



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

IV. IKERGAZTE NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2021eko ekainaren 9, 10 eta 11a
Gasteiz, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

ZIENTZIAK ETA NATURA ZIENTZIAK

**Molekulen elkarrekintzen eragina
materia makroskopikoaren
antolaketan: Teobromina
molekularen nukleazioaren bidez**

*Imanol Usabiaga, Mainer Parra,
Ander Camiruaga, Iker Lamas
eta Antonio Veloso*

235-240 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.iv.05.31>



Molekulen elkarrekintzen eragina materia makroskopikoaren antolaketan: teobromina molekularen nukleazioaren bidez

Usabiaga Gutierrez, I.^{1,2}, Parra Santamaria, M.^{1,2}, Camiruaga Leza, A.¹, Lamas Frejo, I.¹ eta Veloso Fernández, A.¹

¹*Kimika Fisikoa Saila, Zientzia eta Teknologia Fakultatea UPV/EHU, Sarriena auzoa z/g, 48940, Leioa*

²*Biofisika Institutua (UPV/EHU, CSIC) Sarriena auzoa z/g, 48940, Leioa
i.usabiaga@outlook.es, maider.parra@ehu.eus*

Laburpena

Elkarrekintza intra- zein inter-molekularren ondoriozko molekulen antolaketa ikertzea ezinbestekoa da molekulen propietateak ulertu ahal izateko. Erronka hau gainditzeko beharrezkoa den zehaztasuna egoera-isolatutako ikasketekin lor daiteke. Kasu honetan, azido desoxirribonukleiko eta azido erribonukleikorekin elkarrekintzak eratzeko ahalmena duen teobrominaren nukleazioa aztertu da. Horretarako, Ioi-Despopulazioko Infragorri Espektroskopia Erresonante (Resonant Ion Dip Infrared Spectroscopy) motako laser-espektroskopia eta espantsio supersonikoaren arteko konbinazioa erabili da. Lortutako infragorri-espektroak, kalkulu konputazionalen emaitzak eta datu kristalografikoak konparatuz, teobromina-molekulek bikote edo hirukoteetan duten antolatze modua *sandwich* egiturari dagokiola zehaztu da.

Hitz gakoak: teobromina, xantina, gas-faseko espektroskopia, laser-espektroskopia.

Abstract

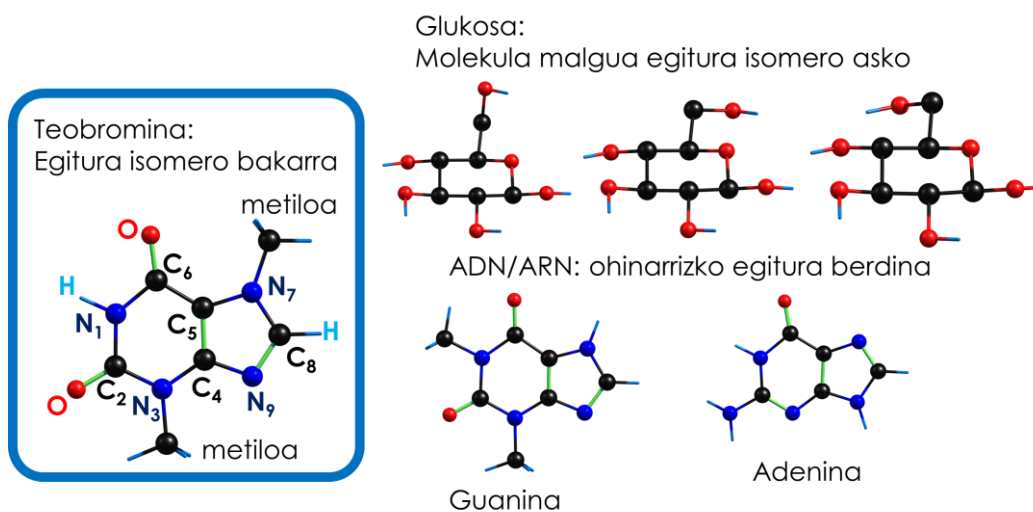
The organization of molecules resulting from intra- and intermolecular interactions is crucial in understanding the properties of molecules. The accuracy required to overcome this challenge is available in isolated studies. In this case, the nucleation of theobromine has been investigated due to its ability to form interactions with DNA and ARN. For this purpose, a combination between RIDIRS (Resonant Ion Dip Infrared Spectroscopy) laser spectroscopy and supersonic expansion has been used. The comparison among the obtained infrared spectra, computational calculations, and crystallographic data has determined that the sandwich structure is the one that theobromine molecules preferentially adopt when it comes to organize into pairs or triplets.

