

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова
Химический факультет

На правах рукописи



Хренова Мария Григорьевна

**Интерпретация и прогнозирование свойств белковых систем методами
суперкомпьютерного молекулярного моделирования**

специальность 02.00.17 – математическая и квантовая химия

диссертация на соискание ученой степени
доктора физико-математических наук

Москва – 2016

Содержание

Введение	5
Глава 1. Методы, компьютерные реализации и характерные примеры	12
1.1. Методы молекулярного моделирования	12
1.1.1. Метод молекулярной механики	12
1.1.2. Методы квантовой химии	14
1.1.3. Комбинированный метод квантовой механики/молекулярной механики	20
1.2. Общая схема решения задач	21
1.3. Гидролиз пенициллина G пенициллинацилазой	22
1.4. Светособирающая антенна LH1 бактериальной фотосистемы	32
1.5. Результаты главы 1	38
Глава 2. Цикл моделирования «интерпретация – прогноз» на примере матричной металлопротеиназы 2	39
2.1. Реакция гидролиза модельного олигопептида в активном центре MMP-2	40
2.1.1. Литературные данные	40
2.1.2. Профиль потенциальной энергии реакции гидролиза модельного субстрата в активном центре MMP-2	47
2.1.3. Влияние начальной структуры на профиль реакции	51
2.1.4. Влияние размера сольватной оболочки на профиль реакции	54
2.1.5. Выбор протокола расчета ППЭ	57
2.1.6. Профиль потенциальной энергии реакции гидролиза модельного олигопептида в активном центре MMP-2 с мутацией E116D	63
2.1.7. Профили свободной энергии стадии нуклеофильной атаки	66
2.1.8. Выход продуктов реакции	69
2.1.9. Сравнение полученных результатов с экспериментальными данными	70
2.2. Ингибирование MMP-2	71
2.2.1. Ингибитор с кетометиленовым аналогом субстрата: расчеты и эксперимент	71
2.2.2. Ингибиторы с мотивом цинкового пальца	73
2.2.3. Производные APP-IP: расчеты и эксперимент	81
2.3. Результаты главы 2	85
Глава 3. Реакция гидролиза ГТФ в комплексах малых ГТФаз с белками ускорителями: механизм и способы его верификации	86
3.1. Гидролиз ГТФ в белковом комплексе Ras-GAP	87
3.1.1. Литературные данные	87
3.1.2. Механизм гидролиза ГТФ в белковом комплексе Ras-GAP	91
3.1.3. Сопоставление механизма реакции с экспериментальными данными	96

3.1.4. Замена каталитического глутамина на нитро-аналог	99
3.1.5. Влияние точечных мутаций на динамику фермент-субстратного комплекса...	102
3.1.6. Колебательные спектры с временным разрешением	105
3.2. Гидролиз ГТФ в белковом комплексе Arl3-RP2.....	110
3.2.1. Механизм гидролиза ГТФ в белковом комплексе Arl3-RP2.....	110
3.2.2. Колебательные спектры с временным разрешением	116
3.3. Результаты главы 3	117
Глава 4. Флавин-содержащие рецепторы: фотоцикл и новые флуоресцентные белки	
.....	119
4.1. Фотохимические превращения в BLUF доменах	120
4.1.1. Литературные данные	120
4.1.2. Рецепторное и сигнальное состояния в фотоцикле AppA.....	124
4.1.3. Механизм перехода в сигнальное состояние	134
4.1.4. Механизм восстановления рецепторного состояния	141
4.1.5. Влияние мутации Q63E.....	144
4.2. Механизм передачи сигнала от фоторецепторного BLUF домена к каталитическому EAL домену	146
4.2.1. Обзор литературы.....	146
4.2.2. Нативная форма белка BlrP1	147
4.2.3. Мутанты белка BlrP1	154
4.3. Спектры поглощения и флуоресценции флавина в газовой фазе и растворе.....	155
4.4. Флуоресцентный белок iLOV и его мутантная форма	157
4.4.1. Литературные данные	157
4.4.2. Фотофизические свойства iLOV	158
4.4.3. Мутантная форма iLOV Q489K	160
4.5. Результаты главы 4.....	162
Глава 5. FRET сенсоры на основе флуоресцентных белков: изучение и разработка	
улучшенных вариантов	164
5.1. Ориентационные факторы компонентов FRET сенсоров	166
5.1.1. Структура и свойства TagRFP	167
5.1.2. Структуры и спектры поглощения KFP и GFP.....	170
5.1.3. Ориентационные факторы в системе TagRFP-L23-KFP	172
5.1.4. Влияние ориентационного фактора в димере KillerRed	173
5.2. Оптимизация структуры связывающего пептида	174
5.3. Изучение характеристик FRET сенсора с тербий-связывающим пептидом	178
5.4. Изомеризация хромофора в хромопротеинах KFP и asFP595	180
5.5. Фотостабильность хромофора в зеленом флуоресцентном белке.....	183

