung, L. J. Marton, D. F. Deen and R. H. Shafer, *Science*, 1983, **221**, 368-370.
137. A. K. Abraham and A. Pihl, *Trends in Biochem Sci*, 1981, **6**, 106-107.
138. H. Tabor, *Biochem Biophys Res Commun*, 1960, **3**, 382-385.
139. S. S. Cohen and M. L. Greenberg, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences*, 1981, **78**, 5470-5474.
140. R. W. Wilson and V. A. Bloomfield, *Biochemistry*, 1979, **18**, 2192-2196.
141. A. Rodger, I. S. Blagbrough, G. Adlam and M. L. Carpenter, *Biopolymers*, 1994, **34**, 1583-1593.
142. C. N. N'Soukpoe-Kossi, A. A. Ouameur, T. Thomas, A. Shirahata, T. J. Thomas and H. A. Tajmir-Riahi, *Biomacromolecules*, 2008, **9**, 2712-2718.
143. T. T. Sakai, R. Torget, J. I. C. E. Freda and S. S. Cohen, *Nucleic Acids Res*, 1975, **2**, 1005-1022.
144. M. A. Xaplanteri, A. D. Petropoulos, G. P. Dinos and D. L. Kalpaxis, *Nucleic Acids Res*, 2005, **33**, 2792-2805.
145. A. A. Ouameur, P. Bourassa and H. A. Tajmir-Riahi, *Rna-a Publ Rna Soc*, 2010, **16**, 1968-1979.
146. M. E. McMahon and V. A. Erdmann, *Biochemistry*, 1982, **21**, 5280-5288.
147. L. Frydman, P. C. Rossomando, V. Frydman, C. O. Fernandez, B. Frydman and K. Samejima, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89**, 9186-9190.
148. B. L. Varnado, C. J. Voci, L. M. Meyer and J. K. Coward, *Bioorganic Chem*, 2000, **28**, 395-408.
149. J. Ruiz-Chica, M. A. Medina, F. Sanchez-Jimenez and F. J. Ramirez, *J Mol Struct*, 1999, **481**, 455-458.
150. J. Ruiz-Chica, M. A. Medina, F. Sanchez-Jimenez and F. J. Ramirez, *Biophys J*, 2001, **80**, 443-454.
151. J. Ruiz-Chica, M. A. Medina, F. Sanchez-Jimenez and F. J. Ramirez, *Biochim Biophys Acta-Gene Struct Expression*, 2003, **1628**, 11-21.
152. H. Deng, V. A. Bloomfield, J. M. Benevides and G. J. Thomas, *Nucleic Acids Res.*, 2000, **28**, 3379-3385.

153. A. A. Ouameur and H. A. Tajmir-Riahi, *J Biol Chem*, 2004, **279**, 42041-42054.
154. C. N. N'Soukpoe-Kossi, A. A. Ouameur, T. Thomas, T. J. Thomas and H. A. Tajmir-Riahi, *Biochem Cell Biol*, 2009, **87**, 621-630.
155. D. Esposito, P. DelVecchio and G. Barone, *J Am Chem Soc*, 1997, **119**, 2606-2613.
156. A. Kabir, M. Hossain and G. S. Kumar, *J Chem Thermodyn*, 2013, **57**, 445-453.
157. C. F. Anderson and M. T. Record, *Ann Rev Phys Chem*, 1982, **33**, 191-222.
158. G. S. Manning, *Q Rev Biophys*, 1978, **11**, 179-246.
159. G. S. Manning, *Accounts Chem Res*, 1979, **12**, 443-449.
160. I. Rouzina and V. A. Bloomfield, *J Phys Chem*, 1996, **100**, 4292-4304.
161. S. Jain, G. Zon and M. Sundaralingam, *Biochemistry*, 1989, **28**, 2360-2364.
162. D. B. Tippin and M. Sundaralingam, *J Mol Biol*, 1997, **267**, 1171-1185.
163. M. C. Wahl and M. Sundaralingam, *Biopolymers*, 1997, **44**, 45-63.
164. M. J. Cliff and J. E. Ladbury, *J Mol Recognit*, 2003, **16**, 383-391.
165. M. J. Cliff, A. Gutierrez and J. E. Ladbury, *J Mol Recognit*, 2004, **17**, 513-523.
166. A. Ababou and J. E. Ladbury, *J Mol Recognit*, 2006, **19**, 79-89.
167. A. Ababou and J. E. Ladbury, *J Mol Recognit*, 2007, **20**, 4-14.
168. O. Okhrimenko and M. Jelesarov, *J Mol Recognit*, 2008, **21**, 1-19.
169. S. Bjelic and I. Jelesarov, *J Mol Recognit*, 2008, **21**, 289-311.
170. R. J. Falconer, A. Penkova, I. Jelesarov and B. M. Collins, *J Mol Recognit*, 2010, **23**, 395-413.
171. R. J. Falconer and B. M. Collins, *J Mol Recognit*, 2011, **24**, 1-16.
172. R. Ghai, R. J. Falconer and B. M. Collins, *J Mol Recognit*, 2012, **25**, 32-52.
173. G. A. Holdgate and W. H. J. Ward, *Drug Discov Today*, 2005, **10**, 1543-1550.
174. W. Pohle and H. Fritzsche, *Nucleic Acids Res*, 1980, **8**, 2527-2535.
175. J. A. Taboury, J. Liquier and E. Taillandier, *Can J Chem-Rev Can Chim*, 1985, **63**, 1904-1909.
176. M. Ouali, R. Letellier, J. S. Sun, A. Akhebat, F. Adnet, J. Liquier and E. Taillandier, *J Am Chem Soc*, 1993, **115**, 4264-4270.
177. M. Lindqvist and A. Graslund, *J Mol Biol*, 2001, **314**, 423-432.
178. R. Ahmad, M. Naoui, J. F. Neault, S. Diamantoglou and H. A. TajmirRiahi, *J Biomol Struct Dyn*, 1996, **13**, 795-802.
179. H. Fritzsche, A. Akhebat, E. Taillandier, K. Rippe and T. M. Jovin, *Nucleic Acids Res*, 1993, **21**, 5085-5091.
180. Y. Kyogoku, T. Shimanouchi, M. Tsuboi and I. Watanabe, *J Mol Biol*, 1961, **3**, 741-&.
181. M. Banyay, M. Sarkar and A. Graslund, *Biophys Chem*, 2003, **104**, 477-488.
182. M. Tsuboi, *Appl. Spectrosc. Rev.*, 1969, **3**, 45-&.
183. J. Stangret, *Spectr Lett*, 1988, **21**, 369-381.
184. J. Stangret and E. KamienskaPiotrowicz, *J Chem Soc-Faraday Trans*, 1997, **93**, 3463-3466.
185. P. Brudziak, A. Panuszko and J. Stangret, *Vib Spectrosc*, 2010, **54**, 65-71.
186. P. Brudziak, P. W. Rakowska and J. Stangret, *Appl Spectrosc*, 2012, **66**, 1302-1310.
187. A. D. Becke, *J. Chem. Phys.*, 1993, **98**, 5648-5652.

