



***Poszukiwanie  
molekularnego mechanizmu  
fotostabilności  
materii biologicznej***



Andrzej L. Sobolewski  
*Instytut Fizyki,  
Polskiej Akademii Nauk*

przy współpracy  
Wolfganga Domcke

**TUM**  
TECHNISCHE  
UNIVERSITÄT  
MÜNCHEN

***1. Elementarne „cegiełki” materii żywej***

***2. Zagadnienie fotostabilności***

***3. Fotofizyka wybranych bio-molekuł***

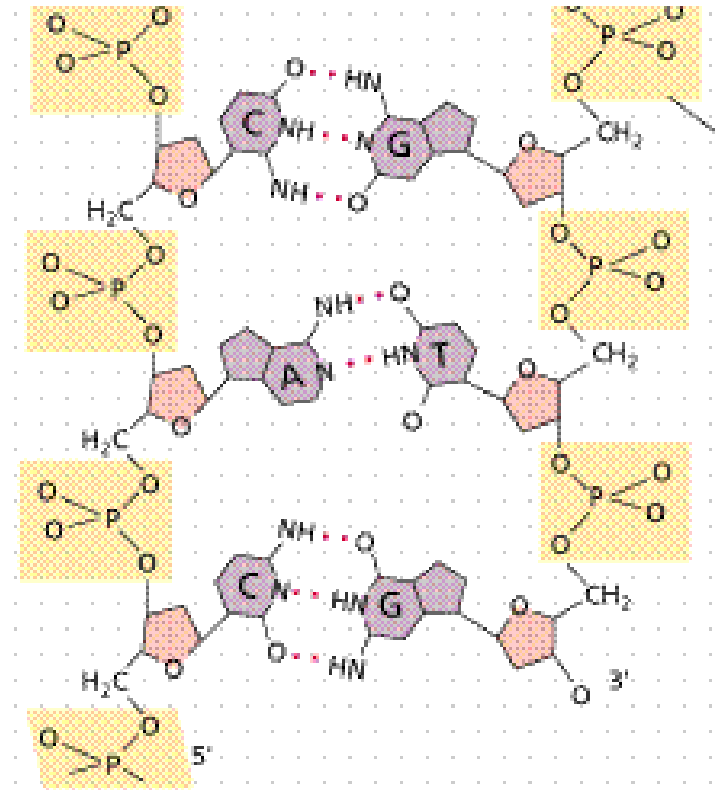
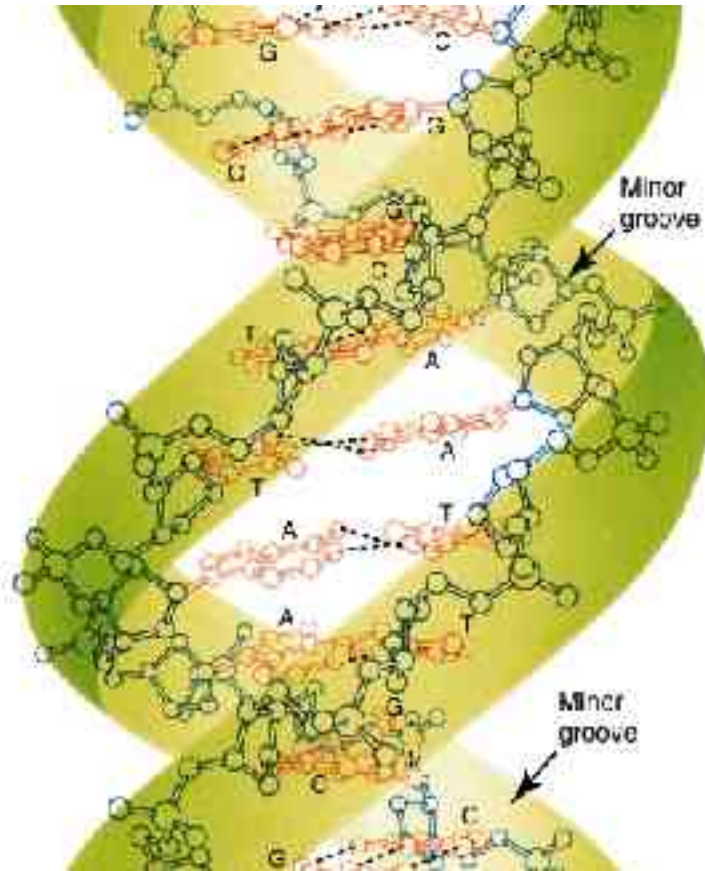
***4. Wnioski***

- ***Elementarne „cegiełki”  
materii ożywionej***

Życie jest niezmiernie złożonym procesem biochemicznym, w którym uczestniczą niezliczone ilości cząsteczek i struktur makromolekularnych. Kiedy jednak przyjrzymy się życiu na poziomie molekularnym stwierdzamy, że podstawowe struktury materii ożywionej zbudowane są z zaledwie kilku „cegiełek” molekularnych.



# Molekularne cegiełki życia: DNA

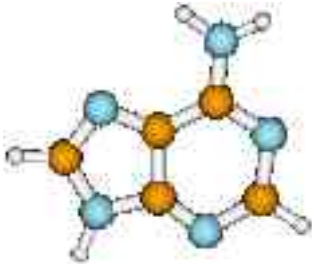


Prawie cała informacja genetyczna organizmów żyjących na Ziemi zakodowana jest w formie podwójnej spirali DNA, której struktura jest określona poprzez tzw. wiązania wodorowe pomiędzy parami cząsteczek, zwanych zasadami DNA.

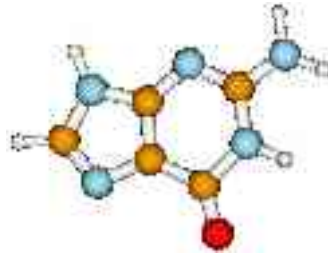
# Molekularne cegiełki życia: zasady DNA

Spośród bogactwa tzw. cząsteczek heteroaromatycznych, do których należą zasady DNA, Natura „wybrała” jedynie cztery do kodowania informacji genetycznej. Są to:

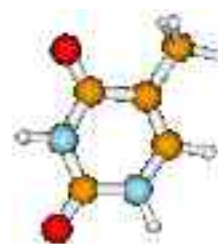
*adenina*



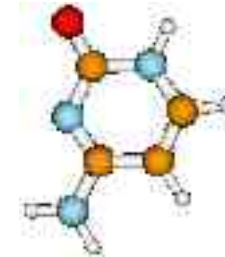
*guanina*



*tymina*

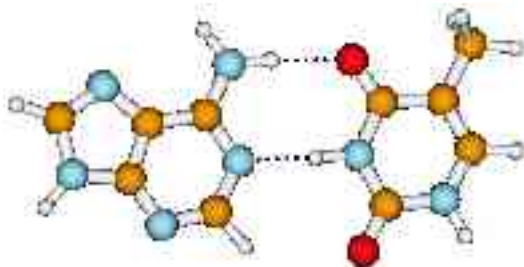


*cytozyna*

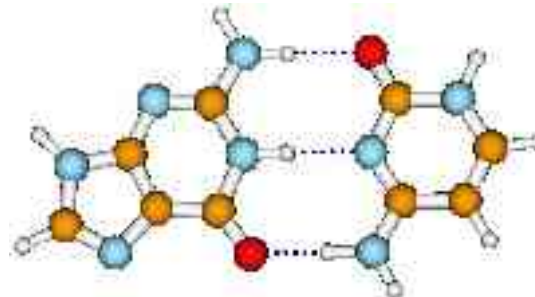


Jedynie dwie formy par zasad zwanych parami Watsona-Cricka kodują informację genetyczną w DNA. Są to:

*Adenina-Tymina*



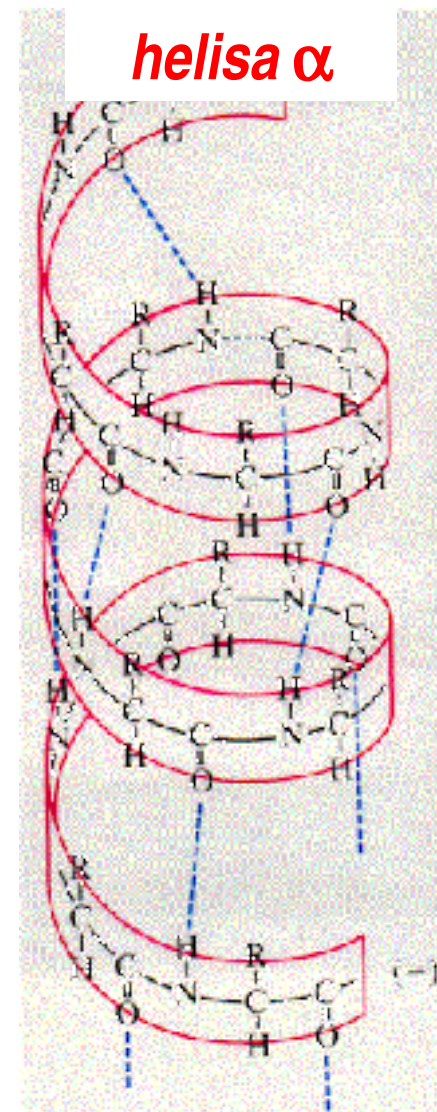
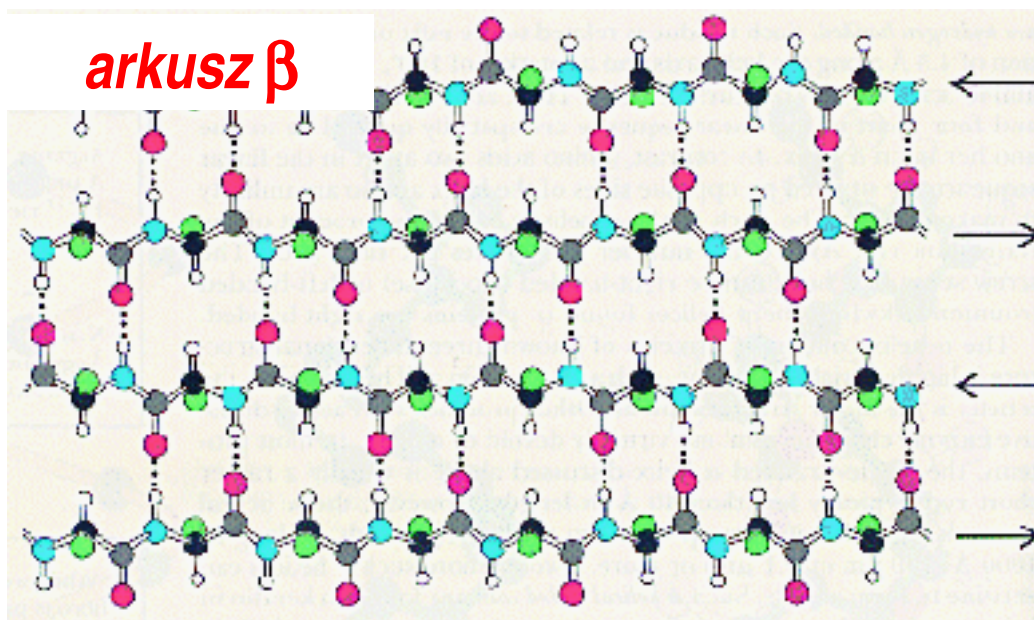
*Guanina-Cytozyna*



- węgiel
- azot
- tlen
- wodór

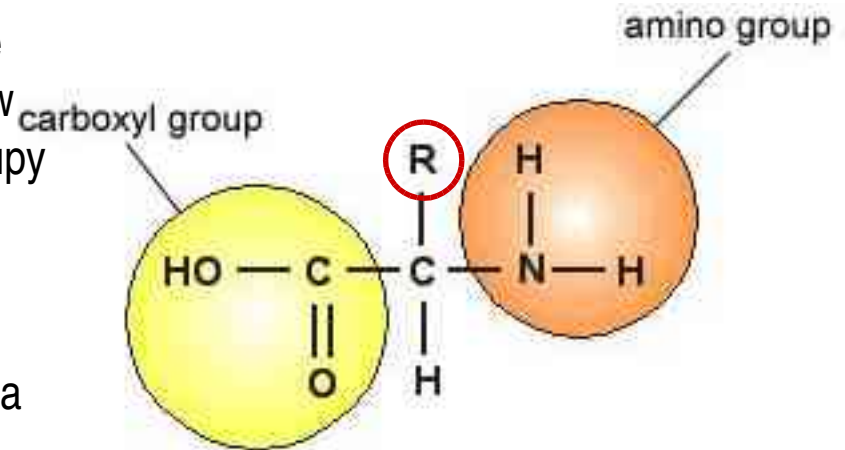
# Molekularne cegiełki życia: białka

Konstrukcja żyjącej komórki i jej maszyna biochemiczna opiera się na białkach, będących w swojej strukturze pierwszorzędowej „sznurami kolorowych paciorków” - aminokwasów. Tzw. struktura drugorzędowa białek decydująca o ich funkcjonalności jest zdeterminowana poprzez wiązania wodorowe w obrębie łańcucha peptydowego. Dwie podstawowe struktury białek to arkusz  $\beta$  i helisa  $\alpha$ :

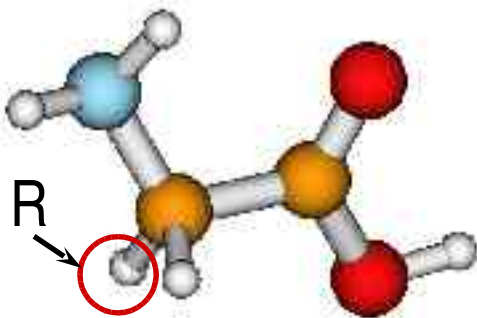


# Molekularne cegiełki życia: aminokwasy

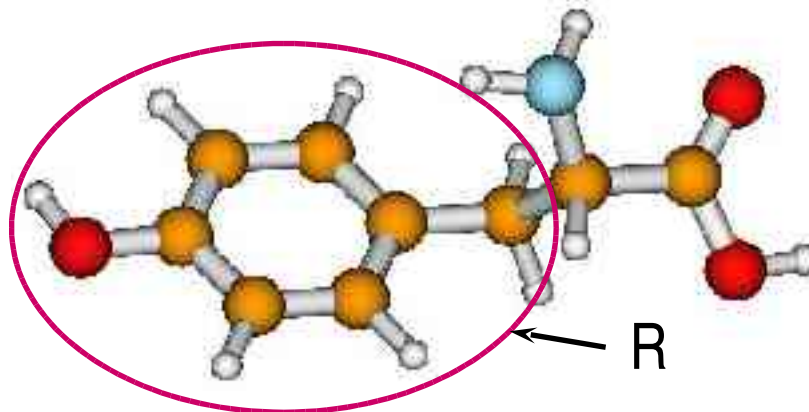
Prawie wszystkie białka zbudowane są z jedynie 20 aminokwasów. Wspólną cechą tych związków jest posiadanie grupy karboksylowej COOH i grupy aminowej NH<sub>2</sub>, a różnią się jedynie formą podstawnika R. I tak np. najprostszy aminokwas glicyna posiada R=H, natomiast jeden z 3 aminokwasów aromatycznych – tyrozyna posiada w tym miejscu resztę fenylową.