5.5.1. СТТС-подобные состояния в кластерных моделях	185
5.5.2. Влияние водородных связей с фенильным фрагментом хромофора на его электронные свойства	193
5.6. Результаты главы 5	196
Основные результаты и выводы	197
Список иллюстраций.....	199
Список таблиц.....	213
Список литературы.....	216

Введение

Актуальность темы. Важной задачей современного молекулярного моделирования является прогнозирование свойств биохимических систем, прежде всего, белковых макромолекул, и процессов, протекающих в этих системах. С развитием суперкомпьютерных технологий появляются возможности моделировать ферменты и фоторецепторные белки, используя методы квантовой теории и в то же время включая в рассмотрение большое число молекулярных групп. Особое значение для реализации данного направления имеет развитие и применение комбинированного метода квантовой механики/молекулярной механики (КМ/ММ), согласно которому наиболее важный фрагмент макромолекулы (активный центр фермента или хромофор-содержащая область фоторецепторного белка) описывается уравнениями квантовой химии, а остальная часть – с помощью классических силовых полей. Для адекватного моделирования КМ часть должна включать не менее 100-200 атомов, ММ часть – несколько тысяч атомов. В настоящее время на смену первоначальному этапу исследования процессов в белках методом КМ/ММ на основе простых приближений квантовой химии в КМ подсистемах приходит этап использования более точных квантово-химических методов, позволяющих претендовать на количественное воспроизведение энергетических профилей реакций в белках как в основном, так и в возбужденном электронном состоянии. Новым направлением молекулярно-динамического моделирования, традиционно применяемого для биохимических систем, является использование потенциалов КМ/ММ для расчетов энергий и сил при анализе траекторий частиц. Численное решение уравнений механики частиц, описывающих поведение белковых макромолекул с необходимой точностью, может быть выполнено с использованием параллельных компьютерных алгоритмов, что обеспечивает разумное время достижения результатов.

Круг объектов исследования в данной работе был выбран, принимая во внимание важность и актуальность каждой конкретной задачи, прежде всего, для биомедицинских и биотехнологических приложений, а также необходимость интерпретации современных экспериментальных данных и получения надежных прогнозов свойств соответствующих белков. Ферменты человека семейства

матриксных металлопротеиназ (ММП) отвечают за постоянство состава внеклеточного матрикса. Чрезмерную активацию ММП-2 связывают с развитием процессов метастазирования, артритов, болезни Альцгеймера, что объясняет актуальность задач изучения механизма протеолиза и поиска ингибиторов фермента. Семейство клеточных сигнальных белков ГТФаз, способных связывать и гидролизовать гуанозинтрифосфат (ГТФ), активно исследуется для поиска способов борьбы с онкологическими заболеваниями и выяснения роли молекулярного полиморфизма ферментов человека. Знание механизма реакции гидролиза пенициллина бактериальным ферментом пенициллинацилазой необходимо для разработки новых эффективных антибиотиков. Среди фоторецепторных систем были выделены флавин-содержащие белки, варианты флуоресцентных белков семейства зеленого флуоресцентного белка, а также компоненты бактериального фотосинтетического центра. Значение флуоресцентных биомаркеров в живых системах трудно переоценить для современных исследований в молекулярной биологии и медицине, однако детали фотофизических превращений в этих системах далеки от полного понимания.

Цель работы – разработать модели и предложить адекватные методы суперкомпьютерного молекулярного моделирования для интерпретации экспериментальных данных и прогнозирования свойств белковых систем с требуемой для опытной проверки точностью, включая: поиск путей ингибирования ферментов на основе механизмов реакций ферментативного катализа; разработку перспективных вариантов фоторецепторных белков для использования в качестве биомаркеров; предсказание структур сложных белковых комплексов.

В работе поставлены и решены следующие **основные задачи**:

- Выбор протоколов расчета, способных описывать экспериментальные данные для рассматриваемых объектов и прогнозировать свойства новых белковых систем с требуемой точностью.
- Разработка ингибиторов матриксной металлопротеиназы ММП-2 на основе олигопептидов и их миметиков по результатам моделирования механизма протеолиза в активном центре фермента.

- Детализация механизма гидролиза гуанозинтрифосфата в комплексах малых ГТФаз с белками-ускорителями.
- Определение механизмов функционирования флавин-содержащих белков для разработки флуоресцентного белка на основе флавина со спектром флуоресценции, смещенным в красную область видимой части спектра.
- Оптимизация параметров FRET сенсора на каспазу-3 на основе флуоресцентного белка TagRFP и хромопротеина KFP по результатам изучения факторов, влияющих на эффективность процесса резонансно-индуктивного переноса энергии.
- Предсказание трехмерной структуры светособирающей антенны LH1 фотосинтетического центра термофильной бактерии *Thermochromatium tepidum* и сайтов связывания катионов кальция, ответственных за повышенную термостабильность комплекса.

