



## UvA-DARE (Digital Academic Repository)

### Dynamics of water interacting with biomolecules

Groot, C.C.M.

**Publication date**  
2017

**License**  
Other

[Link to publication](#)

**Citation for published version (APA):**

Groot, C. C. M. (2017). *Dynamics of water interacting with biomolecules*. [Thesis, externally prepared, Universiteit van Amsterdam].

**General rights**

It is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), other than for strictly personal, individual use, unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

**Disclaimer/Complaints regulations**

If you believe that digital publication of certain material infringes any of your rights or (privacy) interests, please let the Library know, stating your reasons. In case of a legitimate complaint, the Library will make the material inaccessible and/or remove it from the website. Please Ask the Library: <https://uba.uva.nl/en/contact>, or a letter to: Library of the University of Amsterdam, Secretariat, Singel 425, 1012 WP Amsterdam, The Netherlands. You will be contacted as soon as possible.

# SUMMARY

Life as we know it takes place in liquid water. This water is not merely a passive solvent, but plays an active role in many biological processes. Understanding the subtle interplay between water and biomolecules is therefore crucial for understanding the mechanics and chemistry of life. In this thesis, we present a series of spectroscopic experiments that elucidate the hydrogen-bond structure and dynamics of water molecules in solutions of different biologically relevant molecules. As a tool, we use vibrational pump-probe spectroscopy. This technique uses a short, intense infrared pump pulse to excite molecular vibrations that we can follow over time by monitoring the infrared absorption of a second, weaker probe pulse. The main vibrational mode of water, the OH stretch vibration, is very sensitive to the hydrogen-bond strength of water and can therefore supply information on water structure: the OH stretch vibrational frequency can indicate whether water molecules are hydrogen-bonded to other water molecules, to other hydrophilic molecules, or not hydrogen-bonded at all. After excitation by the pump pulse, the water OH stretch vibrations decay back to the ground state on a picosecond ( $10^{-12}$ s) timescale. The timescale of vibrational relaxation can provide structural information as well. Furthermore, by exciting at different frequencies we can probe the typical timescale of structural fluctuations of the dynamical water hydrogen-bond network and explore the coupling between different vibrations. Finally, by exploiting the polarization-dependence of the pump-probe signal, we can measure the rate of water reorientation.

**WATER DYNAMICS IN SUGAR SOLUTIONS** In a first series of experiments, we investigated the water reorientation dynamics in aqueous sugar solutions. Sugars are an important class of biomolecules, serving for example as energy source, signalling group, or stabilizing osmolyte of proteins under environmental stress conditions. This latter property is still not fully understood, though it has been hypothesized that sugars stabilize proteins indirectly, via the water solvent. We find that the water reorientation dynamics in a sugar solution of a particular concentration can be described by a single reorientation time constant. With increasing sugar concentration, the water reorientation time constant increases from 2.5 picoseconds to a value of about 15 picoseconds. Compared to other small solutes, the influence of sugars on the dynamics of water is relatively long-ranged, and involves collective structural effects. These results are in line with an indirect protein stabilization mechanism of sugars via the water solvent.

**WATER DYNAMICS AT A PROTEIN SURFACE** Secondly, we focused on the water reorientation dynamics in solutions of globular proteins at different degrees of

unfolding. Proteins perform specific biological functions that strongly depend on their three-dimensional folded structure that in turn is influenced by the interaction between the protein and the water solvent. We find that a fraction of the water molecules is strongly slowed down by their interaction with the protein surface. The slow water fraction is a measure of the amount of water-exposed surface. In the process of urea-induced protein unfolding, we observe that the water-exposed surface increases by almost 50%, before the protein secondary structure is affected. This indicates that protein unfolding starts with the protein structure becoming less tight, thereby allowing water to enter.

**HYDRATION OF ANTIFREEZE GLYCOPROTEINS** A special class of proteins are the antifreeze glycoproteins (AFGPs) that enable the survival of arctic fish by inhibiting the growth of ice crystals. The molecular mechanism of antifreeze protection is still unclear. We measured the water reorientation dynamics in solutions of AFGPs, and find that a fraction of the water molecules is strongly slowed down. The fraction of slow water molecules scales with the size and concentration of AFGP, and is comparable to the fraction of slow water observed for non-antifreeze proteins, both at room temperature and close to biologically working temperatures. We find that inhibiting AFGP antifreeze activity using borate buffer induces no changes in the dynamics of water hydrating the AFGP. At the same time, borate induces gel formation by forming cross-links between the AFGP sugar groups. Our findings support a local mechanism in which the sugar unit of AFGP forms the active ice-binding site.