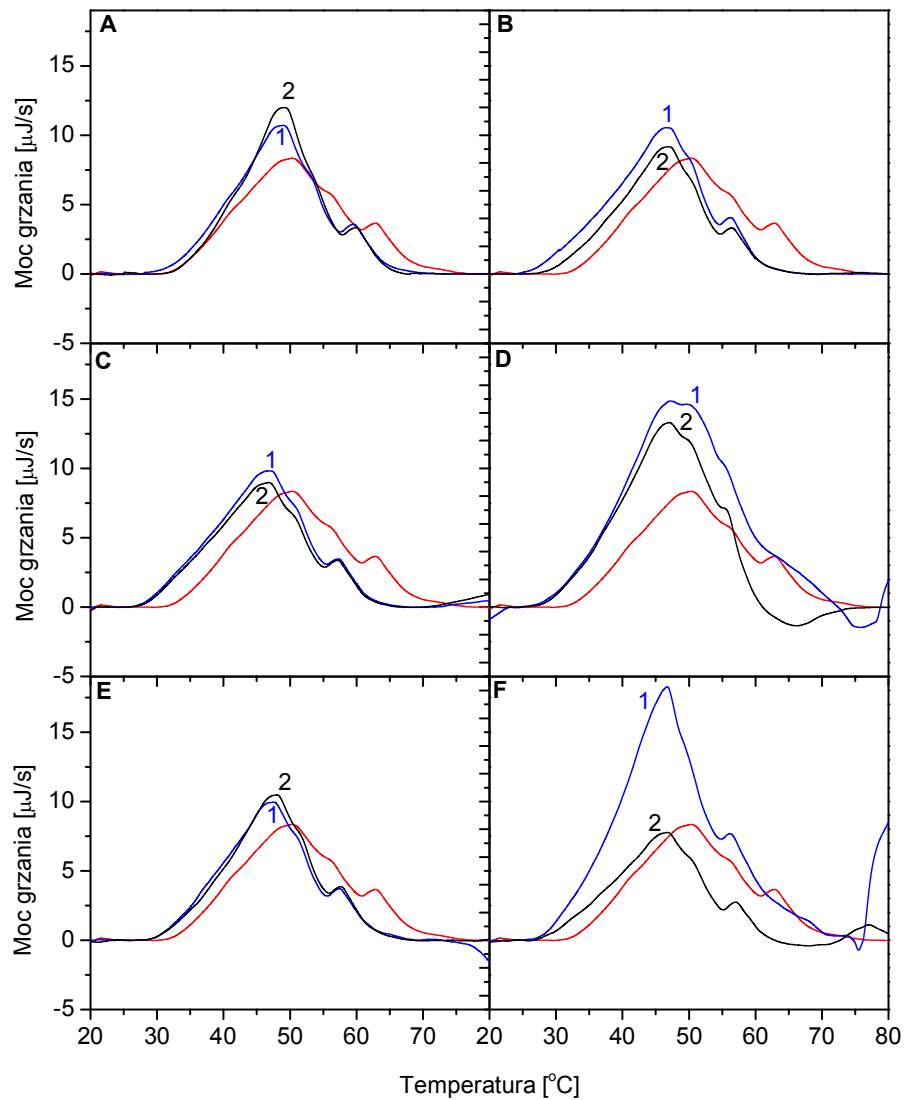
188. C. T. Lee, W. T. Yang and R. G. Parr, *Phys Rev B*, 1988, **37**, 785-789.
189. R. Krishnan, J. S. Binkley, R. Seeger and J. A. Pople, *J. Chem. Phys.*, 1980, **72**, 650-654.
190. M. J. Frisch, J. A. Pople and J. S. Binkley, *J. Chem. Phys.*, 1984, **80**, 3265-3269.
191. M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega and V. Barone, *J. Chem. Phys.*, 2002, **117**, 43-54.
192. B. Mennucci and J. Tomasi, *J. Chem. Phys.*, 1997, **106**, 5151-5158.
193. J. Tomasi, B. Mennucci and E. Cancès, *Theochem-J Mol Struct*, 1999, **464**, 211-226.
194. A. A. Ouameur and H. A. Tajmir-Riahi, *J Biol Chem*, 2004, **279**, 42041-42054.
195. P. A, *Rozprawa doktorska*, Politechnika Gdańska, 2011.
196. J. Stangret and T. Gampe, *J Mol Struct*, 2005, **734**, 183-190.
197. O. Heby, *Differentiation*, 1981, **19**, 1-20.
198. A. E. Pegg, *Cancer Res*, 1988, **48**, 759-774.
199. A. Tkachenko, L. Nesterova and M. Pshenichnov, *Archives of microbiology*, 2001, **176**, 155-157.
200. L. J. Marton and A. E. Pegg, *Annual review of pharmacology and toxicology*, 1995, **35**, 55-91.
201. R. A. Casero, Jr. and P. M. Woster, *Journal of medicinal chemistry*, 2001, **44**, 1-26.
202. T. Thomas and T. J. Thomas, *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 2001, **58**, 244-258.
203. T. J. Thomas and V. A. Bloomfield, *Biopolymers*, 1984, **23**, 1295-1306.
204. S. Jain, G. Zon and M. Sundaralingam, *Biochemistry*, 1989, **28**, 2360-2364.
205. L. D. Williams, C. A. Frederick, G. Ughetto and A. Rich, *Nucleic Acids Res*, 1990, **18**, 5533-5541.
206. J. Stangret and R. Savoie, *Can J Chem-Rev Can Chim*, 1992, **70**, 2875-2883.
207. J. Krakowiak, J. Wawer and A. Panuszko, *J Chem Thermodyn*, 2013, **58**, 211-220.