Объектами исследования являются ферментативные и фоторецепторные белковые макромолекулы. К первой группе относятся комплексы малых ГТФаз с белками-ускорителями, матриксная металлопротеиназа MMP-2 и пенициллинацилаза. Для всех перечисленных систем предложены механизмы реакций, согласующиеся с экспериментальными данными. Ко второй группе относятся флавин-содержащие белки, белки семейства зеленого флуоресцентного белка и их комплексы, а также бактериальный фотосинтетический центр LH1-RC. Для этой группы систем сформулированы механизмы молекулярных процессов, лежащие в основе проявляемых фотофизических свойств, а также предложены способы их улучшения.

На защиту выносятся следующие положения:

- Для матриксной металлопротеиназы MMP-2 проведена интерпретация структурных и кинетических данных по результатам теоретического изучения механизма реакции. Предложены новые ингибиторы фермента на основе олигопептидов и их миметиков, успешно показавшие себя в экспериментах *in vitro*.

- Для гидролиза гуанозинтрифосфата в комплексах малых ГТФаз с белками-ускорителями описана полная схема химических реакций в активном центре, состоящая из стадии разрыва Р-О связи, сопряженной с таутомеризацией каталитически активного глутамина, и стадии регенерации фермента путем возвращения глутамина из имидной в амидную форму. Рассчитанные характеристические колебательные моды интермедиатов реакции могут быть использованы для подтверждения предложенного механизма методом ИК-спектроскопии с временным разрешением.
- По результатам моделирования методами КМ/ММ установлены механизмы фотоциклов флавин-содержащих фоторецепторных белков BLUF и iLOV. Мутация Q489K в белке iLOV приводит к сдвигу длины волны флуоресценции на 90 нм в красную область, что добавляет новый цвет в палитру флуоресцентных белков на основе флавина.
- Рациональный дизайн структуры связующего пептида FRET сенсора на каспазу-3 на основе флуоресцентного белка TagRFP и хромопротеина KFP позволил значительно увеличить эффективность резонансно-индуктивного переноса энергии.
- Построена полноатомная модель фотосинтетического центра LH1-RC термофильной бактерии *Thermochromatium tepidum* и определены сайты связывания катионов кальция. Ионы Ca^{2+} связываются с аминокислотными остатками α -Asp49 и β -Leu46 двух соседних субъединиц, что приводит к увеличению термической стабильности белкового комплекса.
- Для всех рассмотренных систем показано, что суперкомпьютерное молекулярное моделирование, основанное на построении полноатомной модели белка, выделении активного центра фермента или фоторецепторной системы для расчетов в приближении КМ/ММ, анализе результатов расчетов энергетических профилей химических и фотохимических реакций позволяет прогнозировать свойства белковых систем с требуемой для экспериментальной проверки точностью.

Научная новизна:

- Установлен механизм протеолиза в матриксной металлопротеиназе MMP-2 и предложены ингибиторы на основе олигопептидов и их миметиков.
- Исследован полный цикл реакции гидролиза ГТФ в комплексах Ras-GAP и Arl3-RP2, состоящий из стадии разрыва P-O связи и регенерации фермента; интерпретирована роль значимых точечных мутаций в белке Ras.
- Установлен механизм фотоцикла флавин-содержащих белков BLUF и iLOV; определена аминокислотная замена в белке iLOV, приводящая к сдвигу максимума флуоресценции в красную область спектра.
- Предложена аминокислотная последовательность в связующем пептиде FRET сенсора на каспазу-3, состоящего из флуоресцентного белка TagRFP и хромопротеина KFP, приводящая к значительному улучшению его характеристик.
- Построена полноатомная трехмерная модель и определены наиболее предпочтительные сайты связывания ионов Ca^{2+} с фотосинтетическим центром LH1-RC бактерии *Thermochromatium tepidum*.

Достоверность научных результатов:

- Предложенные на основании изучения механизма реакции ингибиторы MMP-2 прошли успешную экспериментальную проверку *in vitro*.
- Установленный механизм реакции ГТФ белковым комплексом Ras-GAP согласуется с экспериментальными данными по колебательной спектроскопии с временным разрешением и с результатами предстационарной кинетики.
- Установленный механизм фотопревращений в BLUF и iLOV доменах описывает известные экспериментальные данные по ИК, УФ-видимой спектроскопии, кинетическим данным и РСА.
- Синтезированный FRET сенсор на каспазу-3 на основе флуоресцентного белка TagRFP и хромопротеина KFP с предложенной по результатам молекулярного моделирования структурой связующего пептида обладает улучшенными характеристиками.

