

Warszawa, 16.11.2015r.

mgr Anna Maria Rybicka
Pracownia Oddziaływań Międzymolekularnych,
Zakład Chemii Fizycznej,
Wydział Chemii Uniwersytetu Warszawskiego

AUTOREFERAT ROZPRAWY DOKTORSKIEJ PT.

„Wpływ otoczenia molekularnego na elektronowe widma chiralooptyczne”

Tytuł w języku angielskim: “The influence of the molecular environment on the electronic chiroptical spectra ”

Promotor:

dr hab. Magdalena Pecul-Kudelska, prof. UW

Ze względu na powszechną obecność cząsteczek chiralnych w organizmach żywych szeroko rozumiana aktywność optyczna jest jednym z najważniejszych tematów badawczych w spektroskopii, o znaczeniu zarówno w dziedzinie chemii, jak i biochemii. Różnorodne aspekty chiralności i ich związek ze strukturą elektronową cząsteczek przejawiają się w wielu efektach optycznych związanych z załamaniem, rozproszeniem, absorpcją i emisją światła. Techniki oparte na tych zjawiskach pozwalają rozróżnić enancjomery, a często także konformery danego związku. Pomiar skręcalności optycznej czy widm elektronowego dichroizmu kołowego są procedurami powszechnie stosowanymi w ustalaniu konfiguracji absolutnej związków. Jednak dopiero przeprowadzenie obliczeń teoretycznych i porównanie ich z eksperymentem pozwala na jednoznaczne określenie konfiguracji związku chemicznego. Ze względu na bezpośredni wpływ ułożenia atomów w badanej cząsteczce na przebieg widma, spektroskopia chiralooptyczna znalazła szerokie zastosowanie w analizie strukturalnej zarówno małych cząsteczek (np. badania konformacji), jak i dużych układów biologicznych (np. badanie struktury II-go i III-cio rzędowej białek). [1]

Celem badań przeprowadzonych w ramach mojej pracy doktorskiej było pogłębienie wiedzy na temat modelowania wpływu otoczenia molekularnego na właściwości chiralooptyczne. Osiągnęłam to poprzez przeprowadzenie szeregu symulacji komputerowych, których wyniki zostały porównane z dostępnymi danymi eksperymentalnymi. Badania własne składają się z trzech części, a w każdej

z nich badałam parametry chiralooptyczne chromoforów o oznaczeniu biologicznym. W pracy doktorskiej skupiłam się na opisie elektronowych zjawisk chiralooptycznych, tj.: skręcalności optycznej (ang. *optical rotation*, OR), dyspersji skręcalności optycznej (ang. *optical rotatory dispersion*, ORD), elektronowego dichroizmu kołowego (ang. *electronic circular dichroism*, ECD lub CD) i luminescencji spolaryzowanej kołowo (ang. *circularly polarized luminescence*, CPL).

We wszystkich opisanych projektach modelowałam wpływ otoczenia na właściwości badanych cząsteczek. Oprócz badania zależności strukturalnych sprawdziłam przydatność różnych parametrów charakteryzujących środowisko i różnych metod modelowania otoczenia. Schematy obliczeniowe użyte w pracy obejmują: model ośrodka ciągłego (PCM), dynamikę molekularną (MD), model polaryzowalnego osadzenia (PE-QM/MM) oraz mikrosolvatację lub opisywanie najbliższego otoczenia badanej cząsteczki na tym samym poziomie teorii co chromoforu (QM/QM).

Symulacje porównujące różne modele kwantowo-chemiczne (w tym PCM, mikrosolvatację i MD) do badania wpływu solwatacji i konformacji na właściwości OR, ORD i CD przeprowadziłam na przykładzie prostych chiralnych związków organicznych: (*R*)-(+)-2-hydroksypropanoamidu i (*S*)-(+)-2-aminopropanolu. Następnie symulowałam właściwości CD i CPL szeregu chiralnych chromoforów białek fluorescencyjnych, w tym białka zielonej fluorescencji (ang. *green fluorescent protein*, GFP), a także wpływ otoczenia molekularnego (opisanego na poziomie PCM, PE-QM/MM oraz QM/QM) na przebieg modelowanych widm. Ostatnim związkiem chemicznym, którym zajmowałam się w pracy jest tioflawina T (ThT). Ten niechiralny barwnik pod wpływem szeregu czynników środowiskowych może wykazywać indukowany dichroizm kołowy, a także indukowaną luminescencję spolaryzowaną kołowo. W pracy zaproponowałam mechanizm indukowania sygnałów CD i CPL oraz opisałam wpływ otoczenia molekularnego na przebieg widm chiralooptycznych ThT.