13 Materiały uzupełniające

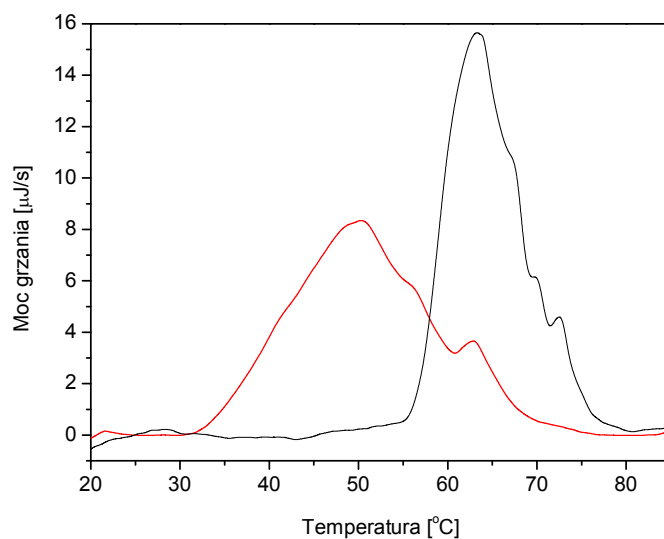
13.1 Dane kalorymetryczne DSC uzyskane dla układów DNA-woda-osmolit



Rysunek 54. Termogramy DSC bez normalizacji przedstawiające denaturację DNA w obecności osmolitów: A – glicyny, B – N-metyloglicyny, C – N,N-dimetyloglicyny, D – N,N,N-trimetyloglicyny. Numerami oznaczono wzrastające stężenie osmolitu. Linia czerwoną zaznaczony jest termogram denaturacji DNA w roztworze wodnym bez osmolitu.

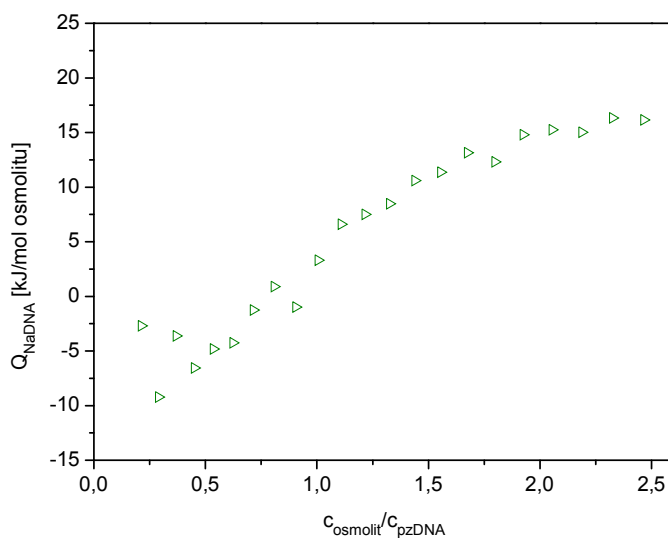


Rysunek 55. Termogramy DSC bez normalizacji przedstawiające denaturację DNA w obecności osmolitów: A – mocznika, B – N-metylomocznika, C – N,N'-dimetylomocznika, D – N,N,N',N'-tetrametylomocznika, E – N-etylomocznika, F – N,N'-dietylomocznika. Numerami oznaczono wzrastające stężenie osmolytu. Linia czerwoną zaznaczony jest termogram denaturacji DNA w roztworze wodnym bez osmolytu.



Rysunek 56. Termogram DSC bez normalizacji przedstawiające denaturację DNA w obecności spermidyny – linia czarna. Linia czerwoną zaznaczony jest termogram denaturacji DNA w roztworze wodnym bez osmolitu.