- Найденные сайты связывания ионов Ca^{2+} с фотосинтетическим центром LH1-RC экспериментально подтверждены методом РСА.

Научная и практическая значимость работы заключается в том, что представленные результаты позволяют интерпретировать известные экспериментальные данные, планировать новые экспериментальные исследования для доказательства предложенных механизмов, а также создавать новые системы с заданными свойствами:

- Разработанные ингибиторы на основе олигопептидов и их миметиков могут быть использованы в качестве прототипов для создания терапевтических средств борьбы с метастазированием.
- Особенности энергетического профиля реакции гидролиза комплексом Ar13-RP2 открывают возможности для спектроскопического детектирования интермедиатов по предложенным характеристическим колебательным модам, что может подтвердить участие каталитических аминокислотных остатков в ходе реакции.
- Предложенная точечная мутация Q489K в белке iLOV добавляет новый цвет в палитру флуоресцентных белков на основе флавина.
- Расширение динамического диапазона в предложенном сенсоре на основе флуоресцентного белка TagRFP и хромопротеина KFP дает возможность более точного определения активности каспазы-3 в клетках и тканях.
- Найденный структурный мотив, обеспечивающий связывание фотосинтетического центра LH1-RC бактерии *Thermochromatium tepidum* с ионами Ca^{2+} , объясняет повышение термической устойчивости при связывании с этими ионами.

Личный вклад автора заключается в сборе и анализе литературных данных, постановке задач, разработке путей решения поставленных задач, проведении вычислений методами квантовой химии, комбинированными методами квантовой механики и молекулярной механики, методами молекулярной динамики, интерпретации результатов, подготовке публикаций и докладов по теме диссертационной работы. Часть расчетов методом КМ/ММ выполнена совместно с

д.ф.-м.н. Б.Л. Григоренко, д.х.н. А.В. Немухиним, к.ф.-м.н. К.Б. Бравой, к.х.н. Т.М. Домрачевой и к.ф.-м.н. А.В. Мироновым. Экспериментальные исследования ингибиторов металлопротеиназ и FRET сенсоров проведены сотрудниками лаборатории физической биохимии ФИЦ Биотехнологии, Институт биохимии имени А.Н. Баха РАН.

Апробация работы и публикации. Основные результаты работы изложены в 33 оригинальных статьях, опубликованных в рецензируемых журналах, входящих в перечень ВАК РФ, а также в двух статьях в тематических сборниках по суперкомпьютерному моделированию. Результаты работы были представлены на следующих научных конференциях: CPLT – Chemistry and physics at low temperatures (2014), 20th, 21st International Workshop on Single Molecule Spectroscopy (2014, 2015), GTPases: Mechanisms, interactions and applications (2014), XXI, XXII, XXIII, XXIV, XXV, XXVII Симпозиумы «Современная химическая физика» (2009, 2010, 2011, 2012, 2013, 2015), 15th International congress on photobiology (2009), Математика компьютер образование МКО (2009, 2016), Всероссийская конференция «Молекулярное моделирование» (2009, 2011), XIX International conference on «Horizons in hydrogen bond research» (2011), 18th PCGG Workshop «Hydrogen bonds between the disciplines» (2011), Всероссийская конференция «Разнообразие путей электронного транспорта и углеродного метаболизма при фотосинтезе» (2012), IV съезд биофизиков России (2012), International workshop: Molecular simulation studies in material and biological sciences (2012, 2014), Theory and applications of computational chemistry (2012), Photonics West BiOS (2013), 7th Molecular quantum mechanics (2013), The VIII Congress of the International society for theoretical chemical physics (2013), IV International symposium «Topical problems of biophotonics» (2013), Первая Российская конференция по медицинской химии (2013), STEPS symposium on photon science (2015, 2016), International conference "Biocatalysis-2015: Fundamentals and applications" (2015).

Глава 1. Методы, компьютерные реализации и характерные примеры

С развитием суперкомпьютеров значительно увеличились размеры рассматриваемых систем, и изменился арсенал используемых методов расчетов их свойств. Разрабатываются алгоритмы вычислений энергий и сил в основном и возбужденном электронном состоянии, позволяющие достигнуть хорошей масштабируемости при правильном распределении задач по процессорам и оптимальном взаимодействии между ними при обмене данными, учитывая разнообразную архитектуру суперкомпьютеров [1]. В данной главе описаны методы компьютерного моделирования, использованные в ходе выполнения работы, приводится общая схема решения поставленных задач, а также рассмотрены характерные задачи, для решения которых требуются суперкомпьютерные ресурсы: механизм ферментативной реакции (на примере реакции гидролиза пенициллина пенициллинацилазой методом КМ/ММ) и молекулярно-динамическое моделирование структуры и динамики фотосинтетического центра [2,3].