*glicyna*



*tyrozyna*



- węgiel
- azot
- tlen
- wodór



## ***2. Zagadnienie fotostabilności***

Dlaczego materia biologiczna  
powinna być fotostabilna?



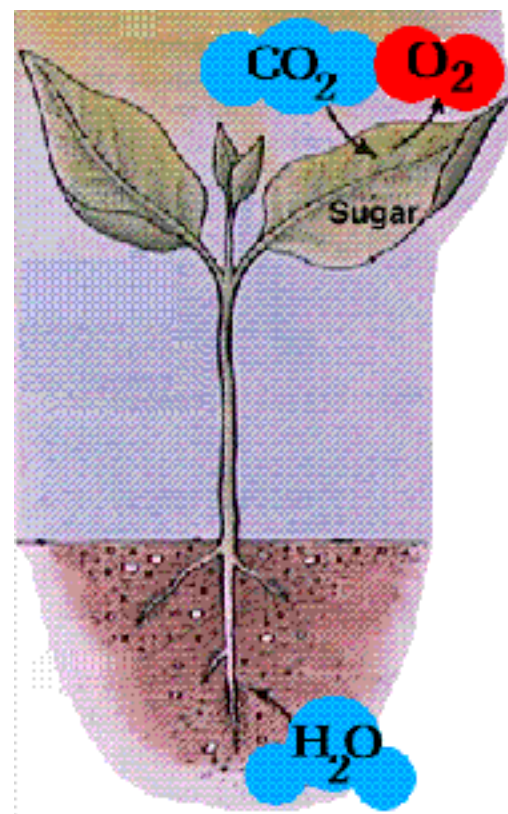
# Fotoreakcja życia

Prawie cała energia jaką ma do dyspozycji życie na Ziemi pochodzi ze Słońca w postaci promieniowania elektromagnetycznego w zakresie widzialnym (VIS) i ultrafioletowym (UV).

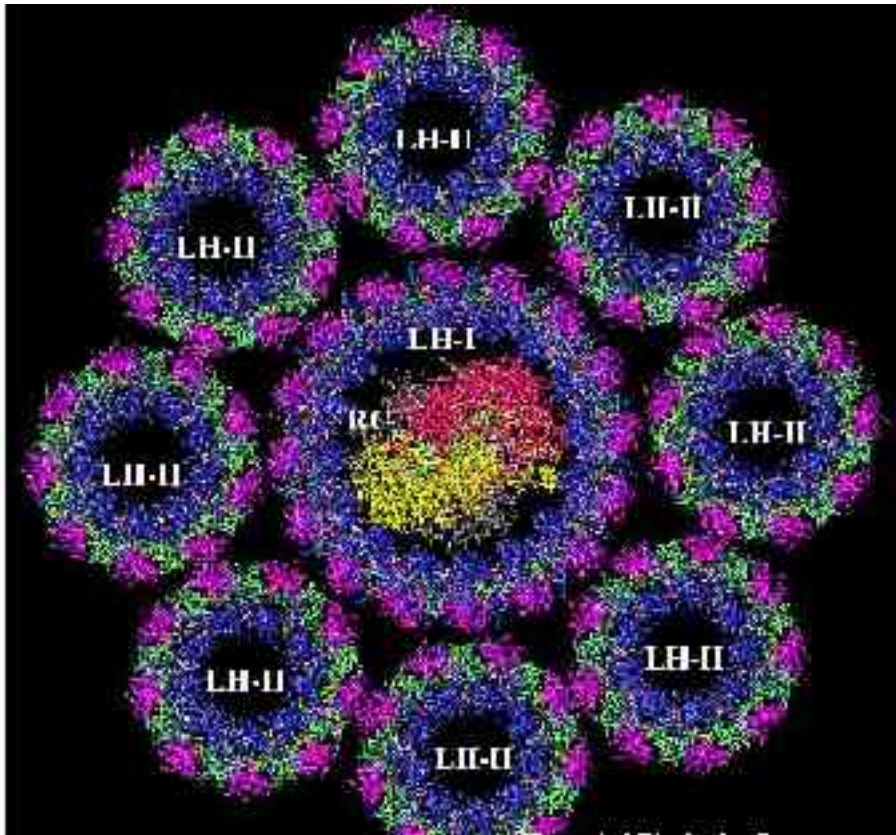
Ta pierwotna forma energii zamieniana jest na formę chemiczną w procesie fotosyntezy.

Życie na Ziemi zależy więc w sposób istotny od promieniowania słonecznego i nie może go uniknąć. Dlatego też materia ożywiona powinna być odporna na promieniowanie słoneczne (fotostabilna).

UV/VIS



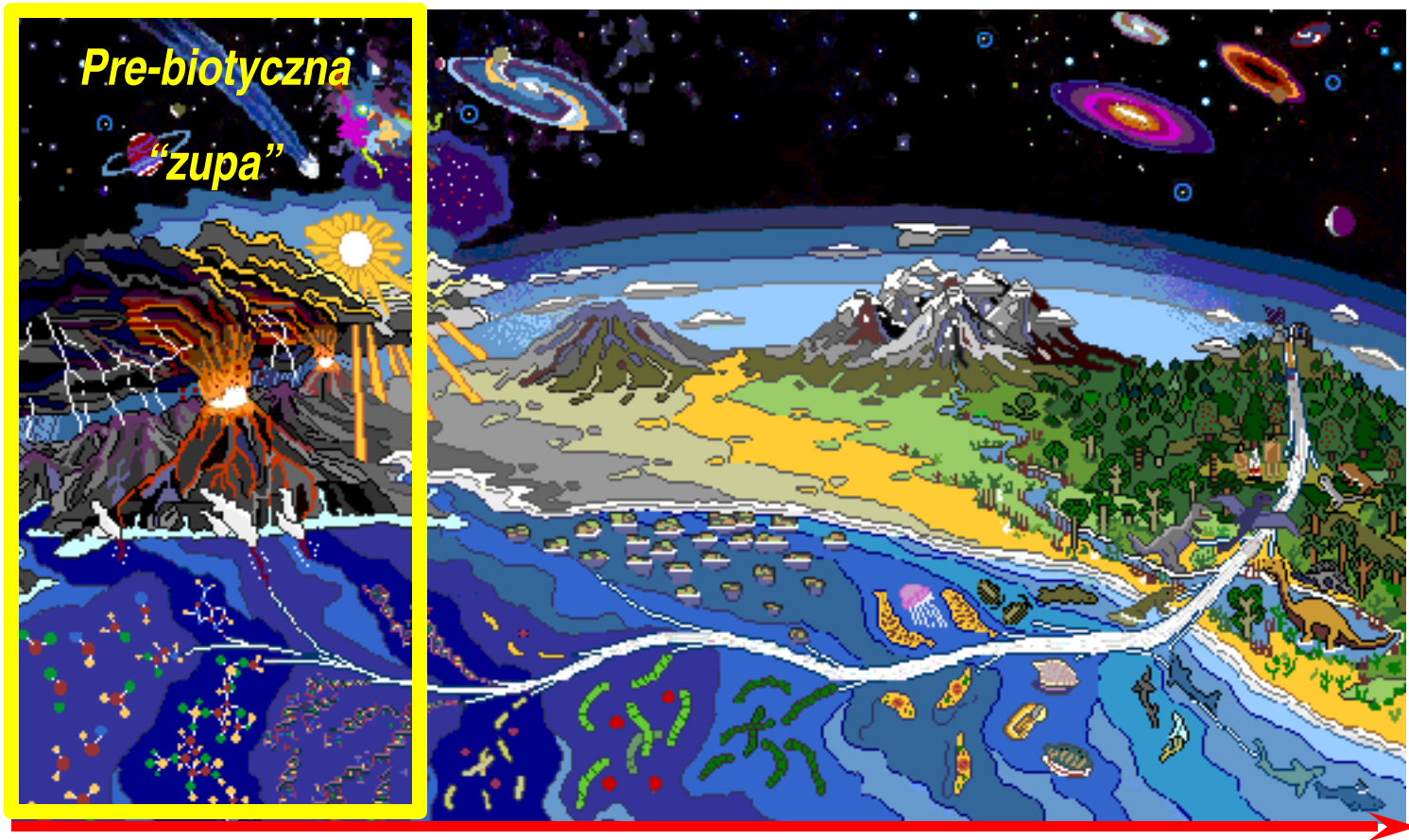
# Kompleks molekularny przetwarzający energię światła na energię chemiczną



Struktury molekularne odpowiedzialne za przetwarzanie energii słonecznej są, na obecnym etapie rozwoju życia na Ziemi, bardzo złożone i posiadają skomplikowane mechanizmy ochrony przed skutkami promieniowania i naprawy ewentualnych uszkodzeń. Procesy te nie poddają się interpretacji w terminach prostych mechanizmów fizycznych.

Ale nie zawsze tak było...

# Ewolucja życia na Ziemi

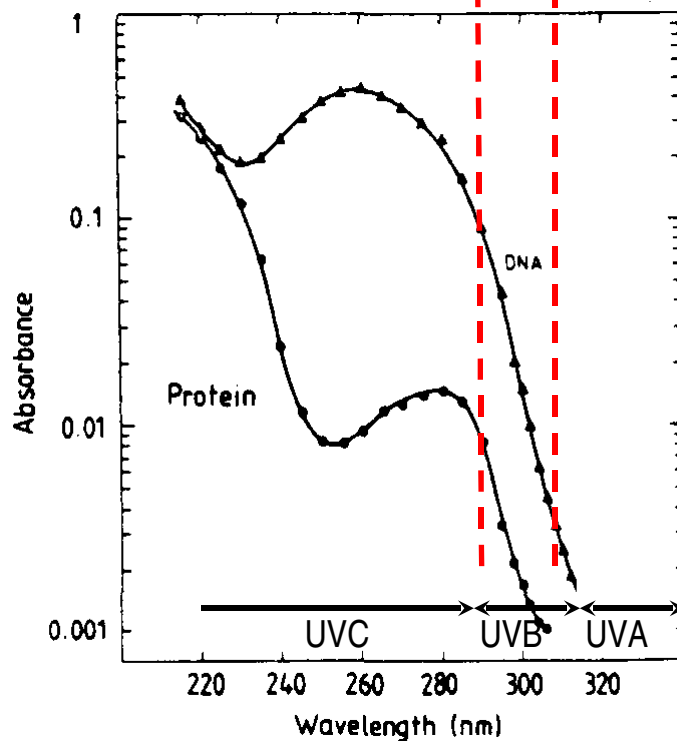


## Strzałka czasu

Selekcja „cegiełek” molekularnych użytych do konstrukcji pierwszych form życia na Ziemi zachodziła w warunkach silnego promieniowania UV (brak ochronnej warstwy ozonowej, a nawet atmosfery).



widmo promieniowania słonecznego  
na powierzchni Ziemi w południe



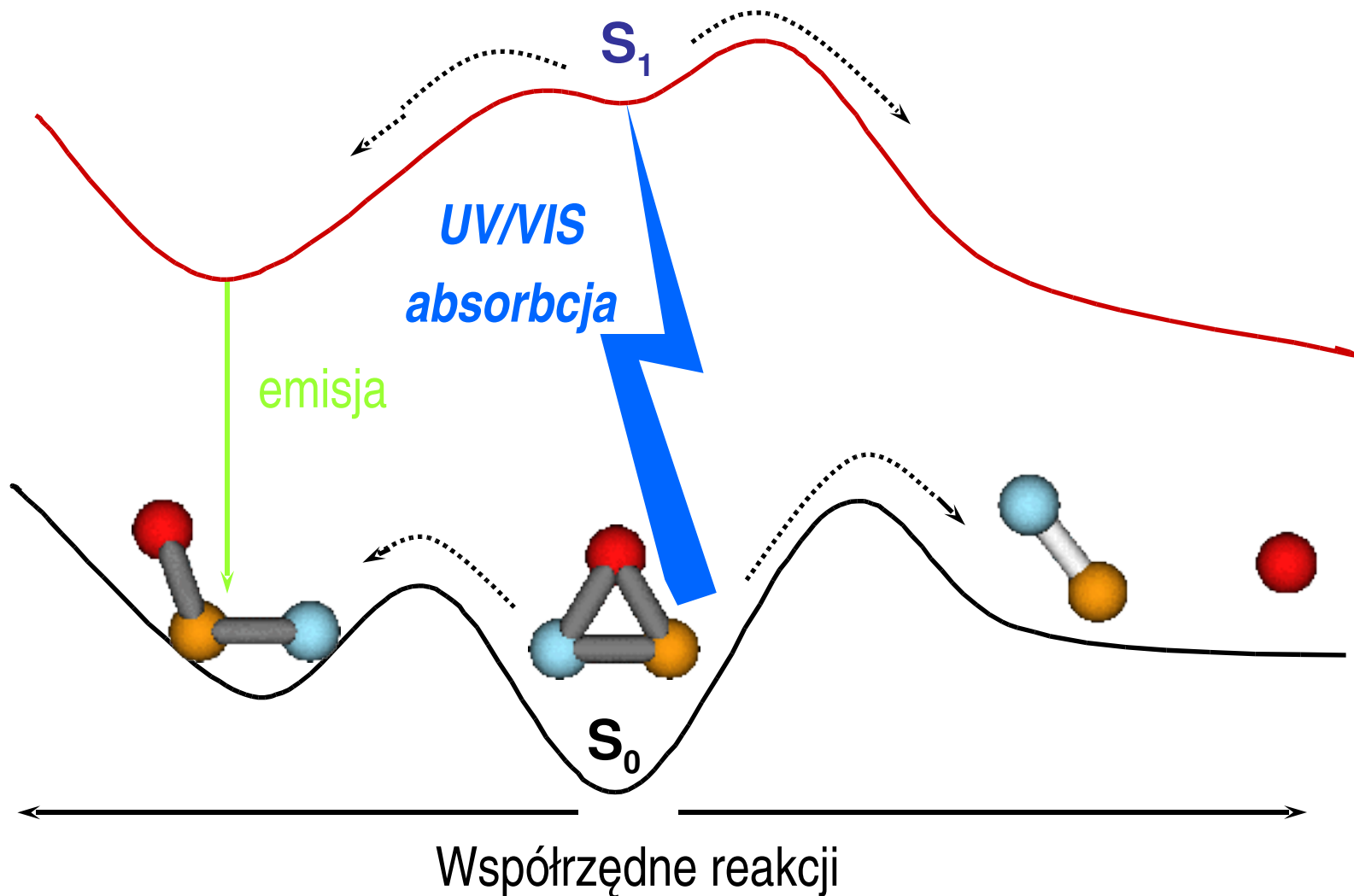
Struktury molekularne najbardziej istotne dla konstrukcji i kodowania życia na Ziemi, czyli białka i DNA, są świetnie „dopasowane” do widma światła słonecznego i prawie go nie pochłaniają.