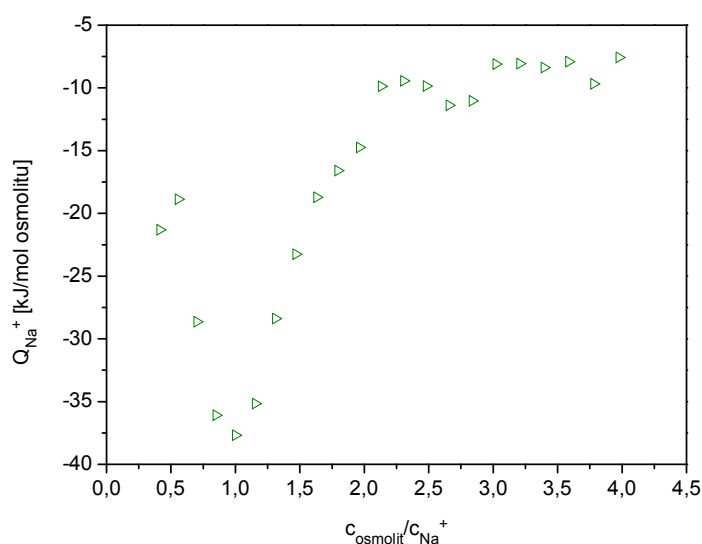
13.2 Dane kalorymetryczne ITC uzyskane dla układu DNA-woda-spermidyna



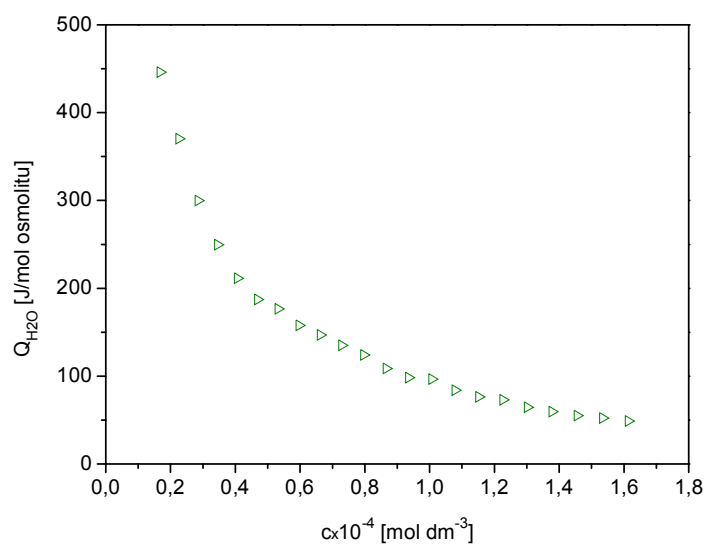
Rysunek 57. Zależność entalpii oddziaływania soli sodowej DNA ze spermidyną od stosunku molowego osmolitu i par zasad DNA w roztworze.

Przebieg zależności entalpii oddziaływania soli sodowej DNA ze spermidyną od stosunku molowego osmolitu i par zasad DNA w roztworze

(Rysunek 57) znacznie odbiega od tych obserwowanych dla glicyny, mocznika i ich pochodnych. Widać tutaj wyraźną zależność efektu od stężenia osmolitu. Przebieg zależności entalpii oddziaływania spermidyny z jonami sodowymi od ich stosunku molowego (Rysunek 58) jest złożony i wskazuje na zupełnie inny mechanizm oddziaływania badanego kationu z poliaminą. Prace mające na celu pogłębienie rozumienia zachowania się spermidyny w roztworach (z uwzględnieniem ustalających się równowag kwasowo – zasadowych) będą w Katedrze kontynuowane.



Rysunek 58. Zależność entalpii oddziaływania jonów sodowych ze spermidyną od stosunku molowego osmolitu i jonów sodowych w roztworze.



Rysunek 59. Zależność ciepła rozcieńczania roztworu spermidyny od liczby jej cząsteczek w roztworze.

13.3 Dane analizy chemometrycznej widm DNA zaburzonego obecnością osmolitów w roztworze

Tabela 16. Parametr $1/x_0$ oraz procentowa zawartość struktury zaburzonej DNA w obecności glicyny i jej metylowych pochodnych. Wartości podano dla wszystkich rozpatrywanych pasm DNA.

Osmolit c [mol dm ⁻³]	Pasma ctDNA					
	970 cm ⁻¹		1053/1086 cm ⁻¹		1222 cm ⁻¹	
	1/x ₀	%	1/x ₀	%	1/x ₀	%
1	2	3	4	5	6	7
Glicyna						
0,5	31,0	3,2	7,8	12,8	32,0	3,1
1,0	20,0	5,0	4,6	21,7	11,0	9,1
1,5	15,0	6,7	3,1	32,6	10,0	10,0
2,0	3,7	27,0	-	-	8,0	12,5
N-metyloglicyna						
0,5	25,0	4,0	63,0	1,6	47,0	2,1
1,0	12,0	8,3	31,0	3,2	34,0	2,9
1,5	8,0	12,5	22,0	4,5	23,0	4,3
2,0	5,5	18,2	17,0	5,9	18,0	5,6
2,5	4,6	21,7	14,0	7,1	11,0	9,1
3,0	3,6	27,8	12,0	8,3	8,5	11,8
3,5	3,1	32,3	12,0	8,3	6,5	15,4
4,0	2,6	38,5	9,0	11,1	4,8	20,8
4,5	2,3	43,5	7,0	14,3	3,8	26,3
5,0	2,1	47,6	3,5	28,6	3,7	27,0
5,5	1,6	62,5	-	-	2,5	40,0
N,N-dimetyloglicyna						
0,5	11,0	9,1	17,0	5,9	19,0	5,3
1,0	5,8	17,2	8,2	12,2	10,5	9,5
1,5	3,8	26,3	5,4	18,5	8,2	12,2
2,0	3,1	32,3	3,8	26,3	6,8	14,7
2,5	2,6	38,5	2,7	37,7	5,9	16,9
3,0	2,3	43,5	2,5	40,0	5,0	20,0
3,5	1,4	71,4	2,1	48,5	4,3	23,3