Pierwszym z podjętych problemów badawczych była analiza wpływu otoczenia na właściwości chiralooptyczne badanych cząsteczek oraz sprawdzenie, jak dobrze zastosowane modele środowiska odtwarzają wpływ różnego otoczenia na te właściwości.

Ogólnym wnioskiem dotyczącym modelowania zarówno środowiska wodnego, jak i białkowego jest to, że obliczone właściwości chiralooptyczne w dużym stopniu zależą od uwzględnionych konformacji badanej cząsteczki, a także struktury przestrzennej najbliższego otoczenia. W celu prawidłowego opisu badanych właściwości należałoby uwzględnić w obliczeniach oddziaływania specyficzne, takie jak na przykład wiązania wodorowe. Cząsteczki wody i grupy funkcyjne tworzące wiązania z badanym chromoforem lub inne asymetryczne otoczenie (uwzględnione w regionie kwantowo-chemicznym) mogą w sposób znaczący modyfikować gęstość elektronową badanych chromoforów, a tym samym wpływać na ich odpowiedź optyczną.

Metodą, która opisuje w sposób adekwatny zarówno konformacje chromoforu, jak i różne konfiguracje otoczenia jest niewątpliwie dynamika molekularna. Pozwala ona na próbkowanie przestrzeni konformacyjnej i dobrze nadaje się do modelowania właściwości chiralooptycznych. Przeprowadzenie obliczeń dla znacznej liczby klatek z symulacji MD jest jednak bardzo czasochłonne i wymaga dużych zasobów komputerowych.

Kolejną z metod dobrze odtwarzających wpływ środowiska na właściwości chiralooptyczne badanych związków jest model polaryzowalnego osadzenia PE-QM/MM. Bardzo dobrze sprawdził się on w opisie otoczenia białkowego chromoforów białek fluorescencyjnych (poprawnie przewidując uszeregowanie wartości siły rotatora różnych mutantów GFP i DsRed), a także adekwatnie przewidział uśredniony wpływ cząsteczek wody na badane parametry CD i CPL.

Warto też zwrócić uwagę na model mikrosolwatacji, który dość niskim kosztem pozwala na uwzględnienie oddziaływań specyficznych z rozpuszczalnikiem, a jednocześnie prowadzi do wyników zgodnych z eksperymentem (dla (*R*)-(+)-2-hydroksypropanoamidu).

Drugim z poruszanych problemów badawczych było modelowanie widm luminescencji spolaryzowanej kołowo (CPL) chromoforów o znaczeniu biologicznym – białek fluorescencyjnych i tioflawiny T. Sprawdziłam najpierw jakie aspekty metodologiczne mają wpływ na obliczane parametry CD i CPL. Należą do nich m.in. uwzględnienie różnej podatności elektrycznej otoczenia oraz wybór funkcjonału do optymalizacji geometrii i obliczeń właściwości CD i CPL. Przeanalizowałam następnie zależność pomiędzy strukturami równowagowymi chromoforów o znaczeniu biologicznym i ich właściwościami chiralooptycznymi w stanie podstawowym i wzbudzonym.

Przeprowadzone obliczenia wskazują, że struktury chromoforów białek fluorescencyjnych w stanie podstawowym i wzbudzonym mogą różnić się dość znacznie. Na ogół geometria chromoforów w stanie podstawowym jest bardziej płaska, podczas gdy w stanie wzbudzonym następuje skręcenie płaszczyzny pomiędzy pierścieniami aromatycznymi w chromoforze, a także zmniejszenie kąta płaskiego pomiędzy nimi.