Czy nie jest to przejawem fotoselekcji na wczesnym etapie rozwoju życia na Ziemi?



## (Foto)stabilność cząsteczki

Generalnie cząsteczki organiczne nie są odporne na promieniowanie w zakresie UV/VIS i podlegają foto-indukowanym przemianom chemicznym

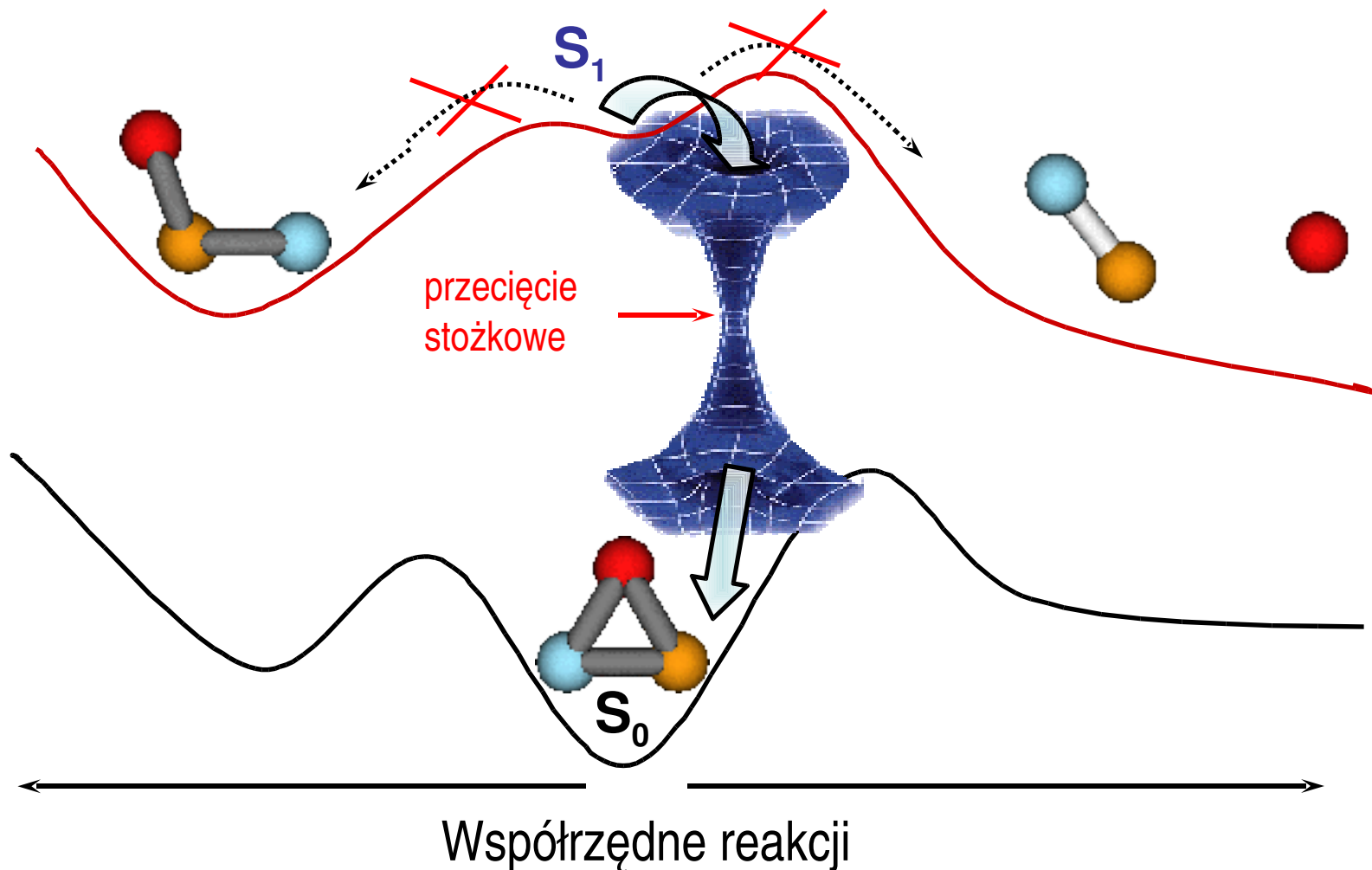


# **Fotostabilność cząsteczki**

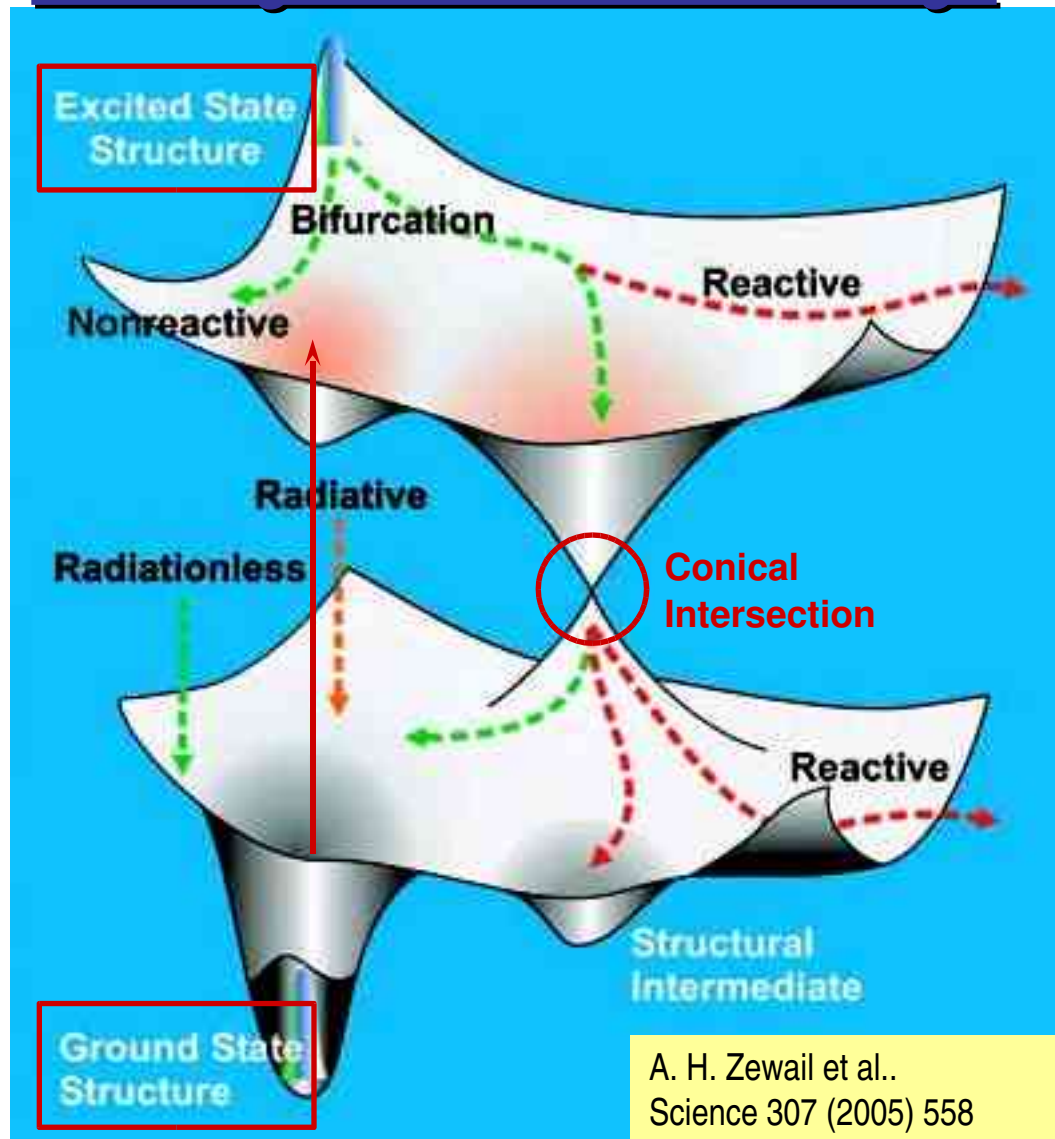
**Fotostabilna cząsteczka** powinna posiadać „wbudowany” mechanizm szybkiej i wydajnej wewnętrznej konwersji energii wzbudzenia optycznego na ciepło oscylacji w stanie podstawowym

## (Foto)stabilność cząsteczki

Panuje powszechne przekonanie, że tego typu mechanizm zapewniają specjalne cechy topologiczne powierzchni energii potencjalnej zwane **przecięciami stożkowymi** (ang. *conical intersections*).



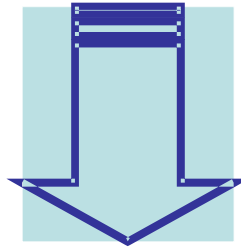
# Powierzchnie energii potencjalnej złożonego układu molekularnego





## **Pytanie:**

Jaki jest mechanizm wewnętrznej konwersji energii wzbudzenia optycznego w cząsteczkach?



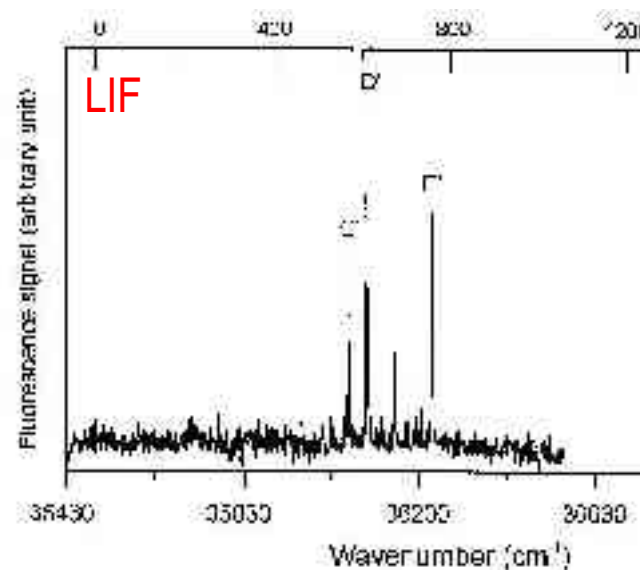
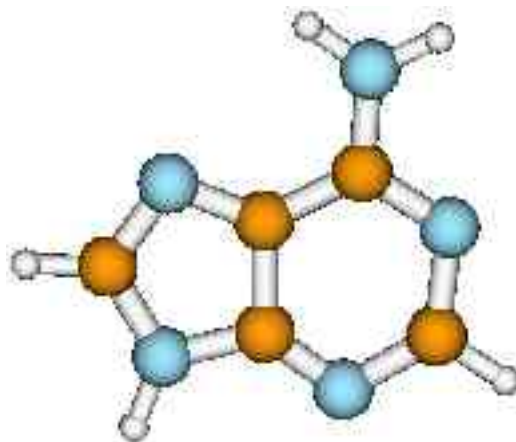
Jakie przekształcenie geometryczne cząsteczki prowadzi do przecięcia powierzchni energii potencjalnej stanu wzbudzonego z podstawowym?

## Eksploracje teoretyczne

**3N-6**-wymiarowych (N- liczba atomów w cząsteczce) powierzchni energii potencjalnej w stanie podstawowym i w stanach elektronowo wzbudzonych cząsteczek są prowadzone przy pomocy numerycznego rozwiązywania **równania Schrödingera** dla elektronów poruszających się w polu elektrostatycznym jąder atomowych tworzących cząsteczkę

### 3. Fotofizyka wybranych bio-molekuł: adenina

- węgiel
- azot
- tlen
- wodór



Adenina wzbudzona w obrębie najniższych stanów elektronowych ( $S_n$ ) powraca do stanu podstawowego ( $S_0$ ) na skalę pod-pikosekundową ( $<10^{-12}$  s). Obserwacja zaledwie kilku dyskretnych linii w widmie wzbudzenia fluorescencji (LIF) wskazuje na obecność nisko leżącego przecięcia stożkowego  $S_1$ - $S_0$  i związanego z nim kanału dezaktywacji bezpromienistej  $S_1 \rightarrow S_0$ .