1.1. Методы молекулярного моделирования

1.1.1. Метод молекулярной механики

Метод молекулярной механики (ММ) является наименее затратным с вычислительной точки зрения подходом для описания системы на атомарном уровне. В рамках такого подхода молекула представляется как набор атомов, атомам приписываются определенные типы, характеризующиеся набором эмпирических параметров [4]. Энергия системы в таком представлении записывается как

$$\begin{aligned} E &= E_{str} + E_{bend} + E_{tors} + E_{impr} + E_{vdw} + E_{el} + E_{cross} = \\ &= \sum k_{AB} (R_{AB} - R_{AB}^0) + \sum k_{ABC} (\theta_{ABC} - \theta_{ABC}^0) + \sum k_{\phi} (1 + \cos(n\phi - \delta)) + \\ &\sum k_{ABCD} (\varphi_{ABCD} - \varphi_{ABCD}^0)^2 + \sum \varepsilon_{EF} \left[\left(\frac{R_{EF}}{R_{EF}^0} \right)^{12} - 2 \left(\frac{R_{EF}}{R_{EF}^0} \right)^6 \right] + \sum \frac{Q^A Q^E}{\varepsilon R_{AE}} + E_{cross} \end{aligned}$$

В уравнении индексом «⁰» обозначены равновесные значения величин, k_{AB} , k_{ABC} , k_{ABCD} , k_{ϕ} , ε_{EF} – параметры силового поля. Первые четыре члена выражения

описывают взаимодействия связанных атомов: E_{str} – энергия растяжения связи, E_{bend} – энергия деформации угла, E_{tors} – энергия деформации двугранного угла и E_{impr} – энергия выведения атома из плоскости. Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия E_{vdw} , как правило, описываются с помощью потенциала Ленарда-Джонса. Электростатические взаимодействия описываются с помощью закона Кулона, при этом в качестве зарядов атомов используются частичные заряды, приписанные силовым полем. Последний член E_{cross} – иногда учитываемая поправка к энергии, вызванная взаимозависимостью предыдущих вкладов.

Для описания белков разработаны полноатомные силовые поля, такие как CHARMM [5] и AMBER [6], а также поля с эффективными частицами. К последней группе можно отнести поля в которых только некоторые группы атомов (например, CH_2 или CH_3 группы, содержащие неполярные атомы водорода) заменяются на один объединенный атом, например, GROMOS [7], а также силовые поля, в которых вообще нет атомарного представления (в англоязычной литературе coarse-grained force field) и группы из нескольких атомов заменяются на один эффективный атом, например, MARTINI [8]. Переход от полноатомных силовых полей к полям с эффективными частицами значительно ускоряет процесс расчета, но при этом точность и надежность расчетов уменьшается.

Молекулярно-механические и классические молекулярно-динамические расчёты могут быть эффективно распараллелены на большое количество центральных процессоров (CPU), а также значительно ускоряться с помощью графических карт (GPU). Развитие алгоритмов позволяет значительно повысить эффективность таких расчетов. В частности, при расчете несвязанных взаимодействий используются граничные значения расстояний (в англоязычной литературе cutoff), в пределах которых действуют электростатические и Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия. Также применяется алгоритм Эвальда, суть которого состоит в том, что потенциалы взаимодействия на дальних расстояниях суммируются в Фурье пространстве, а на близких – в прямом пространстве.

Всё это определяет привлекательность и популярность метода для описания больших систем, таких как белки или их комплексы. Также метод ММ позволяет быстро рассчитывать энергии и силы, что делает его подходящим для расчетов методом молекулярной динамики (метод классической молекулярной

динамики) [9]. Изучение конформационной динамики белковых систем методом классической молекулярной динамики помогает в интерпретации данных мессбауэровской спектроскопии и данных рентгеновской кристаллографии [10,11]. На сегодняшний день в литературе представлены расчеты, в которых рассматриваются системы размером порядка миллиона атомов.

В данной работе применялся метод классической молекулярной динамики с использованием молекулярно-механических силовых полей, реализованный в программном пакете NAMD [12].

1.1.2. Методы квантовой химии

Для описание поведения молекулярной системы в основном электронном состоянии хорошо зарекомендовал себя метод функционала электронной плотности (DFT), имеющий достаточно хорошую масштабируемость и большой набор разнообразных функционалов, позволяющих подобрать нужный вариант для решаемого типа задачи.