Keywords: xantine, gas-phase spectroscopy, laser-spectroscopy.

1. Sarrera eta motibazioa

Materiak makroskopikoki ikus eta neur daitezkeen orotariko propietateak aurkezten ditu. Azken hauek, materia berezi bihurtzen dute. Berezitasun hori aprobetxatuz, molekulen antolaketa aldatu eta materiak erakusten dituen propietate makroskopikoak guztiz eralda daitezke. Molekulak haien artean elkar eragiten dutenean modu desberdinetan antola daitezke. Biologia mailari dagokionez, bizitzarako ezinbestekoak diren erreakzio espezifikoak sustatzen dituzte. Materia ez-biziaren kasuan, elkarrekintzek egitura simetriko eta perfektuetan antolatzea eragin dezakete, kristalak osatuz adibidez. Ikerketa hau, indar hauen zergatia ulertzearen helburuarekin proposatzen da. Horretarako, **teobrominaren** nukleazioa aukeratu da eredu gisa honen egitura zurruna dela eta. Horren ondorioz, molekula honek ez du egitura-isomerorik izango eta honek asko sinplifikatzen du honi buruzko ikerketa (ikus 1. irudia). Teobromina xantinen familiakoa da, zeinak base purikoen oinarriko egitura kimikoa konpartitzen duten. Hauen egitura dela eta, hainbat elkarrekintza era dezakete Azido Desoxirribonukleiko (ADN) eta Azido Erribonukleiko (ARN) molekulekin, bestelako eragin farmakologikoak aurkeztuz. (Nemčková et al., 2018; Zimmermann et al., 1997) Teobrominak amina talde guztiak metilo taldeez ordezkaturatu ditu eta berezitasun hau oso interesgarria da elkarrekintzen ikerketarako, molekula bikotez osatutako konplexuen kopurua murrizten duelako oso lotura gune garrantzitsua izatearen ondorioz.

1. irudia. Eskumaldean Teobromina molekularen egitura adierazi da. Ezkerraldean hurrengoa adierazi da: goiko aldean glukosa molekula malguaren egitura-isomeroen multzo bat adierazi da adibide bezala eta azpian, ADN/ARN baseen egitura, zeintzuk guanina eta adeninazko oinarrizko purina-hezurdura duten.



Teobrominazko kristalak sortzeko sublimazioa erabiltzen da eta hauen egitura datu-base kristalografikoetan eskuragai dago. Kristal-egituratik hasita oinarrizko molekularen bikote eta hirukoterik egonkorrenak isola daitezke datu-base eta kalkulu teorikoetan oinarritutako ereduak jarraituz. Lehen urratsa, kristala sortzeko jarraitu beharreko pausuak erabakitzea izango da, aipatutako bikote eta hirukote egonkorretan oinarrituz. Hurrengo urratsa, konplexu hauek esperimentalki eratzean datza; hain zuzen, gas fasean isolatutako molekulen bikote eta hirukoteak lortzea izango da helburua. Horretarako, masan bereizgarria den laser-espektroskopia erabiliko dugu teobrominaren eta gas garraiatzaile baten espantsio supersonikoaren ikerketa egiteko. Teknika berezi honi buruzko zehetasunak jadanik argitaratuak izan dira (Usabiaga et al., 2016; Levy, 1980) eta honi buruzko ideia esanguratsuenak atal esperimentalean aurkeztuko dira. Teknika esperimental honek, tenperatura jaitsiera azkarren ondorioz gas fasean dauden molekulak isolatzen ditu bakarka, bikotea, hirukotea ... Horri esker, kristalaren datu-basetatik eta kalkulu teorikoetatik lortutako bikote eta hirukoteekin alderaketak burutzea posible da.