1	2	3	4	5	6	7
4,0	1,3	75,8	2,4	41,7	2,1	48,8
4,5	1,1	89,3	2,0	51,0	1,1	93,5
5,0	1,0	97,1	1,7	60,2	1,0	99,0
5,5	0,0	-	1,6	64,1	-	-
<i>N,N,N</i> -trimetyloglicyna						
0,5	13,2	7,6	44,0	2,3	11,0	9,1
1,0	7,0	14,3	24,0	4,2	4,5	22,2
1,5	3,6	27,8	18,0	5,6	3,5	28,6
2,0	3,1	32,3	13,0	7,7	2,4	41,7
2,5	2,8	35,7	12,0	8,3	1,3	76,9
3,0	2,0	51,3	11,0	9,1	1,3	80,0
3,5	2,0	51,3	8,0	12,5	1,3	80,0

Tabela 17. Parametr $1/x_0$ oraz procentowa zawartość struktury zaburzonej DNA w obecności mocznika i jego alkilowych pochodnych. Wartości podano dla wszystkich rozpatrywanych pasm DNA.

Osmolit c [mol dm ⁻³]	Pasma ctDNA					
	970 cm ⁻¹		1053/1086 cm ⁻¹		1222 cm ⁻¹	
	1/x ₀	%	1/x ₀	%	1/x ₀	%
1	2	3	4	5	6	7
Mocznik						
0,5	33,5	3,0	24,5	4,1	38,0	2,6
1,0	17,5	5,7	13,5	7,4	22,0	4,5
1,5	11,5	8,7	9,5	10,5	15,0	6,7
2,0	11,5	8,7	8,5	11,8	12,5	8,0
2,5	9,0	11,1	7,5	13,3	11,5	8,7
3,0	4,5	22,2	4,5	22,2	11,5	8,7
3,5	4,0	25,0	4,5	22,2	11,5	8,7
4,0	4,0	25,0	3,5	28,6	12,5	8,0
4,5	4,0	25,0	3,5	28,6	11,5	8,7
5,0	4,0	25,0	3,5	28,6	10,5	9,5
5,5	3,5	28,6	3,0	33,3	9,0	11,1
6,0	4,0	25,0	4,5	22,2	8,0	12,5

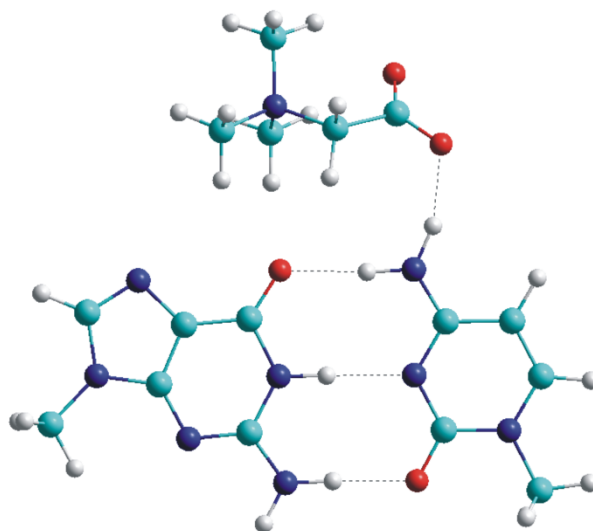
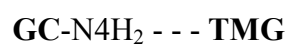
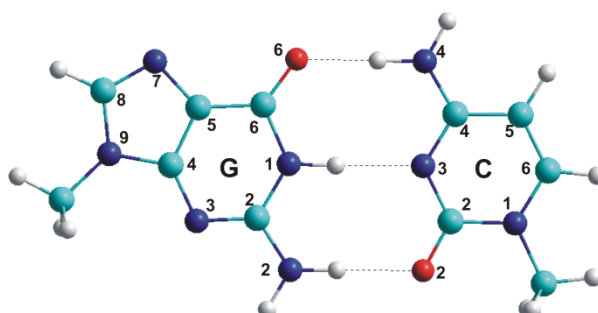
1	2	3	4	5	6	7
6,5	2,5	40,0	3,5	28,6	7,5	13,3
7,0	2,5	40,0	3,5	28,6	6,5	15,4
N-metylomocznik						
0,5	12,0	8,3	14,5	6,9	7,5	13,3
1,0	6,0	16,7	7,0	14,3	4,0	25,0
1,5	5,5	18,2	5,0	20,0	3,0	33,3
2,0	3,5	28,6	3,5	28,6	2,6	38,5
2,5	2,5	40,0	3,0	33,3	2,2	45,5
3,0	2,0	50,0	2,5	40,0	2,2	45,5
3,5	1,5	66,7	2,0	50,0	2,2	45,5
4,0	1,8	55,6	2,0	50,0	1,8	55,6
4,5	1,8	55,6	2,0	50,0	1,4	71,4
5,0	1,8	55,6	2,0	50,0	1,4	71,4
5,5	1,6	62,5	2,0	50,0	1,6	62,5
6,0	1,6	62,5	2,0	50,0	1,4	71,4
6,5	1,6	62,5	2,5	40,0	-	-
7,0	1,6	62,5	3,0	33,3	-	-
N,N'-dimetylomocznik						
0,5	31,0	3,2	13,5	7,4	5,5	18,2
1,0	14,0	7,1	7,0	14,3	2,8	35,7
1,5	8,0	12,5	5,0	20,0	2,0	50,0
2,0	7,5	13,3	4,5	22,2	2,1	47,6
2,5	5,5	18,2	4,0	25,0	2,0	50,0
3,0	5,4	18,5	2,6	38,5	2,3	43,5
3,5	4,6	21,7	2,8	35,7	1,6	62,5
4,0	3,4	29,4	1,6	62,5	-	-
4,5	3,0	33,3	1,8	55,6	-	-
5,0	3,0	33,3	2,2	45,5	-	-
5,5	2,2	45,5	-	-	-	-