Uwzględnienie wpływu otoczenia, przynajmniej na poziomie PCM, w optymalizacji geometrii stanu wzbudzonego wydaje się koniecznością i jest też ważne w obliczeniach badanych własności molekularnych (szczególnie dla stanu wzbudzonego). Jedynie obliczenia z modelem PCM pozwoliły na uzyskanie prawidłowej – dodatniej – wartości siły rotatora eGFP (białka o wzmocnionej zielonej fluorescencji) w widmie luminescencji spolaryzowanej kołowo. Uwzględnienie otoczenia za pomocą modelu ośrodka ciągłego prowadziło także do struktur równowagowych tioflawiny T o geometrii znacząco różnej niż dla cząsteczki izolowanej. Istotnym również wydaje się wniosek metodologiczny, aby we wszystkich obliczeniach właściwości chiralooptycznych przeprowadzonych za pomocą metody funkcjonału gęstości (DFT) korzystać z funkcjonałów o rozdzielonym zasięgu separacji oddziaływań, np. CAM-B3LYP, co pozwala na otrzymanie dobrego jakościowo opisu intensywności pasm na widmie.

Ostatnim z celów rozprawy doktorskiej było zbadanie mechanizmów indukowania właściwości chiralnoptycznych niechiralnego barwnika – tioflawiny T. Za pomocą metod chemii kwantowej zbadalam mechanizm "chiralnego skrętu" oraz indukowania chiralności przez zmianę rozkładu gęstości elektronowej cząsteczki ThT pod wpływem otoczenia białkowego.

Przeprowadzone obliczenia sugerują, że oba przebadane mechanizmy mogą indukować zmiany efektu Cottona o sile rotatora rzędu kilkudziesięciu $10\text{-}40 \text{ esu}\cdot\text{cm}\cdot\text{erg}\cdot\text{G}^{-1}$, zatem oba mogą wpłynąć na powstanie silnego sygnału ICD i ICPL tioflawiny T interkalowanej w amyloidach. Biorąc pod uwagę doniesienia literaturowe o preferencyjnym wiązaniu się cząsteczki ThT w pobliżu łańcuchów białkowych bogatych w pierścienie aromatyczne, [2,3] przeprowadzone obliczenia mogą rzucić nowe światło na kwestię oddziaływania ThT z amyloidami białkowymi i innymi tego typu układami.

Wykonałam również symulacje dla kompleksu tioflawiny T z acetylocholinoesterazą, którego struktura została ustalona na podstawie pomiarów eksperymentalnych. Obliczenia te potwierdziły indukowanie znacznej intensywności efektu Cottona dla płaskiej cząsteczki ThT w otoczeniu białkowym zawierającym pierścienie aromatyczne.

Przeprowadzenie symulacji dla tioflawiny T pozwoliło także na zweryfikowanie zaproponowanego w literaturze mechanizmu wygaszania fluorescencji tego barwnika w wodzie. [4] Na podstawie obliczeń wykonanych dla izolowanego chromoforu sugerowano, że geometria stanu wzbudzonego relaksuje się do struktury, dla której siła oscylatora ma wartość bliską zeru. [4] Obliczenia, które przeprowadziłam w ramach rozprawy doktorskiej wykazały, że mechanizm ten niekoniecznie może mieć miejsce w środowisku silnie polarnym, a brak fluorescencji w wodzie jest raczej związany tylko ze swobodną rotacją wewnętrzną pomiędzy pierścieniami cząsteczki ThT, sprawiającą, że kanał relaksacji bezpromienistej jest efektywny.

Wyniki badań będące podstawą mojej pracy doktorskiej zostały opublikowane w czasopismach międzynarodowych: dwie prace w *Journal of Physical Chemistry B* oraz jedna w *Chemical Physics*. Kolejna z prac poświęconych opisywanej tematyce została wysłana do czasopisma *Physical Chemistry Chemical Physics*, a pozostałe są w przygotowaniu.

Literatura:

- [1] N. Berova, L. di Bari, G. Pescitelli, *Chem. Soc. Rev* 36 (2007) 914–931;
- [2] M. Biancalana, K. Makabe, A. Koide, S. Koide, *J. Mol. Biol.* 385 (2009) 1052–1063;
- [3] M. Biancalana, S. Koide, *Biochim. Biophys. Acta.* 1804 (2010) 1405–1412;
- [4] R. Sabate, L. Rodriguez-Santiago, M. Sodupe, S. J. Saupe, S. Ventura, *Chem. Commun.* 49 (2013) 5745–5747;