**WATER MOLECULES IN TRIGLYCERIDE OILS** The last series of experiments described in this thesis focuses on the hydrogen-bond structure and dynamics of water in triglyceride oils. Triglycerides are crucial for metabolic functions and are used in daily life as foods, pharmaceuticals, cosmetics and raw material for biodiesel. Even though triglycerides are considerably hydrophobic, small amounts of water can accumulate in the oil. We find that these water molecules form several stable species that do not interconvert on the 20 picosecond timescale of the experiment: waters with a single strong hydrogen bond to the triglyceride, waters with two weaker hydrogen bonds to the triglycerides, and water clusters. The water molecules with two weaker hydrogen bonds to the triglyceride correspond to a single, specific hydrogen-bond configuration; these molecules likely bridge the carbonyl groups of adjacent triglyceride molecules, which can have a large influence on the properties of triglyceride oils.

**WATER MOLECULES IN TRIGLYCERIDE OILS - PROBING THE CARBONYL STRETCH VIBRATION** We further investigated the interaction between water and triglyceride oil by studying the transient response of the carbonyl stretch vibration of the triglycerides. We find that the hydrogen-bond formation between a water molecule and the carbonyl group of the triglyceride leads to a frequency downshift of the absorption of the carbonyl stretch vibration. This hydrogen-bond formation affects the transient response of the carbonyl stretch vibration, and slightly speeds up the vibrational relaxation. We also observe that the relaxation rate strongly varies with frequency, and that the C=O

---

vibrations rapidly exchange vibrational energy as a result of Förster energy transfer.



# SAMENVATTING

Leven speelt zich af in vloeibaar water. Het menselijk lichaam bestaat bijvoorbeeld voor gemiddeld 65% uit water, en de meeste levende wezens kunnen niet zonder. Water lijkt zelfs zo essentieel voor leven dat astrofysici enthousiast worden wanneer er ergens vloeibaar water wordt gevonden in het universum, want waar water is, kan ook leven zijn... Zeker is dat water niet een passief oplosmiddel is, maar een actieve rol speelt in veel biologische processen. Gedetailleerde kennis van de subtiele wisselwerking tussen water en biomoleculen is dus cruciaal om we de mechanica en scheikunde van levende wezens te kunnen begrijpen. In dit proefschrift presenteren we een serie spectroscopische experimenten die de structuur en dynamica ontrafelen van water moleculen in oplossingen van verschillende biologisch relevante moleculen. Ons experimenteel gereedschap is vibrationele pomp-probe spectroscopie. In deze vorm van spectroscopie, exciteert een korte, intense infrarode lichtpuls (de pomp) moleculaire vibraties, die we vervolgens kunnen bekijken door de infrarood absorptie van een tweede, zwakkere lichtpuls (de probe) te meten. De voornaamste vibratie van water, de water zuurstof-waterstof (OH) strek vibratie, is erg gevoelig voor de waterstofbrugsterkte van water en kan als zodanig informatie verschaffen over de structuur van water: de frequentie van de OH strek vibratie kan bijvoorbeeld aangeven of water moleculen waterstofbruggen vormen met andere water moleculen, met andere hydrofiele moleculen, of dat ze ongebrugd zijn. Na excitatie door de pomp puls vervallen de water OH strek vibraties terug naar de grondtoestand binnen enkele picoseconden ( $10^{-12}$ s). Deze vibratiere-laxatietijd kan ook structurele informatie verschaffen. Bovendien is het mogelijk om de typische tijdschaal van structurele fluctuaties te meten en de koppeling tussen moleculen te bekijken door te exciteren bij verschillende pompfrequen-ties. Tenslotte kunnen we de water oriëntatiesnelheid bepalen door gebruik te maken van de polarisatieafhankelijkheid van het pomp-probe signaal.

**WATERDYNAMICA IN SUIKEROPLOSSINGEN** De eerste experimenten beschreven in dit proefschrift richten zich op de oriëntatiesnelheid van watermoleculen in suikeroplossingen. Suikers zijn een belangrijke groep biomoleculen die dienst doen als energiebron, signaalgroep of stabiliserende factor voor de structuur van eiwitten. Deze laatste eigenschap is nog steeds niet volledig begrepen, maar vermoedt wordt dat suikers de structuur van eiwitten indirect stabiliseren door de eigenschappen van het omringende water te veranderen. We vinden dat de water oriëntatiesnelheid in een suikeroplossing van een bepaalde concentratie te beschrijven is met een enkele tijdsconstante. Deze tijdsconstante neemt toe met toenemende suikerconcentratie, van 2.5 picoseconden tot een waarde van 15 picoseconden. In vergelijking met andere kleine moleculen beïnvloeden suikers

de dynamica van water over een relatief lange afstand, en spelen collectieve structurele effecten een rol. Deze resultaten zijn consistent met een indirect stabilisatie-effect van suikers op eiwitten via het omringende water.

