



STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Struktury molekularne i właściwości spektralne chromoforów wybranych białek fluorescencyjnych oraz rodopsyny Obliczenia kwantowo-chemiczne

mgr inż. Łukasz Wolański

Promotor: dr hab. Tadeusz Andruniów, prof. PWr

Katedra Inżynierii i Modelowania Materiałów Zaawansowanych, Wydział Chemiczny

Zjawiska absorpcji, konwersji, a niekiedy również i emisji promieniowania świetlnego stanowią przełomowy etap wielu fundamentalnych procesów biologicznych. Główną rolę odgrywają w nich zwykle fotoaktywne białka. Jednym z najważniejszych jest należąca do grupy fotoreceptorów sprzężonych z białkami G (GPCR) purpura wzrokowa – rodopsyna. Występuje ona w komórkach pręcikowych siatkówki oka głowonogów, stawonogów oraz kręgowców i odpowiada za widzenie skotopowe. W wyniku absorpcji fotonu chromofor rodopsyny, którym jest uprotonowana zasada Schiffa 11-cis retinalu (rPBS) izomeryzuje do konformacji całkowicie-trans (rPSBT). W następstwie tej fotoizomeryzacji zachodzą zmiany konformacyjne w strukturze białka i następuje przekazanie impulsu nerwowego do mózgu.

Ważną grupę fotoaktywnych biocząsteczek stanowią również białka fluorescencyjne, wśród których najlepiej poznane jest białko zielonej fluorescencji (GFP) z meduzy *Aequorea victoria*. Zarówno samo GFP, jak i inne białka tej rodziny, posiadają strukturę β -beczki, w której wnętrzu znajduje się fluorofor. Białka te są powszechnie wykorzystywane w inżynierii genetycznej i biologii molekularnej jako geny markerowe – do wizualizacji organelli, komórek i tkanek. Istotne znaczenie ma ich zastosowanie w mikroskopii fluorescencyjnej oraz jako elementów biodetektorów i nanosensorów.

Ze względu na znaczenie biologiczne i zastosowania praktyczne, bardzo pożądane jest poznanie właściwości spektralnych wspomnianych biomolekuł oraz czynników, które na nie wpływają. Określenie roli otoczenia białkowego, wpływu najbliższej sąsiadujących z chromoforem reszt aminokwasowych, efektu obecności rozpuszczalnika czy pH środowiska, wymaga uprzedniego poznania właściwości samego izolowanego chromoforu. Obecnie istnieje tylko jedna eksperymentalna metoda badania właściwości spektralnych takich cząsteczek *in vacuo*, którą stosuje zespół badawczy L. H. Andersena z Uniwersytetu Aarhus. Umożliwia ona badanie jedynie cząsteczek zjonizowanych, co stanowi poważne ograniczenie. Metody obliczeniowe chemii kwantowej są z kolei łatwiej dostępne, tańsze w użyciu i pozbawione wspomnianej niedogodności.

W pracy doktorskiej zaprezentowane zostały wyniki badań potwierdzające, że odpowiednio wybrane i właściwie zastosowane metody teoretyczne mogą stanowić bardzo dobre narzędzie do badania właściwości spektralnych chromoforów białek *in vacuo*. W toku badań przedyskutowano wybór stosowanych na różnych etapach obliczeń metod oraz ich niektórych parametrów. Opisane obliczenia zostały przeprowadzone dla kilku modeli chromoforu białka rodopsyny oraz dla szeregu modeli fluoroforów trzech białek fluorescencyjnych: GFP, GFP-W7 i DsRed. Całość pracy podzielono na trzy projekty.