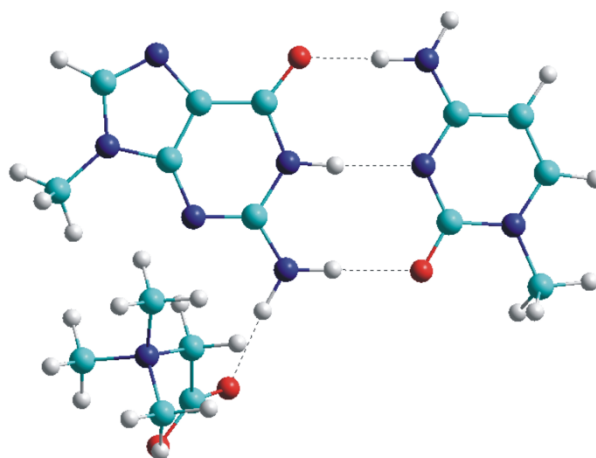
Tabela 17. Ciąg dalszy

1	2	3	4	5	6	7
<i>N,N,N',N'</i>-tetrametylomocznik						
0,5	20,5	4,9	7,5	13,3	2,3	43,5
1,0	10,5	9,5	4,9	20,4	1,5	66,7
1,5	7,5	13,3	3,4	29,4	1,4	71,4
2,0	4,6	21,7	2,8	35,7	1,0	100,0
2,5	2,0	50,0	2,0	50,0	-	-
3,0	-	-	1,5	66,7	-	-
<i>N</i>-etylomocznik						
0,2	14,0	7,1	15	6,7	10,5	9,5
0,4	9,5	10,5	8,0	12,5	5,5	18,2
0,6	6,0	16,7	6,0	16,7	4,6	21,7
0,8	4,0	25,0	6,0	16,7	4,2	23,8
1,0	3,2	31,3	4,8	20,8	3,6	27,8
1,2	-	-	4,6	21,7	3,0	33,3
1,4	-	-	2,4	41,7	2,2	45,4
<i>N,N'</i>-dietylomocznik						
0,2	7,5	13,3	10,5	9,5	6,0	16,7
0,4	6,0	16,7	5,5	18,2	3,6	27,8
0,6	3,8	26,3	3,5	28,6	3,4	29,4
0,8	3,8	26,3	3,4	29,4	2,8	35,7
1,0	4,6	21,7	1,6	62,5	2,0	50,0
1,2	3,6	27,8	1,6	62,5	-	-
1,4	2,4	41,7	-	-	-	-

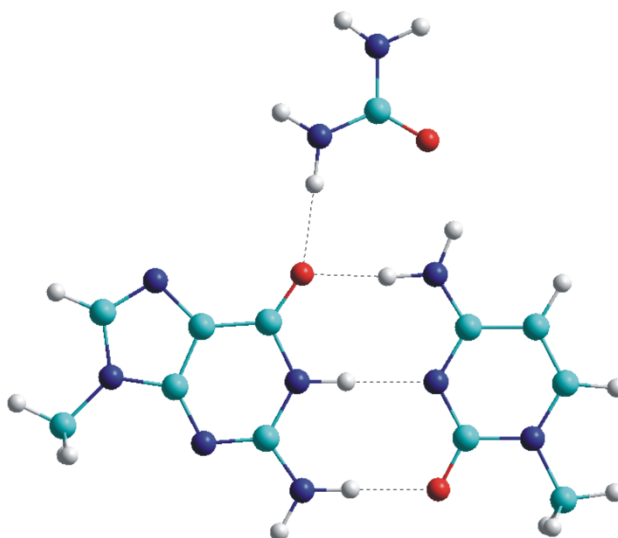
13.4 Zoptymalizowane struktury par zasad DNA w obecności wody i osmolitów

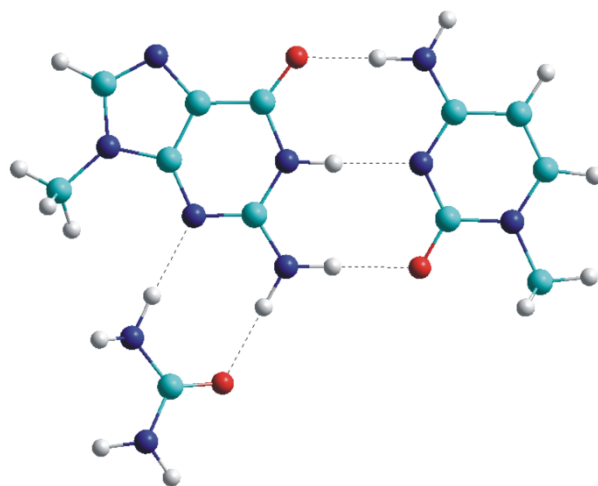
Rysunek 60. Zoptymalizowane struktury par zasad: guaniny i cytozyny oraz struktury GC zaburzone przez *N,N,N*-trimetyloglicynę i mocznik. Kolorem niebieskim zaznaczone są atomy węgla, granatowym – azot, białym – wodór, czerwonym – tlen.