2. Arloko goera eta ikerketaren helburuak

Lan honen helburua teobromina molekularen nukleazioaren lehen urratsak metodo espektroskopikoen bitartez karakterizatzea da, ondoren bere kristal egiturarekin konparatzeko. Horretarako, erabilitako metodologia esperimental eta teorikoari buruzko eztabaida burutuko da. Azkenik, teobrominaren egitura kristalografikoaren deskonposaketa oinarrizko egituratan egingo da, lortutako emaitzekin konparatzeko.

2.1. Masan bereizgarria den laser espektroskopiaren funtsak

Elkarrekintza intermolekular ahulak aztertzeko metodori egokiena espantsio supersonikoen bitartez lortutako isolamendu molekularra da; hain zuzen, gas faseko eta espantsio supersonikoaren arteko konbinazioan oinarritutako metodo esperimental. Espantsio supersonikoa gas garraiatzaile bat (gas noblea oro har) presio altuagoko ganbaratik hutsean aurkitzen den beste ganbara batera zirrikitu txiki batetik hedatzearen ondorioz sortzen da. Espantsioaren hasieran ematen diren energia altuko talken ondorioz, molekulen barne-energia abiadura modura transferitzen da, bere energia-mailak murriztuz edo "izoztuz" (maila elektronikoak, maila bibrazionalak, maila errotazionalak). Espantsioaren hasieran ematen diren talken ondorioz, monomeroak ez ezik, bi molekulen arteko konplexuak era daitezke; adibidez, dimeroak. Molekulen artean sortutako elkarrekintzen ondorioz osatuak. Espantsioan zehar molekulak edota konplexuak norabide berean garraiatzen dira haien arteko

talkarik gabe. Horren ondorioz, ingurumen isolatua osatzen da eta horrek, molekularen propietate intrintsekoak aztertzea baimentzen du.

Molekulak eta konplexuak isolatzeko metodo hau bestelako teknika esperimentalekin konbinatu daiteke. (Lubman eta Kronick, 1982) Gure kasuan, laser-espektroskopia molekularrean oinarritutako teknika masa espektrometro batekin konbinatuz, molekula edota edozein tamainako konplexuen egiturari buruzko informazioa eskura dezakegu (Hollas, 2004).

Erresonantzia bikoitzeko ioi-despopulazioko infragorri espektroskopia (RIDIRS), molekulen arteko bazterketa burutzeko gai den teknika da, konplexuen bibrazio-frekuentziak erabilita. Teknika honetan, bi laser iturri desberdin erabiltzen dira. Lehenik, espantsio supersonikoan zehar aurkitzen diren molekulak infragorriko laserrarekin aztertzen dira. Ondoren, ultramoreko laserrak aipatutako molekulak kitzikatzen ditu euren ioiak eskuratzeko asmoz. Azken hauek, Hegaldi-denborako Masa-espektrometria (Time-of-light mass spectrometry, TOF) motako masa espektrometrora eraman eta masaren araberako bereizketa burutzen da. Azkenik, sortutako ioi-kopuruaren araberako seinale elektrikoa sortzen da detektorean. Aztertutako molekulek infragorrian bibrazioren bat aurkeztean (IR-laserraren uhin-luzera konkretu batean), sortutako ioi-kopurua aldatuko da, eta ondorioz, baita neurtutako seinalea ere. Beraz, seinalearen aldaketak neurtuz, gure molekularen edota konplexuaren IR-espektra lortzen da, zein kalkulu teorikoekin aldera daitekeen egitura-zehaztapena burutzeko.