Основа метода DFT заключается в замене многоэлектронной волновой функции электронной плотностью ρ и представление всех свойств системы через последнюю

$$E = F(\rho(x, y, z)).$$

В вычислительной химии теория функционала электронной плотности стала активно применяться с появлением формализма Кона-Шема, предполагающего использование в расчетной схеме орбитальных представлений. Молекулярные орбитали должны быть сконструированы таким образом, чтобы правильно передавать электронную плотность системы. Энергия системы представляется суммой части кинетической энергии T_s , энергии взаимодействия электронов с ядрами E_{Ne} , энергии межэлектронного отталкивания J и энергии E_{XC} , включающей в себя квантовомеханические вклады в потенциальную энергию (обменный, корреляционный с поправками на самовзаимодействие) и часть кинетической энергии, не входящей в T_s . Поскольку теоретически не определено явное выражение E_{XC} , то в зависимости от выбранного функционала этот вклад описывается по-разному.

Простейшим подходом для описания обменно-корреляционного потенциала является приближение локальной плотности (LDA – local density approximation), основанное на точном расчёте обменной и корреляционной энергии в рамках приближения однородного электронного газа. Такой метод дает удовлетворительные результаты в физике твердого тела, однако недостаточно точен для квантовой химии [13].

Функционалы обобщённого градиентного приближения (GGA – gradient corrected approximation) также являются локальными, однако учитывают не только электронную плотность в точке, но и её градиент. Такие функционалы обладают гораздо большей точностью, при этом являются не сильно затратными с вычислительной точки зрения [13].

Наиболее точно описывают молекулярные системы гибридные функционалы, развитие которых в последнее десятилетие наиболее активно. Обменно-корреляционный потенциал определяется более сложным многопараметрическим выражением, что значительно увеличивает ресурсные затраты. Расчёты такими методами могут претендовать не только на качественное, но и на количественное описание свойств системы [4,13–16].

Как правило, в расчетах методом DFT используются Гауссовы базисные наборы. Наряду с ними, не так давно были разработаны комбинированные базисы гауссовых функций и плоских волн, значительно ускоряющие расчеты и эффективность параллельных вычислений при использовании функционалов группы GGA, таких как PBE [17] и BLYP [18,19]. Вычислительная привлекательность привела к тому, что такие квантово-химические протоколы стали активно применяться для молекулярно-динамических расчетов [20,21]. При этом точность и надежность получаемых результатов, особенно когда речь идёт о моделировании реакции, пока подробно не обсуждалась в литературе.

В данной работе для описания системы в основном электронном состоянии использовался метод DFT с гибридными функционалами PBE0 [22], B3LYP [23], BВ1К [24] и двухэкспонентными базисами с поляризационными функциями на всех атомах Попловского типа 6-31G** или корреляционно-согласованным *cc-pvdz*.

Методы связанных кластеров являются более высоко точными и эталонными на сегодняшний день, однако их едва ли можно применить к рассматриваемым системам, в особенности, если необходимо проводить оптимизацию геометрических параметров. В одной из рассматриваемых задач были проведены расчеты в стационарных точках, рассчитанных в рамках метода DFT, в варианте DLPNO-CCSD(T) (domain based local pair-natural orbital based singles- and doubles coupled cluster method with perturbatively included connected triple excitations). Отличия этого метода от метода связанных кластеров CCSD(T) связаны с тем, что энергия электронной корреляции рассчитывается только между близко расположенными электронами, так как она быстро убывает с увеличением расстояний, специфические натуральные молекулярные орбитали группируются определенным образом и применяется подход разложения единицы в ряд. Такие расчеты оказываются менее затратными по ресурсам, при этом ошибка по сравнению с CCSD(T) составляет порядка 1 ккал/моль [25,26].

Для описания электронных переходов, а также эволюции системы по возбужденным электронным состояниям использовались другие группы методов. При изучении системы удобно начинать с менее затратных с точки зрения ресурсов методов, так как во многих случаях они дают правильную качественную оценку. Наиболее старым и одним из простейших методов, основанном на вариационном принципе, является метод конфигурационного взаимодействия (КВ или CI) [4]. Его суть заключается в построении серии определителей Слейтера (Φ), построенных последовательной заменой в определителях занятых молекулярных орбиталей (МО) на вакантные, полученные в методе Хартри-Фока (ХФ). Пробная функция записывается в виде линейной комбинации определителя Слейтера основного состояния и определителей с однократными (S), двукратными (D), трехкратными (T) и возбуждениями более высоких порядков

$$\Psi_{CI} = a_0 \Phi_{HF} + \sum_S a_S \Phi_S + \sum_D a_D \Phi_D + \sum_T a_T \Phi_T + \dots = \sum_{i=0} a_i \Phi_i .$$

В данном случае вариационный принцип применяется только для поиска коэффициентов линейного разложения волновой функции, соответствующей минимальной энергии системы; при этом молекулярные орбитали остаются в точности теми же, что были получены в методе Хартри-Фока. На практике для

больших систем ограничиваются однократными и двукратными возбуждениями, так как учет возбуждений более высоких порядков крайне затратный. Во многих случаях для описания низших электронных переходов (например, между синглетными состояниями S_0-S_1 и S_0-S_2) в хромофорах белковых молекул достаточно учитывать одноэлектронные возбуждения (KB1 или CIS); при этом, если МО, полученные методом Хартри-Фока, хорошо описывают электронные состояние системы, то метод CIS дает правильное качественное описание возбужденных состояний. Метод CIS хорошо проявляет себя для описания возбужденных состояний сопряженных систем, когда их геометрическая конфигурация близка к планарной; иными словами, когда МО π и σ типа могут быть хорошо разделены в приближении Хартри-Фока. Так, например, в данной работе изучаются электронные спектры молекулы флавина, представляющего собой систему из трех конденсированных ароматических колец, для которого электронное решение хорошо описывается методом CIS.