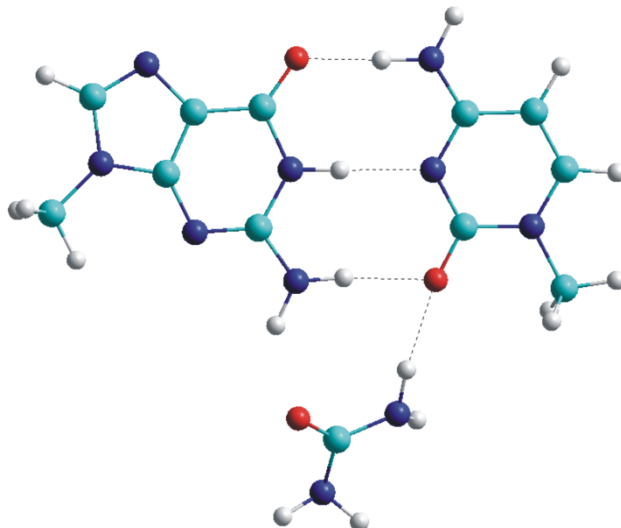
CG-N2H₂ - - - TMG

CG-C6=O6 - - - mocznik

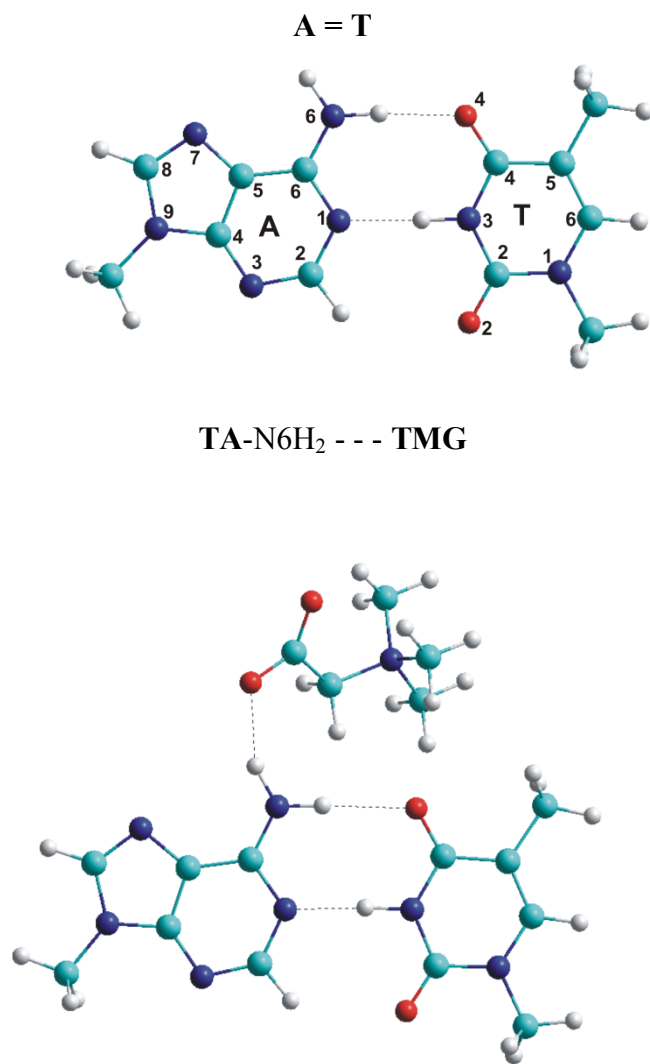


CG-N2H₂ - - - mocznik

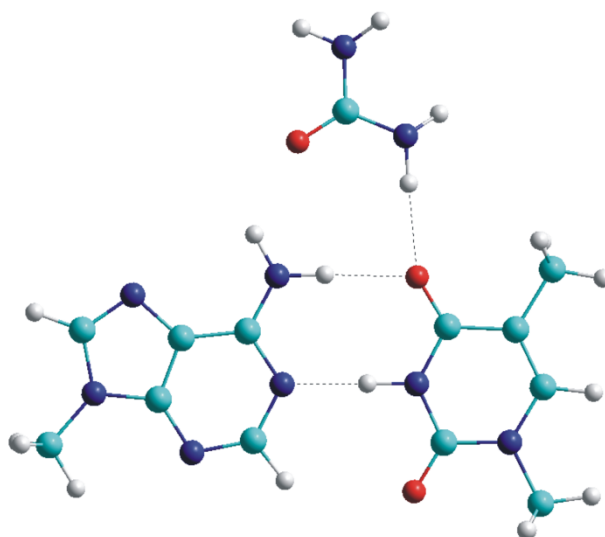
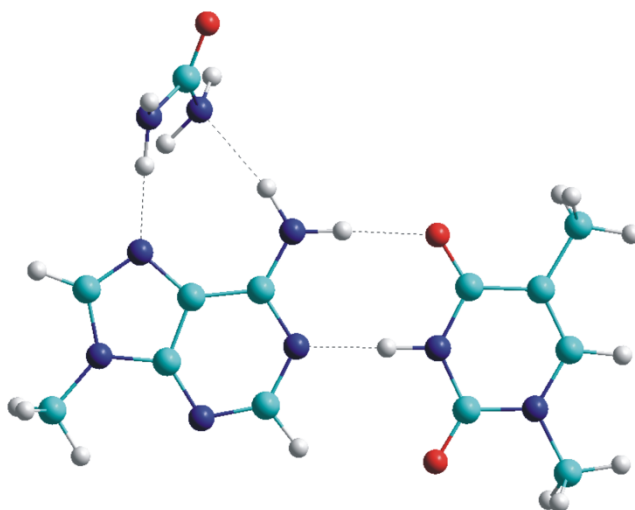
GC-C2=O2 - - - mocznik



Rysunek 61. Zoptymalizowane struktury par zasad: adeniny i tyminy oraz struktury AT zaburzone przez N,N,N-trimetyloglicynę i mocznik. Kolorem niebieskim zaznaczone są atomy węgla, granatowym – azot, białym – wodór, czerwonym – tlen.