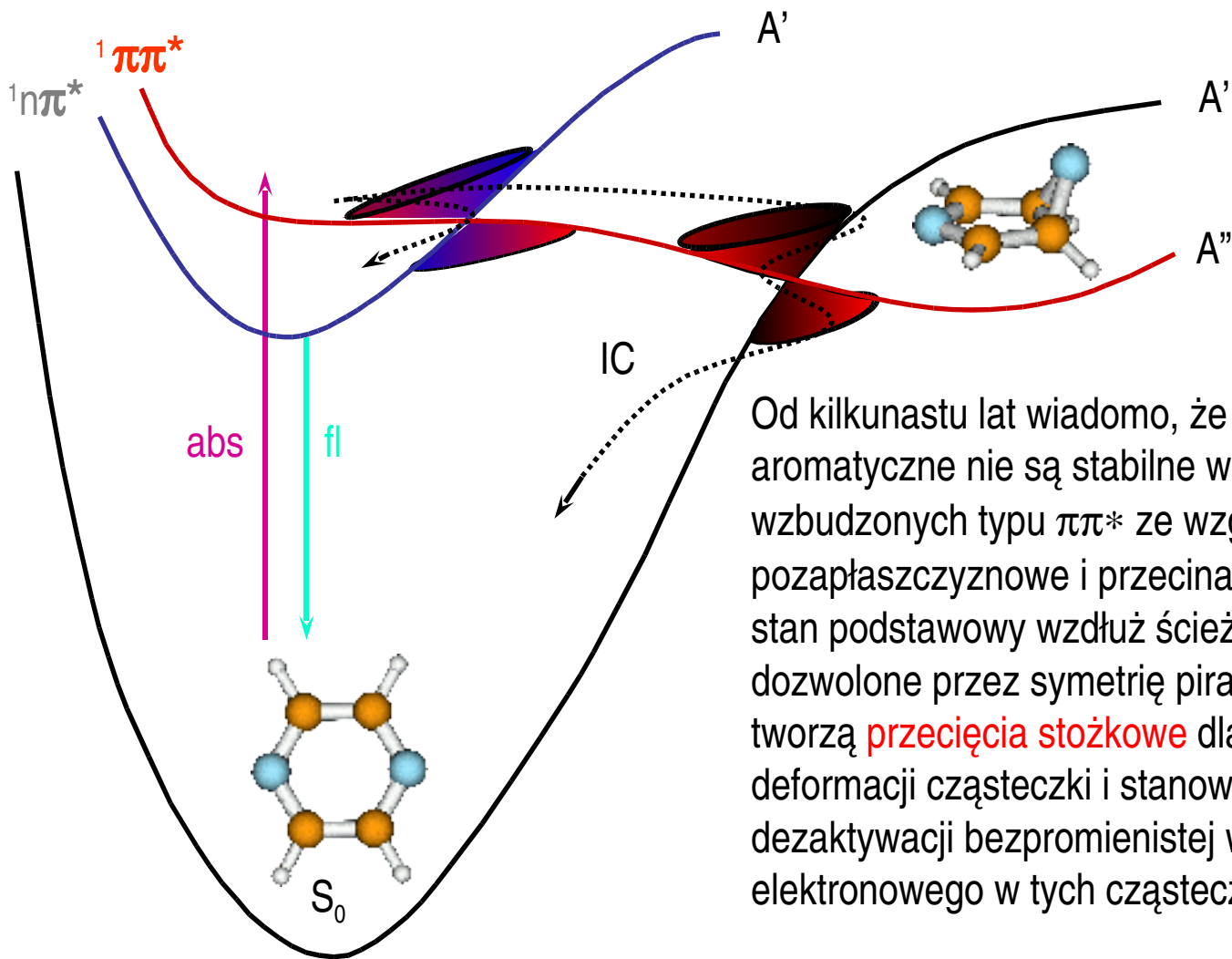
## *Fotofizyka adeniny*

Które z 39 wewnątrzcząsteczkowych oscylacyjnych stopni swobody adeniny są najbardziej istotne ze względu na dostęp do niskoleżącego przecięcia stożkowego ze stanem podstawowym?



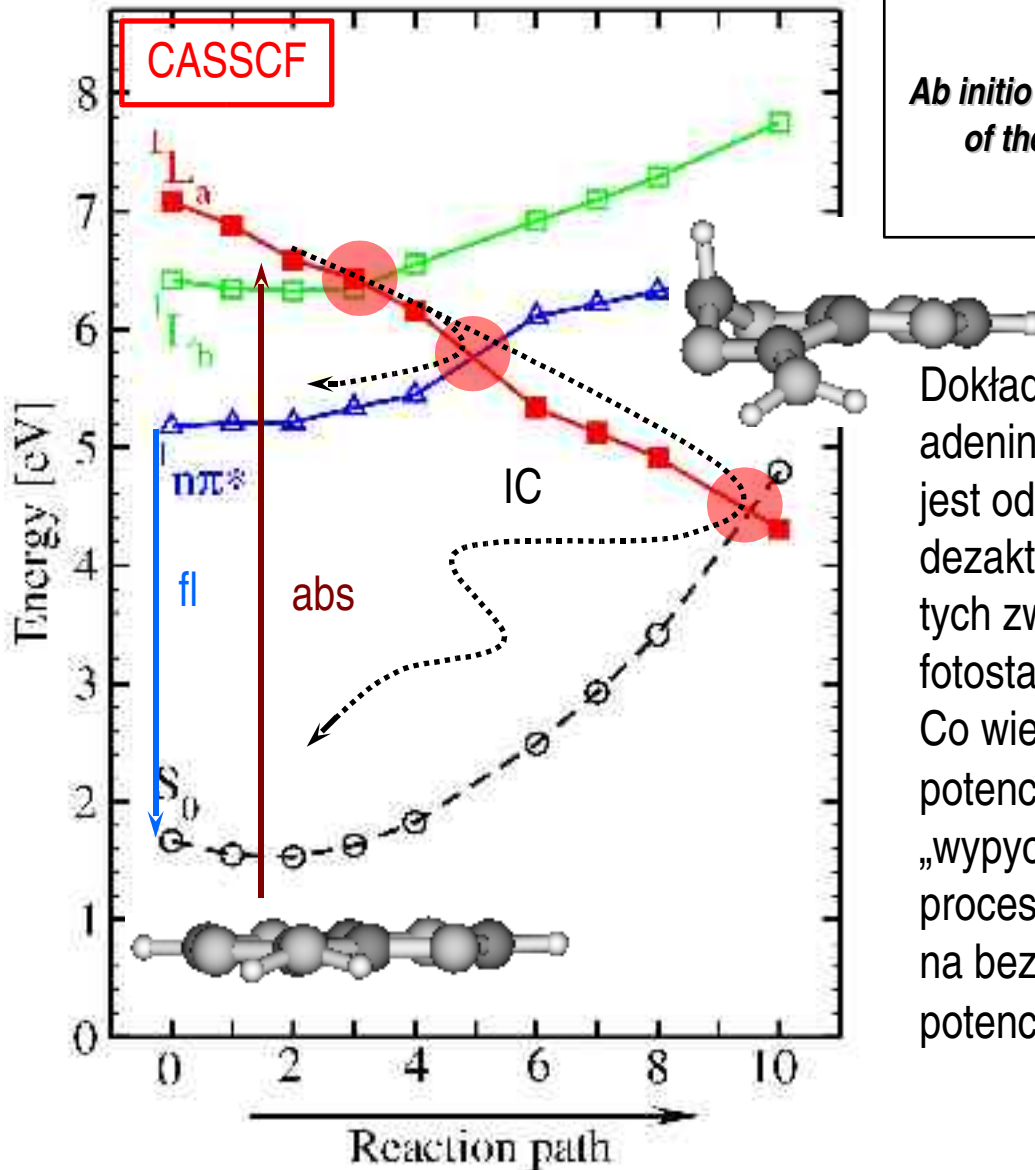
# Fotofizyka pirazyny

Domcke, Sobolewski & Woywod  
*Internal conversion funnel in benzene and pyrazine: adiabatic  
and diabatic representation*  
Chem. Phys. Lett. **203** (1993) 220



Od kilkunastu lat wiadomo, że pierścienie (hetero) aromatyczne nie są stabilne w najniższych stanach wzbudzonych typu  $\pi\pi^*$  ze względu na deformacje pozapłaszczyznowe i przecinają stan  $n\pi^*$  oraz stan podstawowy wzdłuż ścieżki tej reakcji. Te dozwolone przez symetrię pirazyny przecięcia tworzą **przecięcia stożkowe** dla odpowiednich deformacji cząsteczki i stanowią źródło wydajnej dezaktywacji bezpromienistej wzbudzenia elektronowego w tych cząsteczkach.

# Fotofizyka adeniny



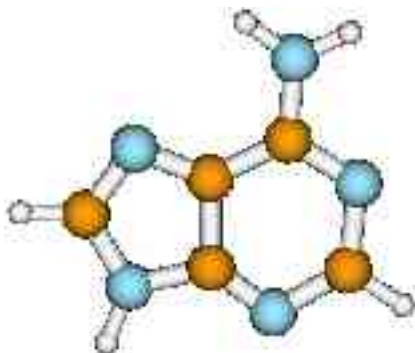
Perun, Sobolewski & Domcke,  
*Ab initio studies on the radiationless decay mechanisms  
of the lowest excited singlet states of 9H-adenine*  
J. Am. Chem. Soc., **127** (2005) 6257

Dokładnie ten sam efekt zachodzi w adeninie (i w pozostałych zasadach DNA) i jest odpowiedzialny za ultra-szybką dezaktywację wzbudzenia elektronowego w tych związkach i co za tym idzie – ich fotostabilność.

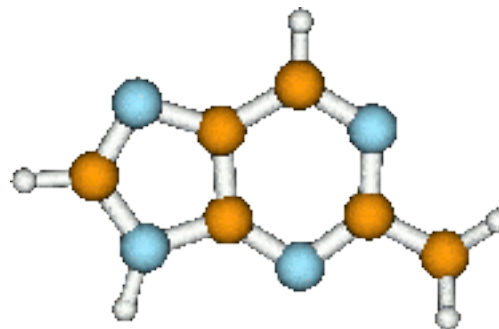
Co więcej, w środowisku wodnym, potencjalnie reaktywny stan  $\pi\pi^*$  jest „wypychany” w zakres wyższych energii i proces dezaktywacji wzbudzenia zachodzi na bezbarierowej powierzchni energii potencjalnej stanów  $\pi\pi^*$  ( $L_a$  i  $L_b$ ).

## Adenina kontra 2-aminopuryna

Okazuje się, że nawet minimalna modyfikacja struktury chemicznej „wybranych” przez Naturę zasad DNA prowadzi do utraty kanału ultraszybkiej dezaktywacji bezpromienistej, a co za tym idzie ich fotostabilności. Sztandarowym przykładem jest 2-aminopuryna - izomer adeniny, w której wydajność kwantowa fluorescencji jest bliska jedności w fazie gazowej, w porównaniu z  $10^{-3}$  adeniny.



adenina

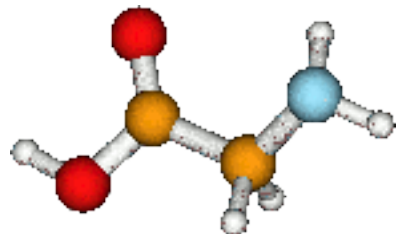


2-aminopuryna

Badania teoretyczne (Perun, Sobolewski, Domcke, Mol. Phys. **104** (2006) 1113) pokazują, że za ten spektakularny efekt odpowiedzialny jest brak nisko leżącego przecięcia stożkowego  $S_1$ - $S_0$  w 2-aminopurynie.

# Aminokwasy: glicyna

forma obojętna

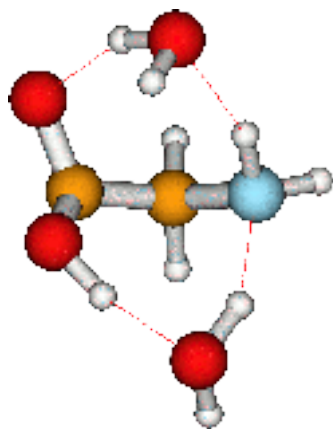


w środowisku  
wodnym

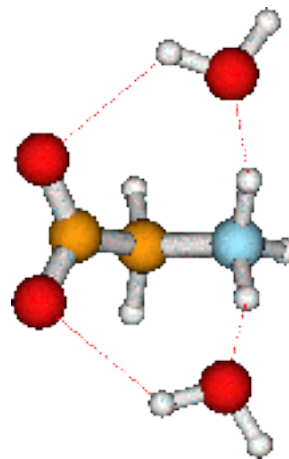
forma zwitterionowa



Formę zwitterionową (niestabilną w fazie gazowej) możemy modelować teoretycznie badając kompleksy aminokwasu z cząsteczkami wody. Np. dwie cząsteczki wody wystarczają do stabilizacji formy zwitterionowej glicyny.