**WATERDYNAMICA AAN HET OPPERVLAK VAN EIWITTEN** Ten tweede richten we ons op de waterdynamica in oplossingen van globulaire eiwitten, waarbij de eiwitten in verschillende mate ontvouwen zijn. Eiwitten verrichten specifieke biologische taken die sterk afhangen van de driedimensionale gevouwen eiwitstructuur, die op zijn beurt weer afhangt van de interactie tussen het eiwit en het omringende water. We observeren dat een fractie van de water moleculen in eiwitoplossingen sterk wordt vertraagd door hun interactie met het eiwitoppervlak. De fractie langzame watermoleculen is een maat voor de hoeveelheid eiwitoppervlak dat aan water wordt blootgesteld. Wanneer het eiwit wordt ontvouwen met behulp van ureum, observeren we een toename van het blootgestelde oppervlak van bijna 50%, terwijl de secundaire eiwitstructuur intact blijft. Hieruit volgt dat het ontvouwen van eiwitten begint met het losser worden van de eiwitstructuur en het binnendringen van water.

**HYDRATIE VAN ANTIVRIESGLYCOPROTEÏNEN** Een speciale klasse van eiwitten zijn de antivriesglycoproteïnen (AVGPs). Deze eiwitten verhinderen dat ijskristallen kunnen groeien, waardoor ze ervoor zorgen dat vissen in de poolcirkel kunnen overleven. Het moleculaire mechanisme van deze antivriesbescherming is niet bekend. We meten de waterdynamica in oplossingen van AVGPs, en constateren dat een fractie van de watermoleculen sterk is vertraagd. De fractie langzame watermoleculen schaalt met de concentratie en grootte van de AVGPs en is vergelijkbaar met de fractie langzame watermoleculen voor eiwitten zonder antivrieswerking, zowel bij kamertemperatuur als bij biologisch relevante temperaturen vlak bij het vriespunt. We observeren dat het toevoegen van boraat, dat de antivriesactiviteit remt, geen effect heeft op de waterdynamica rondom AVGPs. Boraat zorgt er wel voor dat de oplossing een gel vormt, doordat boraat moleculen bruggen vormen tussen de suikergroepen van de AVGPs. Onze bevindingen wijzen op een antivriesmechanisme waarbij het vooral de suikergroepen van AVGPs zijn die zich binden aan het ijs.

**WATERMOLECULEN IN TRIGLYCERIDE OLIËN** De laatste serie experimenten beschreven in dit proefschrift richten zich op de waterstofbrugstructuur en dynamica van water in triglyceride oliën. Triglyceriden zijn cruciaal voor metabolisme en worden in het dagelijks leven gebruikt in voedsel, medicijnen, cosmetica en als grondstof voor biobrandstof. Hoewel triglyceriden sterk hydrofoob zijn, kunnen zich toch kleine hoeveelheden water in de olie ophopen. We observeren dat deze watermoleculen verschillende stabiele structuren vormen: we identificeren watermoleculen met een enkele sterke waterstofbrug naar de triglyceride, watermoleculen met twee zwakkere waterstofbruggen naar de triglyceriden en water clusters. De watermoleculen met twee zwakkere waterstofbruggen naar de triglyceriden vormen een enkele, specifieke waterstofbrugconfiguratie: deze moleculen overbruggen waarschijnlijk de carbonylgroepen van aangrenzende triglyceridemoleculen en zouden zo een groot effect kunnen

---

hebben op de eigenschappen van triglyceride oliën.

WATERMOLECULEN IN TRIGLYCERIDE OLIËN - OBSERVATIE VIA DE CARBONYL STREK VIBRATIE We hebben de interactie tussen water en triglyceride oliën in meer detail onderzocht door de transiente respons van de C=O strek vibratie van de triglyceriden te bestuderen. We nemen waar dat de waterstofbrugformatie tussen een watermolecuul en een triglyceride C=O groep leidt tot een verschuiving van de absorptie van de C=O strek vibratie naar lagere frequenties. Deze waterstofbrugformatie leidt tot een kleine versnelling van de vibratierelaxatie. We vinden dat de vibratierelaxatie sterk afhankelijk is van de frequentie van de C=O vibratie, en dat de C=O vibraties energie uitwisselen als gevolg van hun dipool-dipool (Förster) interacties.