Pierwsze zadanie badawcze miało na celu określenie użyteczności metody sprzężonych klasterów w przybliżeniu drugiego rzędu (CC2) do badaniach ścieżek reakcji fotochemicznych, ze szczególnym uwzględnieniem miejsca przecięcia stożkowego i jego okolic. Dla różnych struktur minimalnego modelu chromoforu rodopsyny (PSB3) składających się na ścieżki wyznaczone na powierzchniach energii potencjalnej stanów S_0 i S_1 zostały przeprowadzone obliczenia energii. Uzyskane wyniki porównano z danymi referencyjnymi (MRCISD+Q). Okazało się, że metoda CC2 poradziła sobie bardzo dobrze nie tylko z obliczeniami energii dla punktów stacjonarnych, lecz również w innych miejscach badanych ścieżek. Wartości błędów zgodności przebiegu krzywych okazały się być bardzo małe. Metoda CC2 prawidłowo przewidziała też istnienie przecięcia stożkowego. Zaprezentowane w pracy wyniki obliczeń pokazały, że metoda CC2 konsystentnie radzi sobie z różnymi aspektami badania ścieżek fotoreakcji, przewidując zarówno prawidłową topografię, jak i całkiem dobrą topologię powierzchni energii potencjalnej.

Efektom końcowym realizacji drugiego projektu było uzyskanie z obliczeń przeprowadzonych z wykorzystaniem wieloreferencyjnego rachunku zaburzeń (CASPT2) zestawienia wartości wertykalnych energii wzbudzeń elektronowych dla pełnorozmiarowych analogów retinalu. Przeprowadzone obliczenia pozwoliły na wskazanie, jak uzyskiwane z obliczeń energie wzbudzeń elektronowych zależą od metody obliczeniowej użytej do optymalizacji geometrii równowagowych. W szczególności pokazano, że zależność między wartością parametru alternacji wiązań (BLA) danej struktury równowagowej, a wartościami bezwzględnych odchyłeń obliczonych dla energii wzbudzeń elektronowych, ma charakter liniowy. Jednak największe znaczenie dla metodologii prowadzonych techniką CASPT2 obliczeń miało określenie wpływu wyboru wartości modyfikującego hamiltonian zerowego rzędu korekcyjnego parametru empirycznego IPEA-shift, na uzyskiwane z obliczeń energie przejść elektronowych. Wykorzystując jako referencyjne dostępne w literaturze dane eksperymentalne, wskazano jako optymalną dla badanej grupy struktur wartość IPEA-shift wynoszącą 0,00–0,10 a.u. Pokazano, że użycie domyślnej wartości tego parametru (0,25 a.u.) prowadzi do znacznych odchyłeń wynoszących nawet 0,2–0,3 eV. Dla badanych modeli retinalu obliczono również wertykalne energie wzbudzeń elektronowych metodą CC2. Otrzymane wyniki okazały się być znacznie mniej dokładne, niż pochodzące z obliczeń CASPT2. Mieściły się jednak w marginesie błędu metody.

Trzeci projekt obejmował badania właściwości absorpcyjnych i emisyjnych wybranych modeli chromoforów białek fluorescencyjnych GFP, GFP-W7 i DsRed. Dla wszystkich układów otrzymano energie przejść elektronowych metodą CC2. Dla modeli chromoforów GFP i GFP-W7 przeprowadzono też obliczenia metodą CASPT2. W efekcie uzyskano cenne zestawienie wertykalnych energii przejść absorpcyjnych dla badanych struktur. Dla części układów uzyskano również wertykalne energie przejść fluorescencyjnych oraz adiabatyczne różnice energii. W przypadku obliczeń CASPT2 przedyskutowano wpływ wartości parametru IPEA-shift na uzyskiwane energie przejść elektronowych, wskazując jako optymalną wartość 0,15 a.u. W przypadku większości modeli chromoforu GFP-W7 największa wykorzystana do obliczeń przestrzeń aktywna (zarazem największa, dla której obliczenia były możliwe do przeprowadzenia) okazała się być niewystarczająca.

Zawarte w drugim i trzecim projekcie badania nad parametrem IPEA-shift obecnym w metodzie CASPT2 pozwoliły na wyciągnięcie ogólniejszego wniosku. Wbrew zamiarom twórców, domyślna postać hamiltonianu zerowego rzędu nie jest w stanie pełnić roli uniwersalnej poprawki na systematyczny błąd metody. Jego optymalną wartość trzeba bowiem każdorazowo indywidualnie dobierać dla danej rodziny badanych struktur. Wyraźnie zależy też ona od rozmiaru samej badanej cząsteczki. Mimo to trzeba jasno stwierdzić, że metoda CASPT2 jest właściwie najlepszą obecnie dostępną techniką obliczeniową, którą można zastosować do badania energii przejść elektronowych chromoforów pochodzenia biologicznego.