2.2. Kalkulu teorikoen funtsak

Molekula isolatuen propietateak esperimentalki neurtu ahal izateak, emaitza esperimentalak mekanika kuantikoko kalkulu teorikoen bitartez lortutako emaitzekin konparatzea baimentzen du. Horretarako jarraitu beharreko prozedura 2. irudian agertzen da eta hiru etapa nagusitan banatzen da: (i) mekanika klasikoan oinarritutako egiturak bilatzen dira (existitzeko probabilitate gehien dutenak hain zuzen ere); (ii) aurreko pausuan aurkitu diren egiturak zehatzago kalkulatu dira mekanika kuantikoko legeak erabiliz; (iii) molekularen egitura ondo kalkulatu gero, bere espekto teorikoa aurrean daiteke, ondoren esperimentuaren bidez lortutakoarekin konparatzeko. Modu honetan, espantsio supersonikoan lortutako datu esperimentalak, informazio konputazionalarekin alderatzeko eta euren arteko koherentzia determinatzeko erabili ez ezik, atal teorikoaren egokitasuna probatzeko baliogarriak dira.

2. irudia. Molekulen egiturak egiaztatzeke erabiltzen den prozedura.



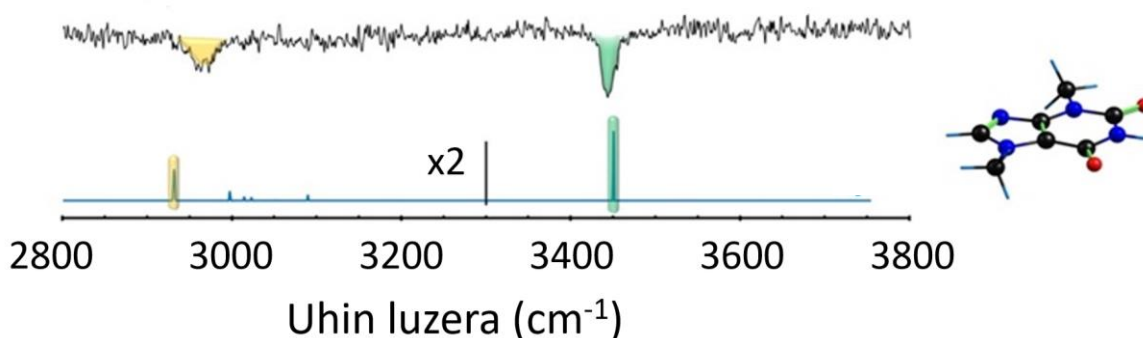
3. Ikerketaren muina

Atal honetan aurretik aipatutako metodologia jarraituz lortu diren emaitzen analisia azalduko da.

3.1. Teobrominaren egitura-zehaztapena

Aurretik aipatu den moduan, kalkulu teorikoen eta emaitza esperimentalen arteko alderaketaren ondorioz, molekula baten elkarrekintzen eta egituraren berri izan ahal dugu. Hau ulertzeko adibide bat, lan honetan ikertu dugun teobrominaren monomeroaren esleipena da. Molekula honen RIDIRS espektroa aspaldi neurtu zuten, (M.P. Callahan et al., 2008) zein gure ikerkuntzan lortutakoarekin bat datorren (3.irudia). Egindako molekulari buruzko kalkulu kuantikoei esker, honen bibrazio-frekuentzia teorikoak ezagunak izaten dira, zeinak espektro esperimentalarekin alderatzen diren egitura-zehaztapena burutu ahal izateko. 3. irudian antzeman daitekeen moduan, teobrominaren NH eta CH atomo-taldean absortzioak aurkezten dira, esperimentuan isolatutako molekula/konplexua esleitzuz.

