

**Wpływ modyfikacji strukturalnych w 11-*cis*-retinalu na przebieg procesu fotoizomeryzacji w rodopsynie**

mgr inż. Elżbieta Walczak

Promotor: dr hab. Tadeusz Andruniów

Instytut Chemii Fizycznej i Teoretycznej, Politechnika Wrocławska

Rodopsyna jest membranowym białkiem pigmentowym występującym w siatkówce oka mięczaków, stawonogów i kręgowców. To światłoczułe białko odpowiedzialne jest za widzenie w warunkach ograniczonej ilości światła. Należy do grupy receptorów sprzężonych z białkami G (GPCR, z ang. G Protein-Coupled Receptor), które pośredniczą w przekazie sygnałów do wnętrza komórki, co prowadzi do przesłania impulsu nerwowego do mózgu. Proces widzenia zaczyna się od absorpcji fotonu przez chromofor rodopsyny, tj. uprotonowaną zasadę Schiffa 11-*cis*-retinalu (rPSB), powodując izomeryzację retinalu do konformacji całkowicie *trans* (rPSBT) i powstanie pierwszego termicznie stabilnego fotoproduktu – batorodopsyny. Zmagazynowana energia fotonowa (ang. photon energy storage), zdefiniowana jako różnica pomiędzy energią batorodopsyny a rodopsyny, wykorzystana jest w dalszej kolejności do zmian konformacyjnych chromoforu i białka, które uruchamiają kaskadę sygnalizacyjną w komórce i inicjującą impuls nerwowy.

W rozprawie doktorskiej przedstawiono rezultaty badań nad fotochemią retinali i rodopsyny. Pierwszym aspektem pracy było oszacowanie błędu systematycznego metody CASPT2//CASSCF w stosunku do bardziej dokładnej metody CASPT2//CASPT2, niedostępnej z powodu wysokich kosztów obliczeniowych dla takich układów jak rPSB i jego pochodne. Badania przeprowadzone w fazie gazowej na 12 modelach rPSB bez pierścienia  $\beta$ -jononowego pozwoliły określić jakiej wielkości błąd zarówno właściwości geometrycznych w stanie podstawowym, jak i ich właściwości spektroskopowych popełniany jest w obliczeniach CASPT2//CASSCF w białku.

Drugim celem pracy było zbadanie, czy różne konformery chromoforu zawierającego dodatkowy pierścień 8-członowy mogą istnieć w białku. Kieszeń białkowa rodopsyny wiążąca chromofor jest na tyle duża i elastyczna, że może pomieścić nie tylko natywny rPSB, ale również wiele jego pochodnych strukturalnych. W badaniach opisanych w literaturze wykazano, że wbudowany w łańcuch polienowy retinalu pierścień 8-członowy jest na tyle elastyczny, że w fazie gazowej może występować w trzech konformacjach. Badania eksperymentalne pokazały, że modyfikowany chromofor izomeryzuje w białku z podobną wydajnością kwantową i jeszcze szybciej niż natywny rPSB. W rozprawie, przy użyciu metody QM/MM, sprawdzono czy możliwe jest istnienie trzech różnych konformerów w białku oraz który z konformerów chromoforu z dodatkowym pierścieniem 8-członowym jest najbardziej stabilny energetycznie w rodopsynie, a co za tym idzie, który z nich jest odpowiedzialny za maksimum absorpcji obserwowane w eksperymencie spektroskopii UV-VIS.

Nadrzędnym celem dysertacji było określenie wpływu modyfikacji strukturalnych łańcucha polienowego (metylacja, demetylacja, wbudowanie dodatkowego pierścienia) i pierścienia  $\beta$ -jononowego chromoforu na mechanizm wstępnego etapu procesu fotoizomeryzacji w rodopsynie. Ze względu na szybkość reakcji, obserwacja tego procesu i poznanie jego pełnego mechanizmu metodami eksperymentalnymi na dzień dzisiejszy jest niezwykle trudna czy wręcz niemożliwa. Wykazano, że mechanizm fotoizomeryzacji (de)metylowanych pigmentów oraz pigmentów z acyklicznym chromoforem zachodzi zgodnie z mechanizmem asynchronicznego wału korbowego. Przebadano również wpływ modyfikacji strukturalnych chromoforu na wielkość zmagazynowanej energii fotonowej, która pośrednio odpowiedzialna jest za aktywację białka G i przesłanie impulsu nerwowego do mózgu.

#### SUMMARY OF DOCTORAL DISSERTATION

### **The influence of 11-*cis*-retinal structural modifications on the primary step of the photoisomerization reaction in rhodopsin**

Elżbieta Walczak, M.Sc.

Supervisor: Tadeusz Andruniów, D.Sc.

Institute of Physical and Theoretical Chemistry, Wrocław University of Technology

Rhodopsin, also known as visual purple, is a pigment found in the rod photoreceptors of molluscs, arthropods and vertebrates. It is responsible for light perception in the low-light conditions. The pigment belongs to the family of G Protein-Coupled Receptor (GPCR). The members of this family are responsible for the activation of signal transduction pathways inside cells and the nerve impulse transmission. An absorption of a photon by rhodopsin causes isomerization of the chromophore from 11-*cis* (rPSB, protonated Schiff Base of 11-*cis*-retinal) to all-*trans* (rPSBT, protonated Schiff Base of all-*trans*-retinal) isomer leading to formation of the metastable intermediate bathorhodopsin. The photoreaction is highly stereoselective in the protein cavity and one of the fastest and most efficient observed so far. Interestingly, approximately 60% of the absorbed photon energy is retained in bathorhodopsin which is crucial for driving conformational changes in the protein to signalling state, and finally after amplification of the signal to excitation of optical nerve.

The dissertation focuses on the photochemistry of retinals and modified rhodopsins. The first part of the thesis reports on the first CASPT2/ANO-L-VDZP ground-state geometry optimization, followed by the CASPT2/ANO-L-VDZP vertical excitation energy calculation for methylated, demethylated, and locked models of rPSB chromophores without the  $\beta$ -ionone ring in a gas phase. Furthermore, the systematic errors of the CASPT2//CASSCF method are compared with the results obtained from the computer- and time-demanding CASPT2//CASPT2 calculations.

In the second part of the thesis, the locked rPSB models with an extra 8-membered ring incorporated into the retinal polyene chain are characterised within QM/MM method. Interestingly, the retinal binding site is found to be flexible enough to accommodate structurally modified retinals forming artificial pigments. The possibility to form the synthetic pigments from one of the three possible locked-retinal conformers is discussed.

The third part of the dissertation concerns the effect of 11-*cis*-retinal structural modifications (polyene chain methylation, demethylation, incorporation of an extra ring into the polyene chain,  $\beta$ -ionone ring modification) on the primary step of the photoisomerisation reaction in rhodopsin. It is shown that the (de)methylated pigments and pigments with acyclic chromophore isomerise in space saving asynchronous crankshaft motion similarly to the process observed in the native pigment. Additionally, the structural and spectroscopic properties of the dark state and its first stable intermediate – bathorhodopsin are examined. Moreover, the impact of structural modifications of the rPSB on the photon energy stored in the synthetic bathorhodopsins is presented.