Gly<sup>(0)</sup>-(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>

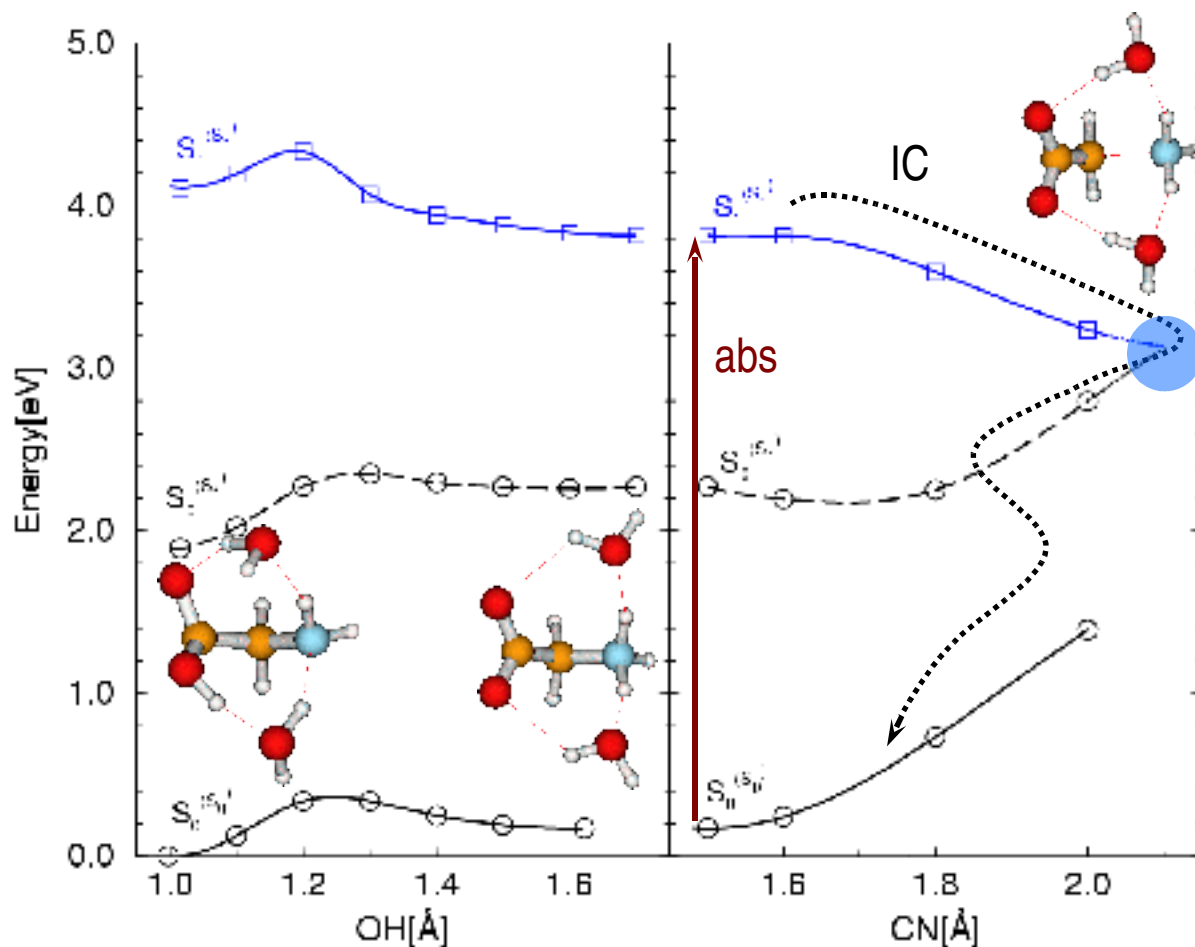


Gly<sup>(z)</sup>-(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>

- węgiel
- azot
- tlen
- wodór



# Fotofizyka Gly-(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>

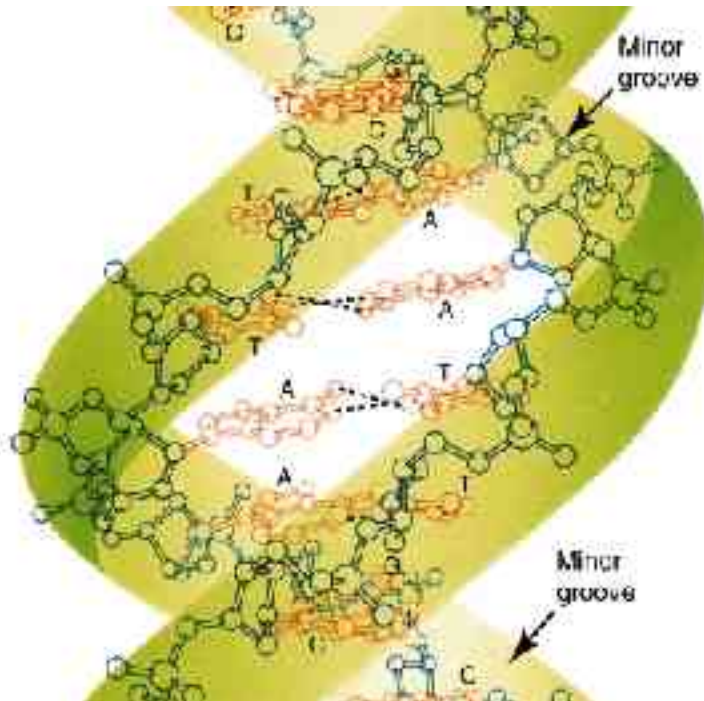


Forma zwitterionowa glicyny posiada bezbarierowy dostęp do przecięcia stożkowego S<sub>1</sub>-S<sub>0</sub> wzdłuż ścieżki reakcji „zaniechanego” odłączania grupy NH<sub>3</sub> (niebieskie kula na rysunku). Mechanizm ten jest uniwersalny dla wszystkich aminokwasów, jako że stanowi „wrodzoną” własność grupy amino-kwasowej i nie zależy od rodzaju podstawnika bocznego R.

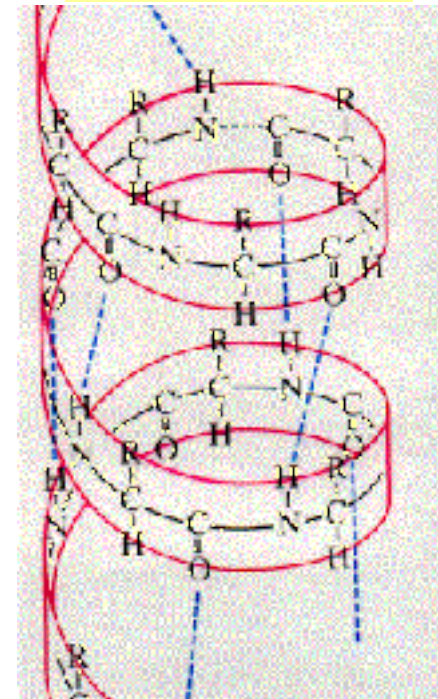
## **Wniosek pierwszy:**

Podstawowe molekularne cegiełki materii ożywionej (**zasady DNA, aminokwasy**) posiadają specyficzne mechanizmy wewnętrzcząsteczkowe gwarantujące ich fotostabilność

## *podwójna helisa DNA*



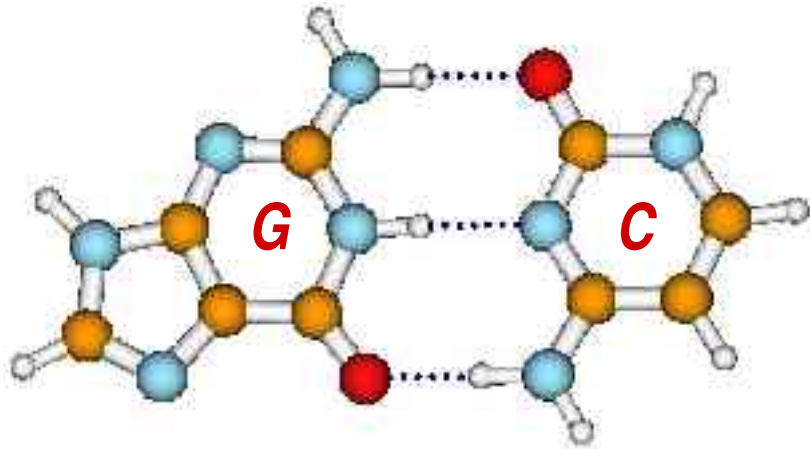
## *$\alpha$ helisa białka*



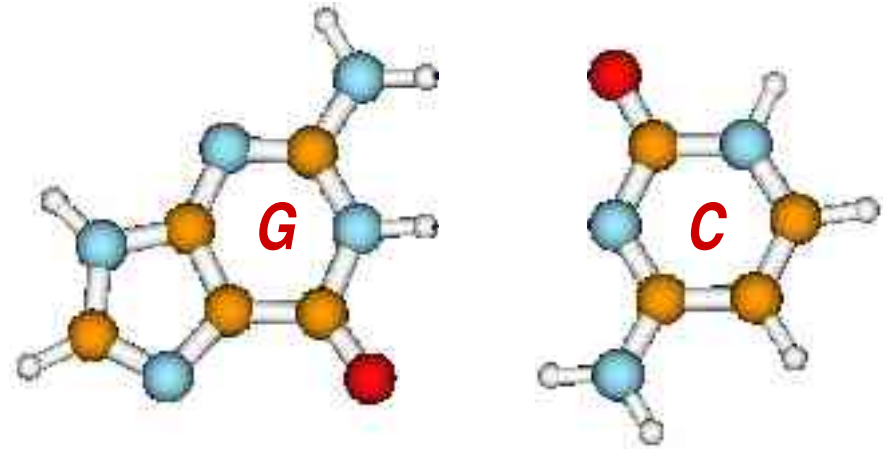
Powstaje naturalne pytanie, czy wbudowanie tych fotostabilnych cegiełek molekularnych (zasad DNA i aminokwasów) w strukturę DNA i białek, nie niszczy ich własności fotofizycznych. Można spodziewać się, że wiązania wodorowe pomiędzy parami zasad i oddziaływania z sąsiednimi parami w DNA utrudnią wychylenia pozapłaszczyznowe w poszczególnych zasadach, natomiast utworzenie łańcucha peptydowego „pozbawia” poszczególne aminokwasy grup aminowych i kwasowych.

## Ważna własność wiązań wodorowych:

*dimer GC*



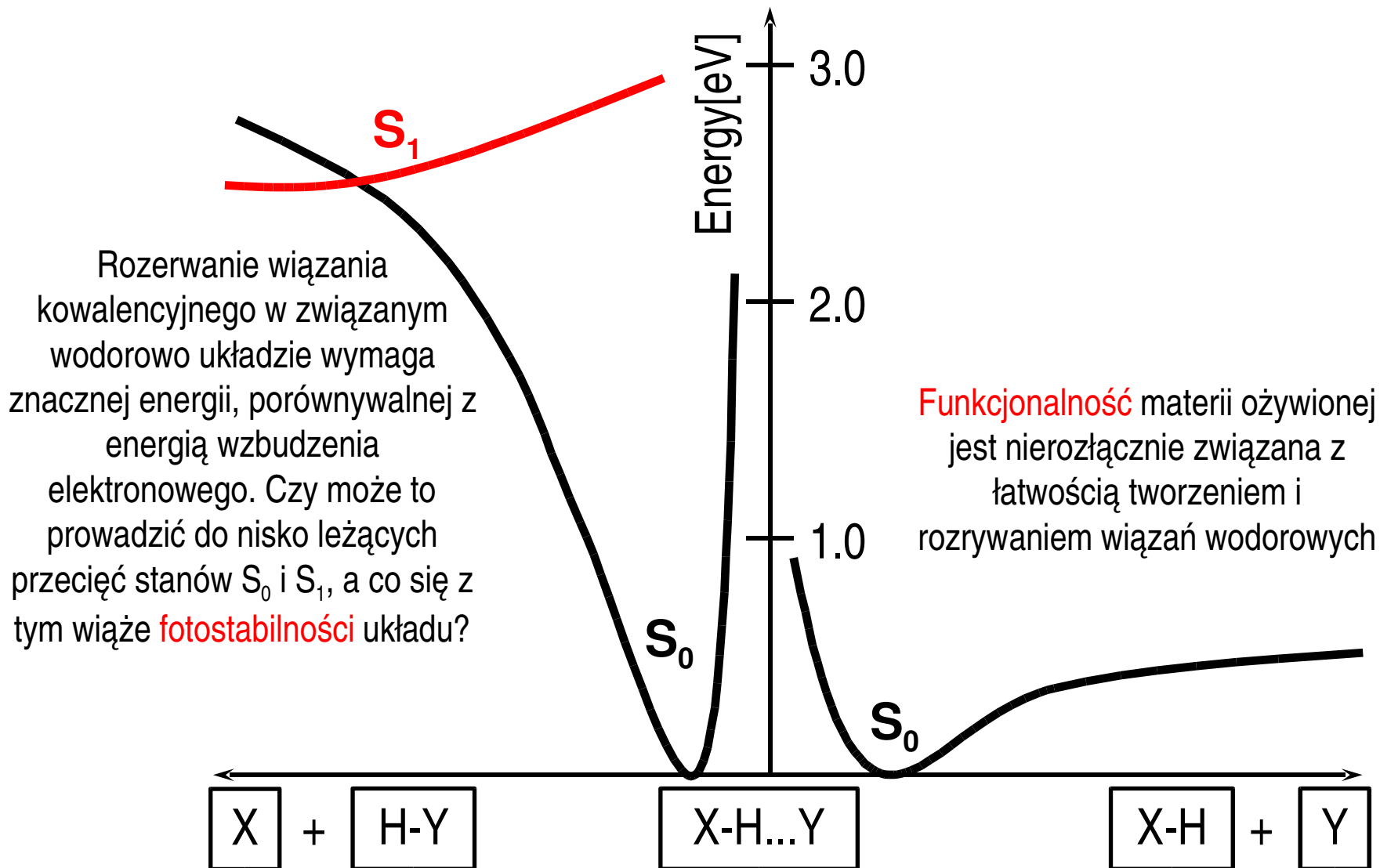
*monomery G i C*



Wiązanie wodorowe posiada szczególną własność: jest stosunkowo trwałe w temperaturze pokojowej, natomiast po jego rozerwaniu związane nim cząsteczki odzyskują swoją tożsamość chemiczną.