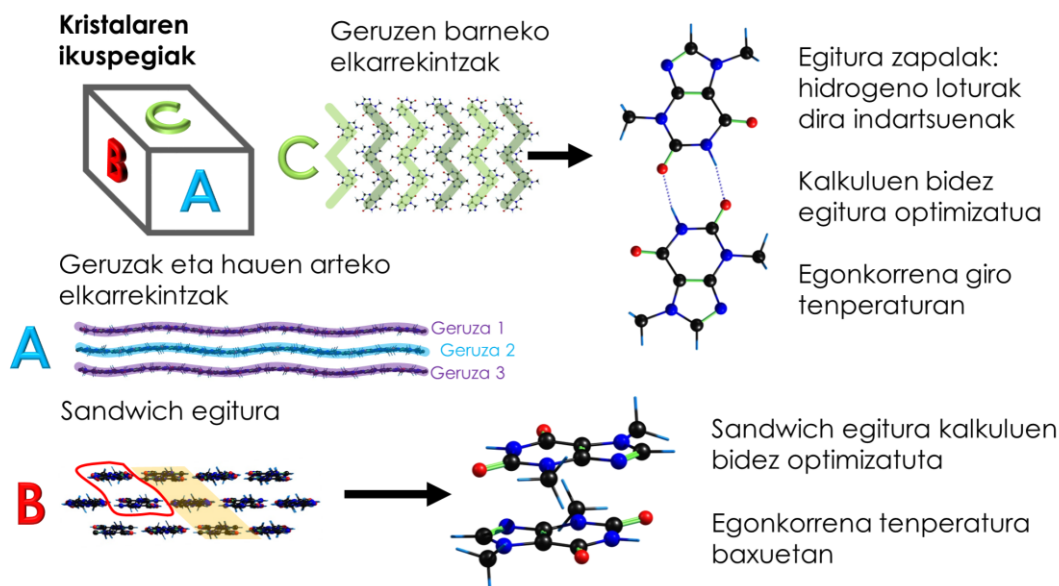
3. irudia. Molekulen egiturak egiaztatzeko erabiltzen den prozedura. Goialdean, espektro esperimentalak eta behealdean, espektro teorikoa adierazi dira. Eskuman, esleitutako egitura adierazi da.



3.2. Kristal-egituraren deskonposaketa oinarritzko egituratan

Teobromina kristal-egituraren ikerketarako, molekula elkarrekintzekin zerikusia duen deskonposaketa egitea beharrezkoa da egitura osoan zehar dauden patroirik esanguratsuenak identifikatzuz. 4. irudia aztertuz gero, egitura osoa nola geruzatan antolatuta dagoen ikus daiteke. Geruzen arteko molekulek *sandwich* batean dauden ogi-xerrak bezala pilatzen dira euren artean. “A” analogia jarraituz, ogi-xerren artean elkarrekintza intermolekularrak egongo liriateke. Hau ikusita, geruzen artean sandwich eran dauden molekula bikoteak hartu eta kalkulu mekano-kuantikoen bidez egitura horiek optimizatuko ditugu gero bere egonkortasuna kudeatzeko

.4. irudia. Teobrominaren kristalaren deskonposaketa bere jatorrizko molekula bikoteetan



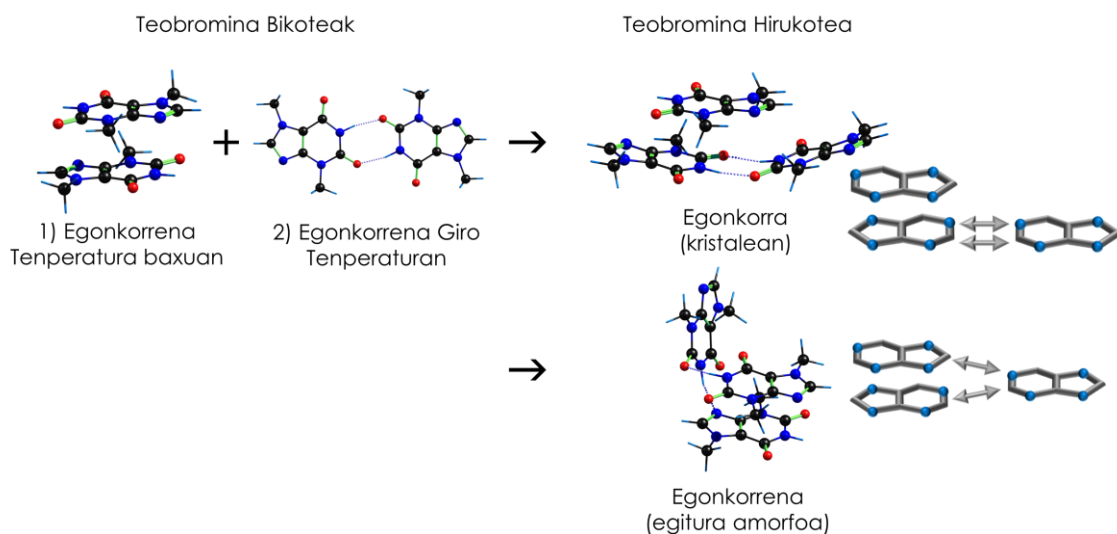
Kristalaren beste ikuspegi bat hartuta, geruza baten barruan dauden elkarrekintzak hainbat bikoteetan deskonposa ditzakegu. Hala ere, bikote bakarra erakutsiko du besteak baino egonkortasun handiagoa. Bikote honen berezitasuna bi hidrogeno-lotura indartsu aurkezten dituela da. Aipatutako elkarrekintzaren indarra kalkuluen bidez argi geratu da optimizatutako egitura kristaletik hartutakoaren ia berdina dela ikustean.