В силу того, что метод CIS основан на вариационном принципе, значения энергий возбужденных состояний получаются завышенными. Для учета динамической электронной корреляции и получения правильной количественной оценки используются поправки по теории возмущений.

В работе [27] было показано, каким образом можно достичь значительного улучшения результатов расчета при систематическом масштабировании вкладов от энергий корреляции электронов с одинаковым (SS) и противоположными спинами (OS) в расчете поправок к энергии системы в основном электронном состоянии по теории возмущений Меллера-Плессе второго порядка (MP2). Такой метод получил название SCS-MP2 («spin-component scaled» – масштабирование спиновых компонент).

Энергия электронной корреляции в приближении MP2 записывается в виде

$$E_{MP2} = E_{MP2}^{OS} + E_{MP2}^{SS},$$

а учет поправочных коэффициентов для различных вкладов по методу SCS-MP2 преобразует выражение к виду

$$E_{SCS-MP2} = c_{OS} E_{MP2}^{OS} + c^{SS} E_{MP2}^{SS}, \text{ где } c_{OS}=6/5 \text{ и } c_{SS}=1/3.$$

Дальнейшее улучшение метода было связано с исключением из расчетов энергии корреляции электронов с одинаковыми спинами, что является более

затратным, и заменой двух параметров одним. Таким образом был сформулирован метод SOS-MP2 («scaled opposite spin» – масштабирование вкладов от динамической корреляции электронов с противоположными спинами), в котором проводится только расчет энергии корреляции электронов с одинаковым спином

$$E_{SOS-MP2} = c_{SOS} E_{MP2}^{OS}, \text{ где } c_{SOS} = 1.3.$$

Позднее этот подход был применен для расчета поправок по теории возмущений к CIS(D) – SOS-CIS(D) [28,29]. Этот метод дает хорошие количественные оценки для энергий возбуждения органических молекул, однако имеет ряд ограничений. В частности, если волновая функция основного электронного состояния имеет многоконfigurационный состав или для описания возбужденных состояний требуется значительный вклад двукратных возбуждений, то этот метод не применим. При изучении BLUF доменов с хромофорной группой флавинмононуклеотид целесообразно было использовать именно этот метод.

В случаях, когда электронное решение, как для основного, так и для возбужденного состояний описывается многими электронными конфигурациями, необходимо учитывать эффекты статической электронной корреляции, как, например в многоконfigurационном методе самосогласованного поля (MCSCF) [4]. Широкое распространение он получил в варианте многоконfigurационного метода самосогласованного поля в полном пространстве активных орбиталей (CASSCF), суть которого заключается в выборе активного пространства, то есть набора n занятых и m вакантных орбиталей в пределах которых разрешается любое размещение заданного числа электронов. Для замкнутых оболочек в случае n занятых орбиталей необходимо разместить $2n$ электронов, что соответствует активному пространству $(2n/(n+m))$. Пробная волновая функция в методе CASSCF имеет вид

$$\Psi = \sum_i C_i \Phi_i,$$

где Φ_i – конфигурационная функция состояний (КФС), которая может быть представлена как одним определителем Слейтера, так и линейной комбинацией определителей. В рамках вариационного принципа проводится оптимизация коэффициентов разложения волновой функции по конфигурационным функциям состояний (КФС) и оптимизация молекулярных орбиталей. Правильный выбор

активного пространства представляется отдельной сложной задачей. В работе рассматриваются органические молекулы хромофоров, являющиеся сопряженной π системой, для которых характерны π - π^* низшие электронные переходы, поэтому в расчет целесообразно включать орбитали π типа. Также при наличии гетероатомов возможны n - π^* переходы, тогда в активное пространство требуется включать несвязывающие n орбитали.