wiązanie wodorowe jest więc „klejem” typu **post-it**

# Wiązanie wodorowe, a wiązanie kowalencyjne



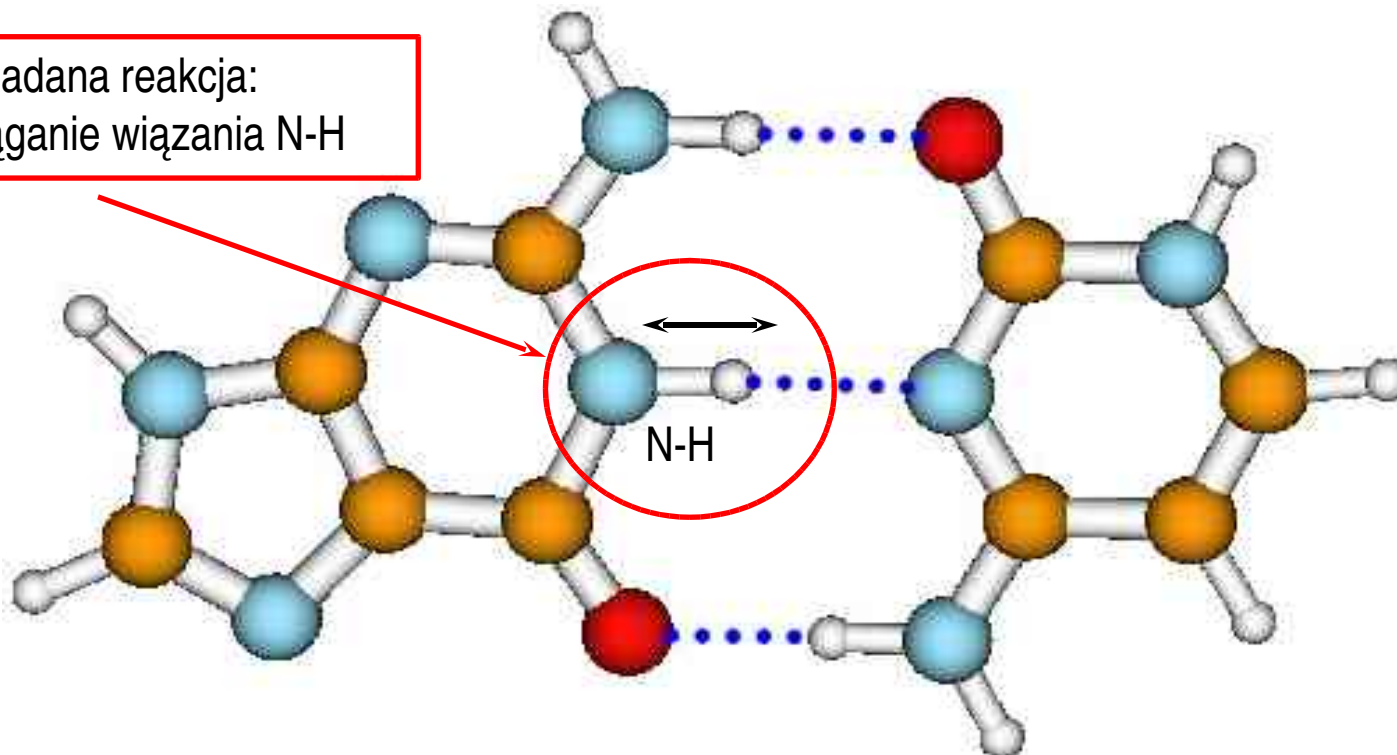


# Fotofizyka pary guanina-cytozyna

guanina

cytozyna

Badana reakcja:  
rozciąganie wiązania N-H

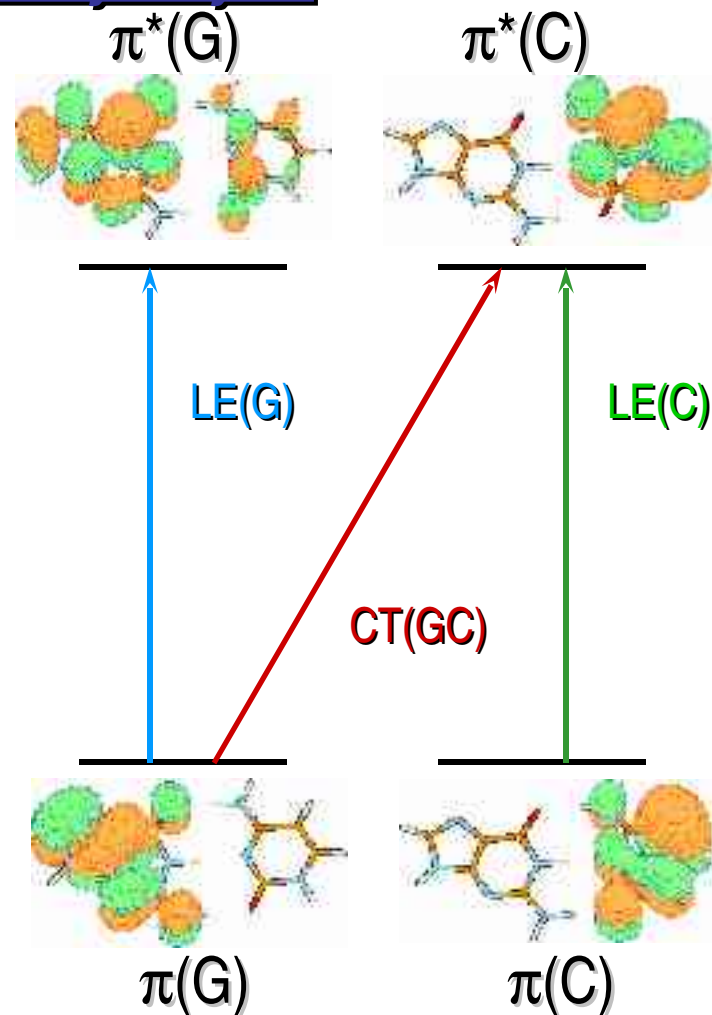
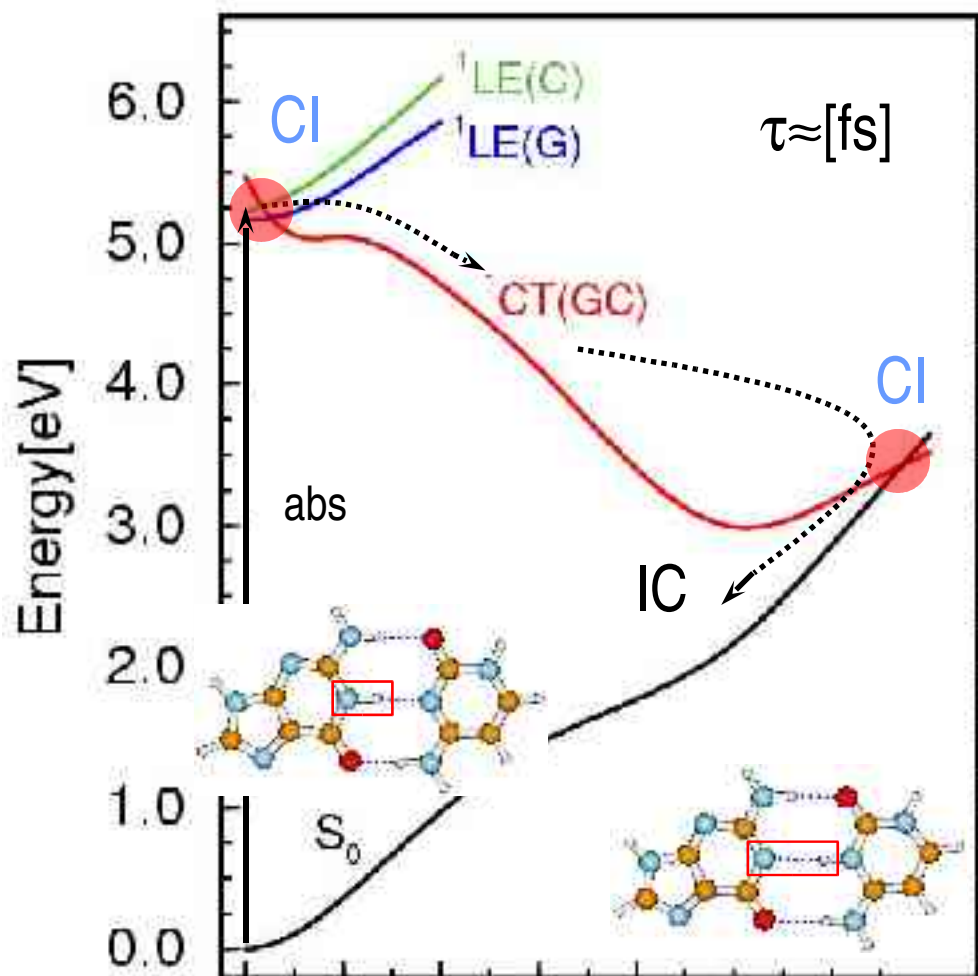


Sobolewski & Domcke

*Ab initio studies on the photophysics of the guanine-cytosine base pair*

*Phys. Chem. Chem. Phys.* 6 (2004) 2763

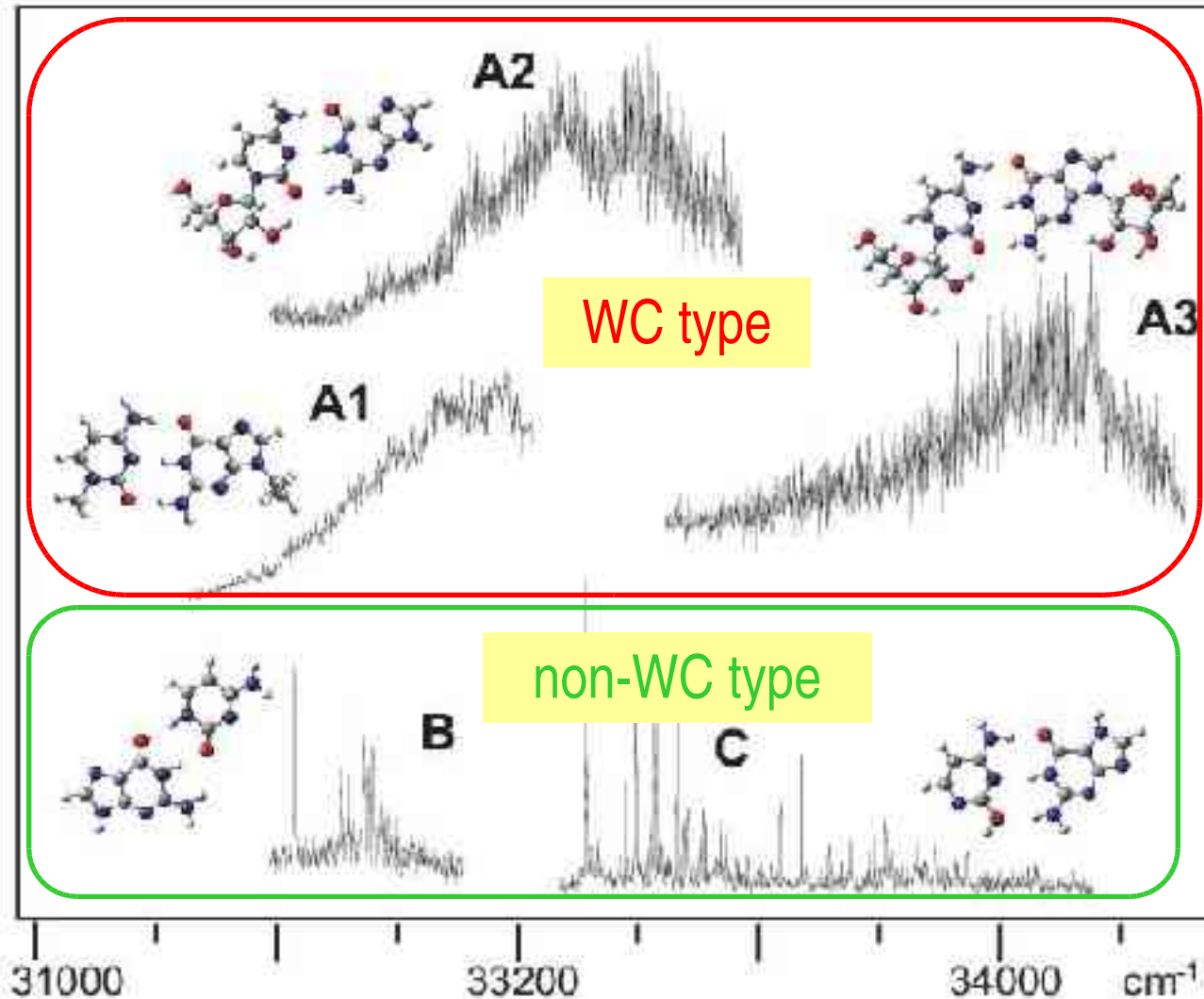
# Fotofizyka pary guanina-cytozyna



**Wniosek:** wzbudzenie pary GC prowadzi bez-barierowo do przecięcia  $S_1$ - $S_0$  wzdłuż współrzędnej reakcji przeniesienia protonu.

Sobolewski & Domcke  
*Ab initio studies on the photophysics of the guanine-cytosine base pair*  
 Phys. Chem. Chem. Phys. 6 (2004) 2763

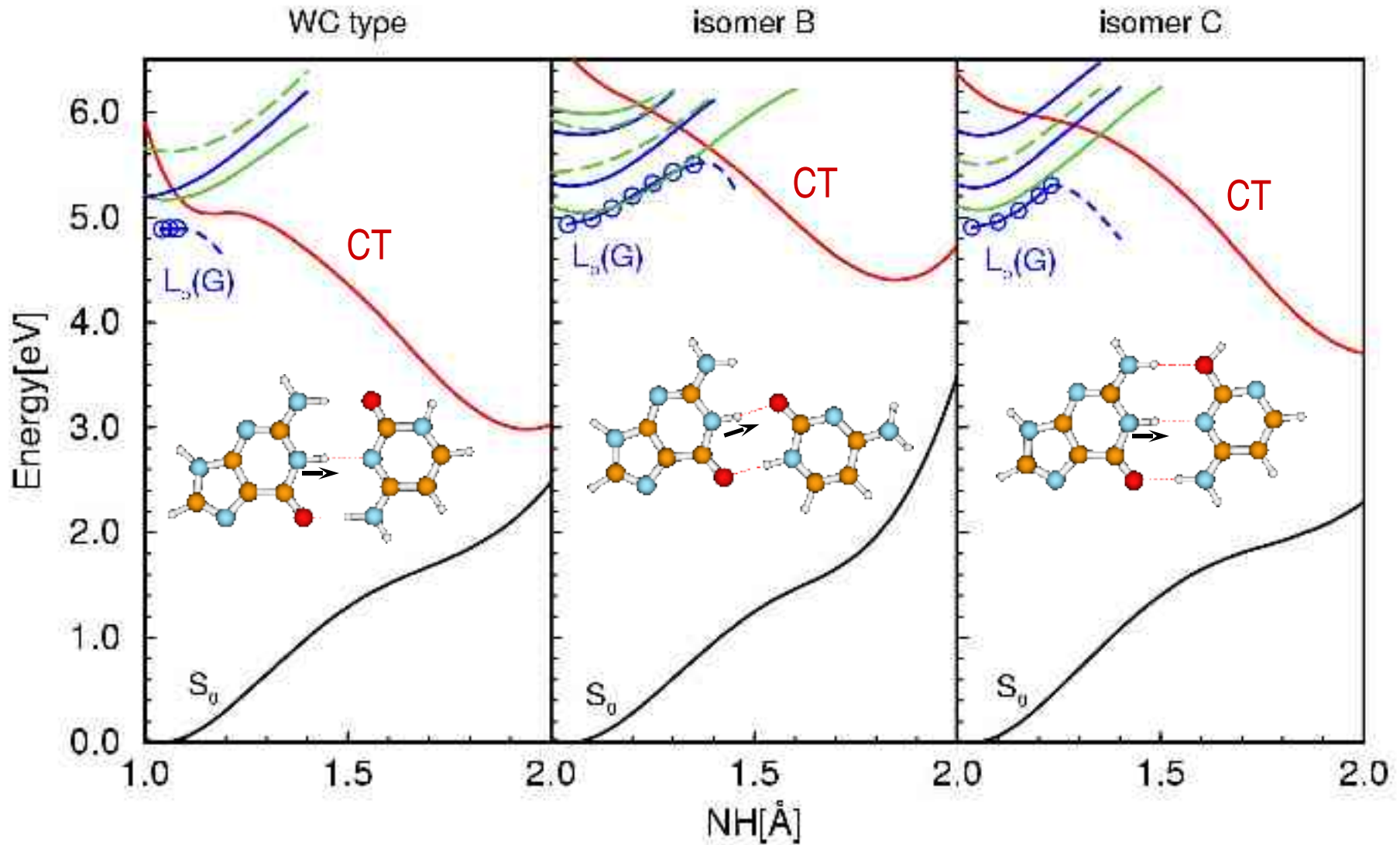
# Fotofizyka par zasad guanina-cytozyna



Przewidywanie teoretyczne ultra-szybkiej dezaktywacji bezpromienistej pary GC omawiane na poprzednim slajdzie zostało rok później potwierdzone doświadczalnie. Co więcej, okazało się, że dotyczy to tylko „wybranej” przez Naturę pary GC typu Watsona-Cricka. Inne obserwowane w doświadczeniu izomery i konformery tej pary takiej własności nie posiadają.