Sandwich eta egitura zapalaren emaitzak alderatzean, egituraz gain, desberdintasun nabari gehiago daude. Sandwich egiturei dagokionez, badaude antzeko egonkortasuna eta kristalean ikusitako atalen antza duten egitura gehiago. Gainera, sandwich osagaien egituraren optimizazio teorikoa egitean aldaketa nabarmena antzematen dela ondoriozta daiteke hasierako bikotearen egitura eta kalkulu teorikoekin lortutakoa konparatuz. Izan ere, temperatura baxuetan sandwich egiturak egonkorrenak dira orokorrean; aldiz, kalkulua giro-temperaturan egitean, egitura zapala bihurtzen da egonkorrena.

Bikoteen kasuan, esperimentalki determinatutako egiturak sandwich egiturazkoak direla ondorioztatu da; hau da, temperatura baxuetan egonkorrenak direnak. Espantsio supersonikoa hozteko prozesu bortitzaren ondorioa izan daiteke. Halaber, bestelako xantina bikoteetan aurkitutako elkarrekintza nagusienak hidrogeno-loturak izan dira. Kasu honetan, teobromina-bikoteen pilatzeko joera esperimentalki determinatu dugu ere. Gainera, sandwich egitura duten bikote isoenergetikoak daudenez badirudi teobromina molekulek bata bestearen gainean irristatzeko gaitasuna dutela.

Hirukoteei dagokionez, kristaletik optimizatutako egiturak eta kalkuluen bidez lortutakoak ikusita, egitura asko lortu direla esan daiteke. Baina guztietatik interesgarrienak eta egonkorrenak (temperatura baxuan zein altuan), bi bikoteen konbinaketaren ondorioz lortutakoak dira (5. irudia). Hau ikusita, horren eraketa sandwich egiturari teobromina molekula bat gehitzean sortzen dela esan daiteke, bi jatorri desberdin edukita. Esperimentalki ikusitako bikotea sandwich egitura aurkezten duenez, bide honek gertatzeko probabilitate handiena duena dela ondoriozta genezake. Nahiz eta hirukotearen neurketa esperimentalean mota honetako hirukoteak sortzen direla konfirmatu, emaitzek eratu ahal den hirukote mota bakarra ez dela adierazten dute. Izan ere, sandwich egiturazko bi molekulen arteko elkarrekintzak ezartzen dituzten egiturak aurkitzea posiblea da, zeintzuk kristalarenekin batera, egonkorrenak diren. Esperimentuaren ondoriozko hozte prozesu bortitzak, egitura guztiak sortzea eragiten du eta behin sortuak, ezin dira eraldatu. Horren ondorioz, solido amorfo bat lortzen dugu. Kristalean ostera hotz prozesuan eraldaketak gertatzen dira eta hauek zenbait elkarrekintzen moldaketak dakarte egitura makroskopiko ordenatua lortzeko.