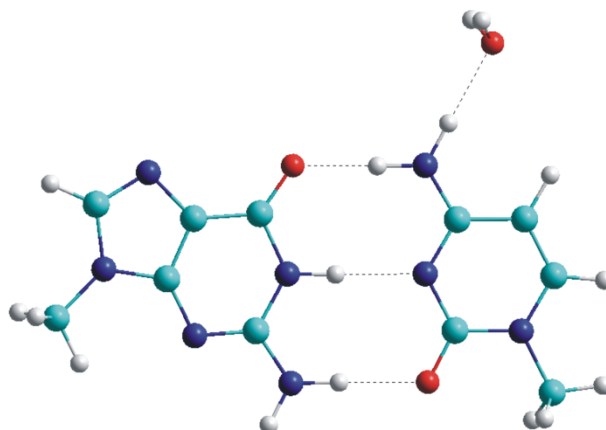


AT-C4=O4 - - - mocznik

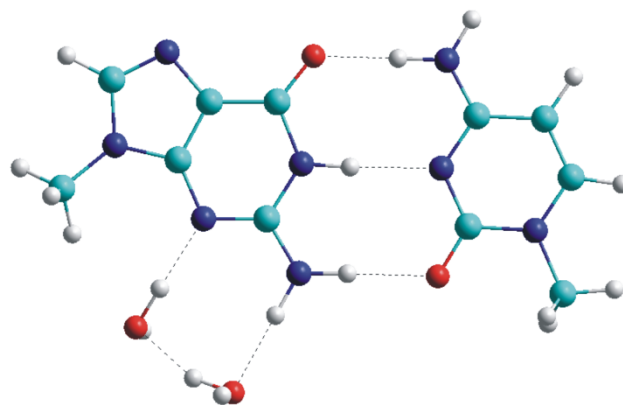
TA-N6H₂ - - - mocznik

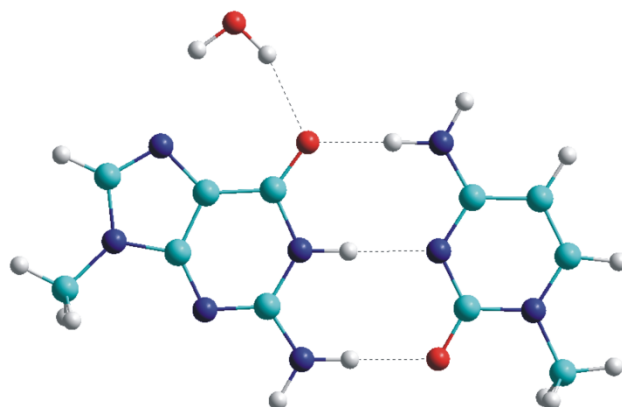
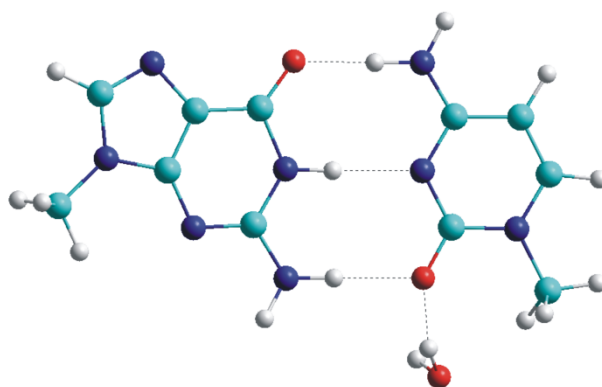
Rysunek 62. Zoptymalizowane struktury par zasad GC zaburzone przez cząsteczki wody. Kolorem niebieskim zaznaczone są atomy węgla, granatowym – azot, białym – wodór, czerwonym – tlen.

GC-N4H₂ - - - H₂O



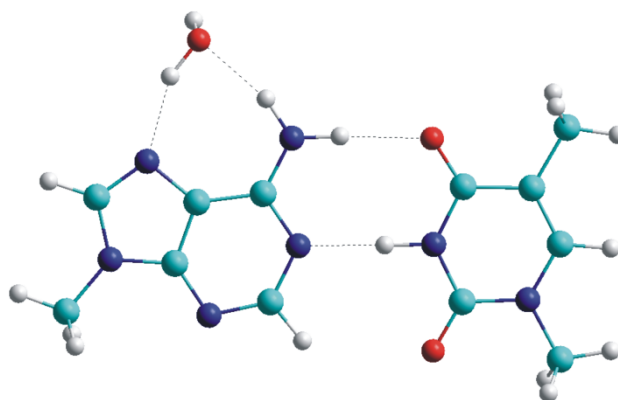
CG-N2H₂ - - - H₂O



CG-C6=O6 - - - H₂OGC-C2=O2 - - - H₂O

Rysunek 63. Zoptimalizowane struktury par zasad AT zaburzone przez cząsteczki wody. Kolorem niebieskim zaznaczone są atomy węgla, granatowym – azot, białym – wodór, czerwonym – tlen.

TA-N6H₂ - - - H₂O



AT-C4=O4 - - - H₂O