A. Abo-Riziq, L. Grace, E. Nir, M. Kabelec, P. Hobza, M. S. De Vries  
*Photochemical selectivity in guanine-cytosine base-pair structures*  
Proc. Nat. Acad. Sci., 102 (2005) 20

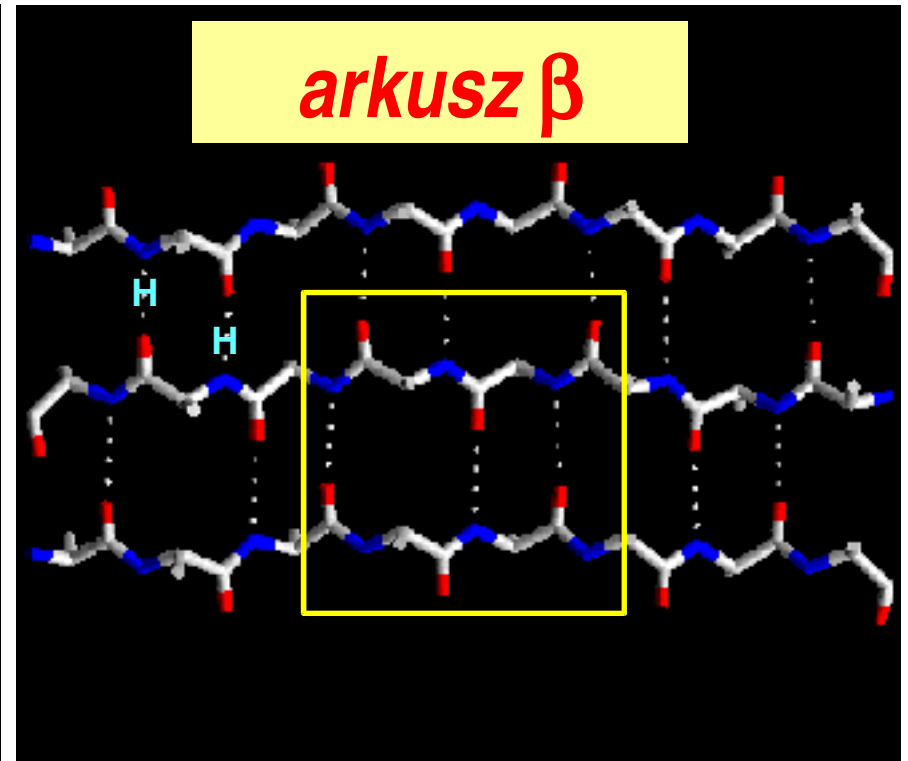
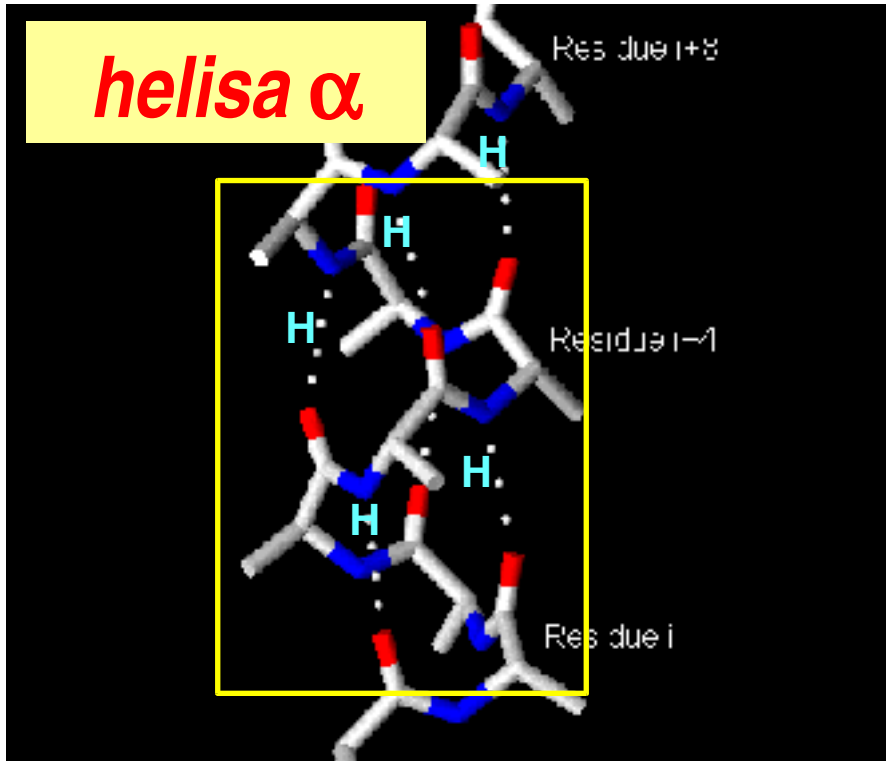
# Fotofizyka par zasad guanina-cytozyna



Sobolewski, Domcke & Hättig  
Proc. Nat. Acad. Sci.  
102 (2005) 17903

W pracy tej „potwierdziliśmy” teoretycznie wynik doświadczalny korelując obserwowane własności par GC z położeniem „reaktywnego” stanu CT (charge-transfer).

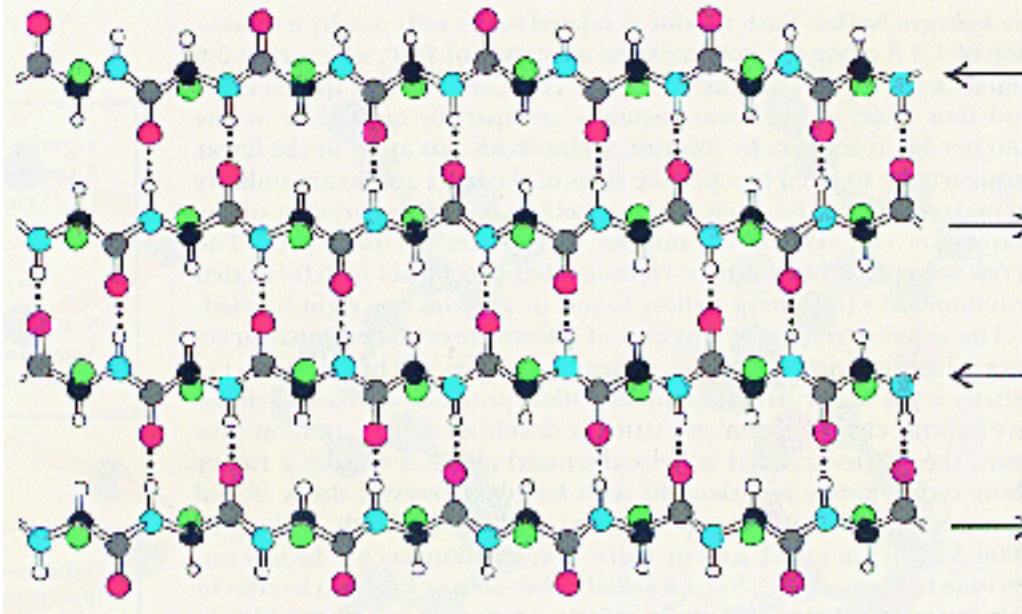
# Drugorzędowa struktura białek



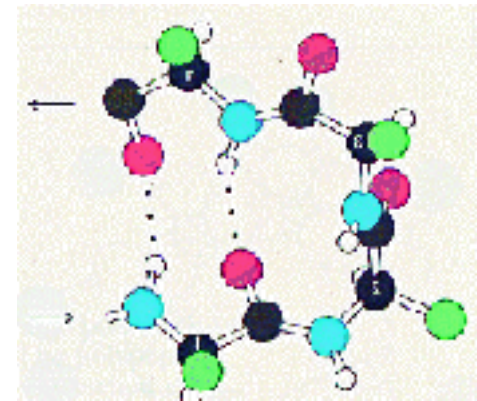
Modelowanie teoretyczne własności fotofizycznych białek jest problemem bardziej złożonym. Małe, „wycięte” kawałki łańcucha peptydowego nie są stabilne, natomiast nie można (jak na razie) przeprowadzić wiarygodnych obliczeń kwantowo-chemicznych dla dużych układów zawierających kilkadziesiąt atomów.



# Arkusz $\beta$



zakrêt  $\beta$



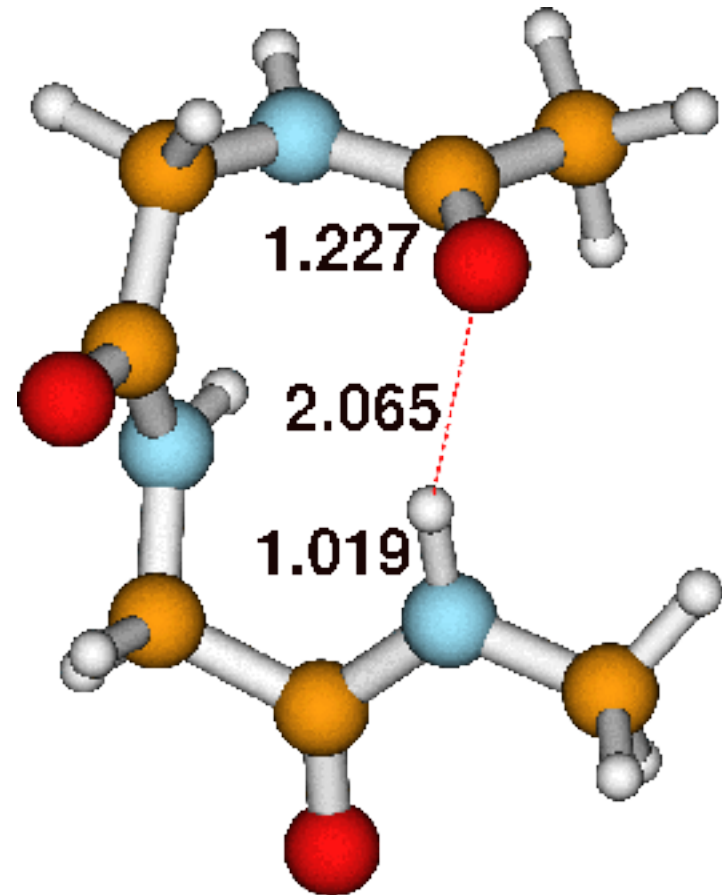
Pewnym rozwiązaniem problemu jest ograniczenie się do modelowania fragmentu obecnego w strukturze arkusza  $\beta$ , tzw. „zakrêt  $\beta$ ”.



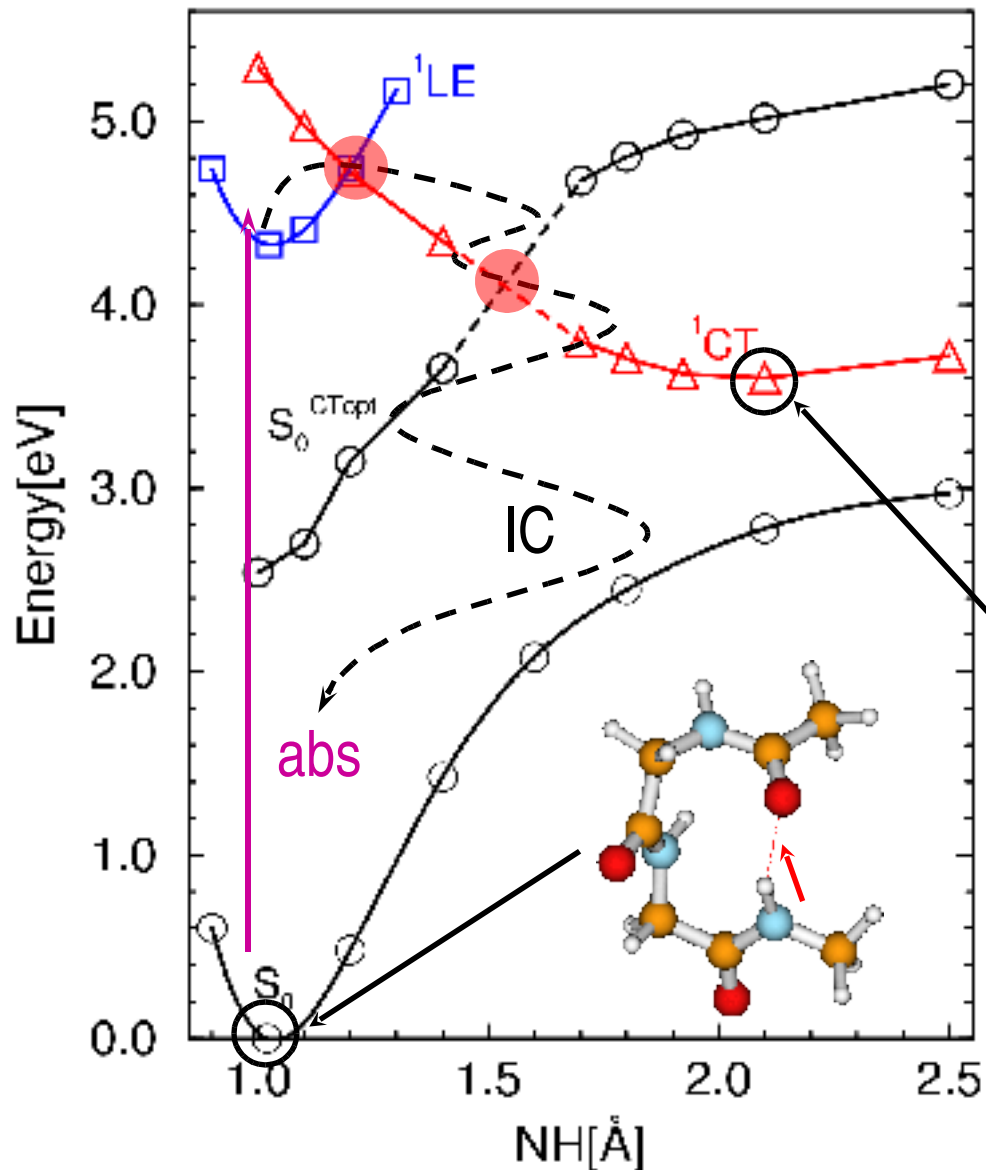
## 3Gly: model zakrętu $\beta$

model zakrętu  $\beta$

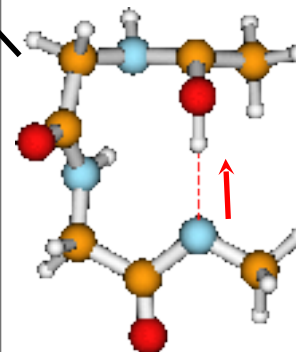
Minimalny układ molekularny modelujący zakręt  $\beta$  stanowi trójpeptyd glicyny (3Gly) zakończony grupami metylowymi.