5. irudia. Teobrominaren bikote eta hirukoteen egitura. Behealdean, kristala sortzeko bide posible bat adierazi da solido amorfoaren formazioarekin alderatuta.



4. Ondorioak

Lan honetan interes farmakologikoa aurkezten duen teobromina molekularen nukleazio-prozesuan parte hartzen duten elkarrekintzen garrantzia ikertu da. Horretarako, masan bereizgarria den laser espektroskopia erabili da espantsio supersonikoarekin konbinatuz. Aipatutako teknika kalkulu konputazionalekin eta iragarpen teorikoekin konbinatuz gero, bikoteen kasuan lortutako egiturarik egonkorrenak sandwich erakoak direla ondorioztatu da. Gainera, bikote isoenergetikoen presentziak teobromina molekularak bata bestearen gainean irristatzeko gaitasuna izan dezaketela erakusten du. Hirukoteei dagokionez, antzeko joera dagoela ondorioztatu da. Izan ere, hirukotea osatzen duten molekulen artean, haietako bi sandwich egitura moduan antolatzen direla eta hirugarrena bi hidrogeno loturaz haiei lotuta mantentzen dela ondorioztatu da. Bestetik, lortutako emaitzak fase isolatuan datu kristalografikoek aurkezten dituztenekin konektatuta daudela ikusi da. Azkenik, hau guztia kontuan hartuz, laser-espektroskopia eta espantsio supersonikoaren konbinaketa biomolekulen propietate intrintsekoen jatorria eta egitura zehatza determinatzeko teknikarik aproposenetarikoa dela azpimarra daiteke.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Lan honetan, teobrominaren nukleazioari buruzko ikerketaren hasierako pausuak baino ez dira landu. Beraz, hemendik abiatuta hainbat erronka planteatu daitezke. Izan ere, teobrominaren *kluster* ugari esperimentalki determinatzeko gai izan arren, emaitza esperimentalak ulertzeko beharrezkoak diren kalkulu konputazionalen kopurua izugarri handia da, horrek kostu ekonomiko handia suposatuz. Hala ere, erronka hau gaindituz joanez, etorkizuneko ikerketaren helburua teobrominaren nukleazio-prozesua fase isolatuan ikasten jarraitzea da bertan parte hartzen duten egitura guztien zehaztapen zehatza eta osoa eman ahal izateko, datu kristalografikoak oinarri gisa edukiz.

6. Erreferentziak

- Callahan et al. (2008): “Non-standard base pairing and stacked structures in methyl xanthine clusters”, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 10, 2819-2826.
- Hollas (2004): *Modern Spectroscopy*, 4th Edition, John Wiley & Sons Ltd, West Sussex, England
- Levy, D. H. (1980): “Laser Spectroscopy of Cold Gas-Phase Molecules”, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 31, 197–225.
- Lubman eta Kronick (1982): “Mass spectrometry of aromatic molecules with resonance-enhanced multiphoton ionization”, *Anal. Chem.*, 54, 5, 660-665.
- Nemčková et al. (2018): “Interaction of DNA and mononucleotides with theophylline investigated using electrochemical biosensors and biosensing”, *Bioelectrochem.*, 123, 182-189.
- Usabiaga et al. (2016): “Modeling the tyrosine-sugar interactions in supersonic expansions: glucopyranose-phenol clusters”, *Phys.Chem.Chem.Phys.*, 18, 12457.
- Zimmermann et al. (1997): “Interlocking structural motifs mediate molecular discrimination by a theophylline-binding RNA”, *Nat.*, 4, 644-649.

7. Eskerrak eta oharrak

Ander Camiruaga, Iker Lamas eta Maider Parrak eskerrak ematen dizkiogu Eusko Jaurlaritzari eta UPV/EHU-ari, doktorego tesia egiteko emandako laguntza ekonomikoagatik. Imanol Usabiagak Euskal Herriko Unibertsitateak emandako doktore-osteko laguntza ekonomikoagatik. Azkenik, SGIKER (UPV/EHU) konputazio eta laser zerbitzuaren laguntza eskertzen dugu.