# Fotofizyka 3Gly:



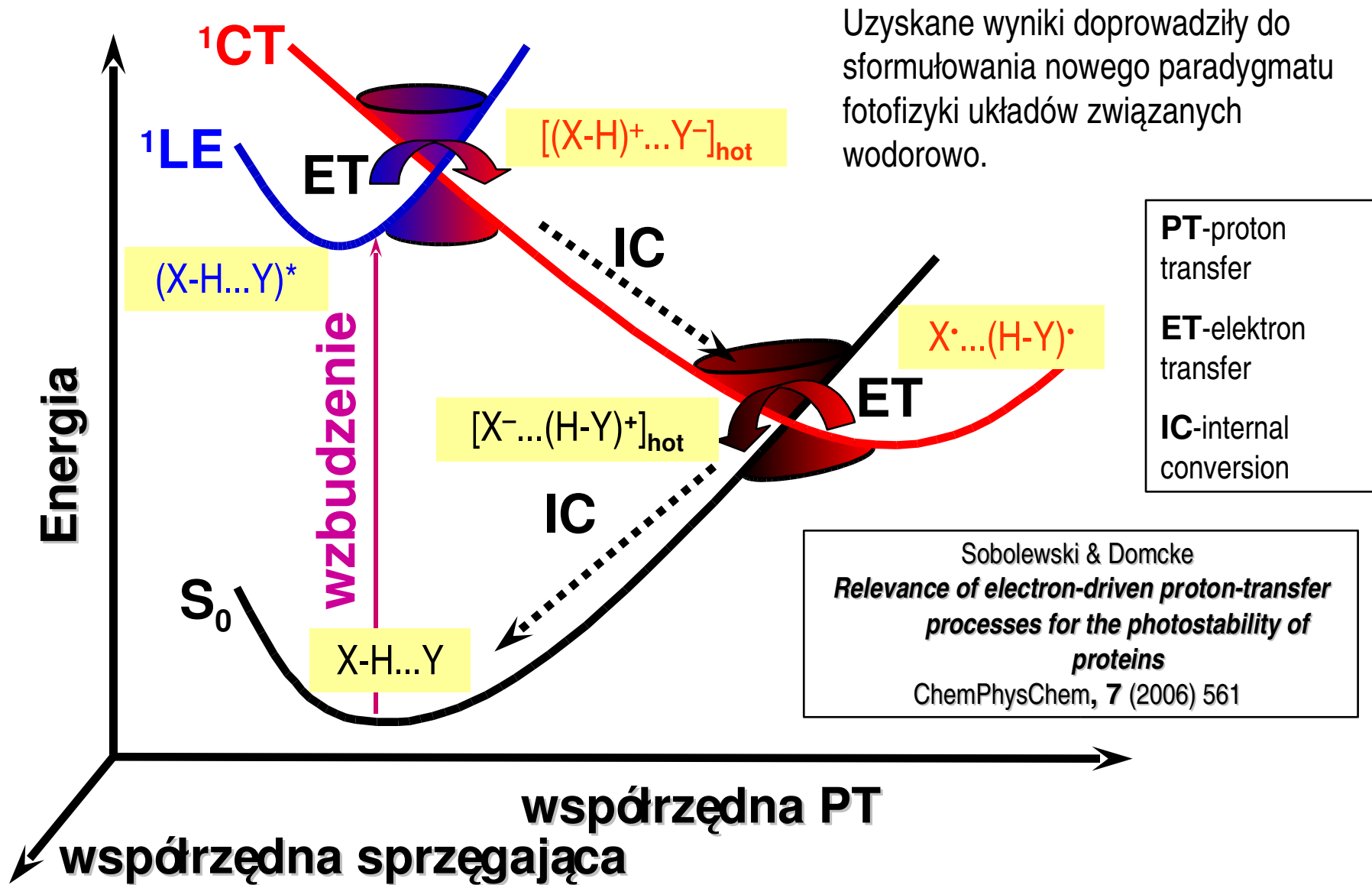
Obliczenia kwantowo-chemiczne przeprowadzone dla tego układu wykazały schemat dezaktywacji wzbudzenia elektronowego jakościowo podobny do otrzymanego dla par zasad CG; dezaktywacja wzbudzenia elektronowego następuje wzdłuż ścieżki reakcji przeniesienia protonu z grupy N-H na C=O.



Sobolewski & Domcke  
**Relevance of electron-driven proton-transfer processes for the photostability of proteins**

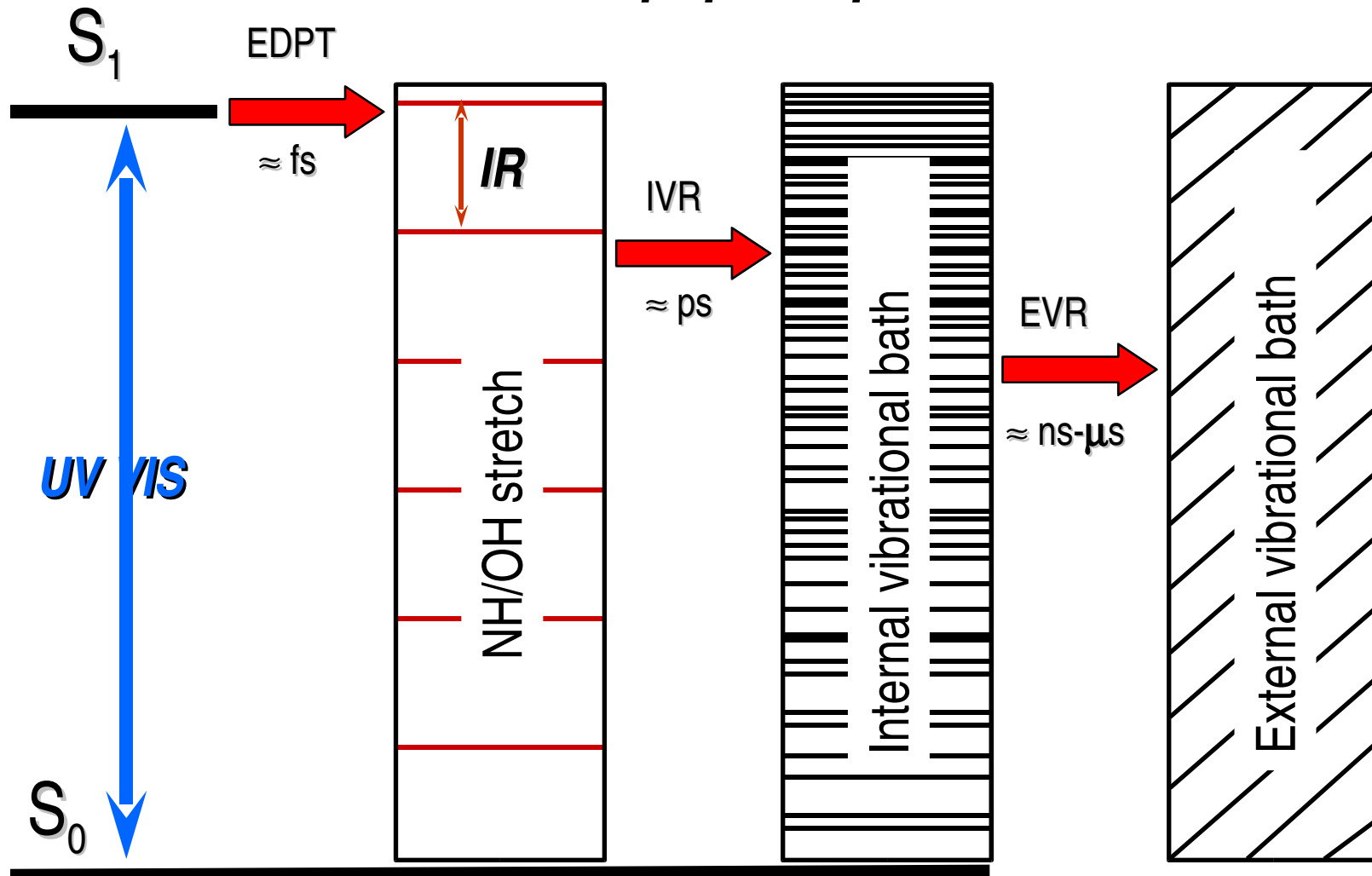
ChemPhysChem, **7** (2006) 561

# Electron-Driven Proton-Transfer proces EDPT



Uzyskane wyniki doprowadziły do sformułowania nowego paradygmatu fotofizyki układów związanych wodorowo.

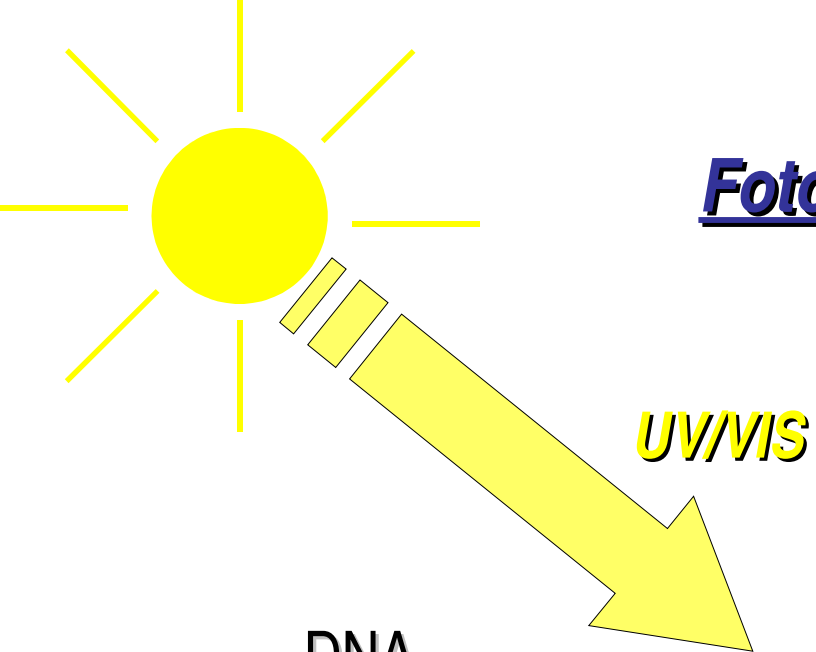
# Fotostabilność poprzez proces **EDPT**



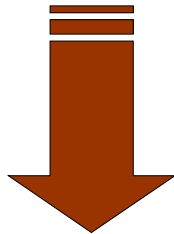
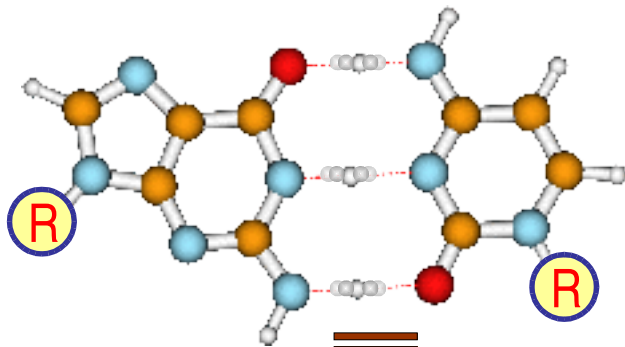
Energia wzbudzenia optycznego jest b. szybko (na skalę  $10^{-15}s$ ) zamieniana na kwanty oscylacji protonu, a następnie przekazywana w postaci ciepła do innych wewnątrz-cząsteczkowych stopni swobody oraz do otoczenia.

# Fotostabilność materii biologicznej

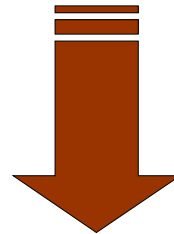
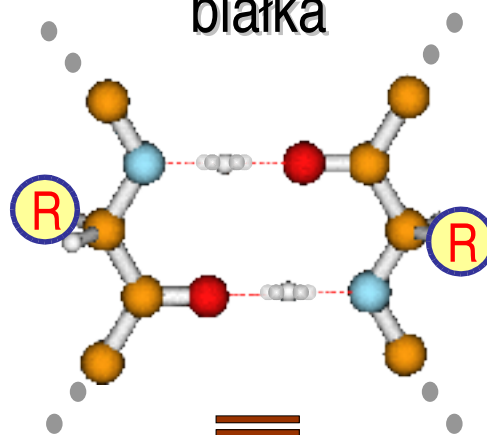
poprzez mechanizm **EDPT**



DNA



białka



**IR**

„Ping-pong” protonów wzdłuż mostków wodorowych stanowi klucz do fotostabilności materii biologicznej

## **Wniosek drugi:**

Wiązanie wodorowe jest kluczowe nie tylko dla funkcjonalności materii biologicznej, lecz również dla jej fotostabilności.