При расчете электронных спектров необходимо хорошо описывать как основное, так и возбужденные электронные состояния, для этого применяется процедура усреднения электронной плотности по интересующим состояниям – sa-CASSCF. Известно, что процедура sa-CASSCF не всегда приводит к получению правильного порядка следования состояний, что вызвано отсутствием учета динамической электронной корреляции. Это можно исправить, используя поправки по теории возмущений. В данной работе для расчёта вертикальных электронных переходов использовалась многоконфигурационная квазивырожденная теория возмущений второго порядка (MCQDPT2) [30] в варианте xMCQDPT2 [31]. На начальном этапе волновые функции основного и возбужденных электронных состояний нулевого приближения строятся в рамках метода многоконфигурационного самосогласованного поля в полном пространстве активных орбиталей (CASSCF) с усреднением электронной плотности по нескольким состояниям. Выбор усреднения обусловлен тем количеством состояний, которые влияют на конфигурационный состав волновой функции первого возбужденного состояния в рамках метода MCQDPT2. Учет динамической электронной корреляции проводился в рамках многоконфигурационной теории возмущений второго порядка в варианте метода MCQDPT2. Данный подход относится к методам, использующим технику построения эффективных гамильтонианов, рассчитываемых полностью по теории возмущений второго порядка. В отличие от других вариантов многоконфигурационной теории возмущений, в которых корреляционные поправки к энергии рассчитываются отдельно для каждого состояния (такие как MRMP2, CASPT2) и которые сильно зависят от качества волновых функций нулевого приближения, получаемых в рамках метода CASSCF, техника построения эффективных гамильтонианов позволяет учитывать взаимодействие электронных состояний под влиянием

динамической электронной корреляции. В итоге волновые функции основного и возбужденных состояний определяются после построения и диагонализации эффективного гамильтониана, собственные вектора которого представляют собой линейную комбинацию векторов нулевого приближения.

1.1.3. Комбинированный метод квантовой механики/молекулярной механики

Рассматриваемые в работе системы насчитывают несколько тысяч атомов, поэтому единственным существующим на сегодняшний день подходом к поиску равновесных геометрических параметров (с использованием квантовых уравнений для активных центров) является комбинированный метод квантовой механики и молекулярной механики (КМ/ММ) [32–36]. Его идеология заключается в разделении системы на две подсистемы, одна из которых включает в себя хромофор-содержащую область белка и описывается методами квантовой химии (КМ или QM), а другая состоит из большей части белковой матрицы и молекул воды сольватной оболочки и описывается с помощью классических силовых полей (ММ). В рамках такого подхода гамильтониан и полная энергия системы записывается в виде суммы трех членов:

$$H_{total} = H_{QM} + H_{MM} + H_{QM/MM}$$
$$E_{total} = E_{QM} + E_{MM} + E_{QM/MM}$$

Слагаемые, отвечающие за КМ и ММ подсистемы, относятся к соответствующим подсистемам. Наибольшую проблему составляет описание связи КМ и ММ фрагментов. Наиболее сложной для описания является ситуация, в которой граница подсистем проходит по ковалентной связи, как, например, в активных сайтах ферментов. В том случае, когда граница КМ и ММ подсистем проходит по ковалентной связи, применялся метод добавления «связующих» атомов, в нашем случае атомов водорода. «Связующие» атомы присутствуют только в КМ расчете и никак не взаимодействуют с ММ матрицей, но при этом заполняют свободную валентность, образованную при разрыве ковалентной связи. Также различаются способы учета влияния ММ подсистемы на КМ. Иногда ограничиваются учетом только стерических особенностей, создаваемых белковой матрицей. В данной работе для решения большинства задач применялся метод КМ/ММ в варианте электронного внедрения, предполагающий также учет вкладов

от точечных зарядов ММ подсистемы в одноэлектронную часть Гамильтониана КМ подсистемы.

1.2. Общая схема решения задач

Рассматриваемые в данной работе объекты – большие биологические системы, белки или их комплексы. Поставленные задачи связаны как с изучением выбранных объектов и интерпретацией существующих для них экспериментальных данных, так и с прогнозированием новых систем с измененными свойствами или рекомендациями для проведения дополнительных экспериментов, требующихся для более полного понимания механизмов процессов.

В этой связи в работе предложена общая схема решения поставленных задач (рис. 1.1). На первом этапе предполагается построение полноатомной трехмерной модели, основываясь на данных рентгено-структурного анализа (РСА), а также трехмерного ЯМР. В случаях, когда нет требуемой информации для рассматриваемой системы, используются данные для сходных систем и проводятся их модификации, основываясь на знании первичной последовательности и гомологичных построениях. При необходимости в систему добавляется субстрат, кофактор или ингибитор и проводится построение полноатомной модели. Для аминокислотных остатков, существующих в различных протонированных формах проводится инспекция их локального окружения для определения протонированного состояния. Подготовленная таким образом модель готова для проведения расчетов. В основном, в работе рассматриваются ферментативные реакции и фотохимические процессы. В первом случае задача, главным образом, сводится к построению сечения поверхности потенциальной энергии вдоль координаты реакции и определения всех элементарных стадий реакции. Полученные из молекулярного моделирования результаты сравниваются с экспериментальными значениями констант скоростей, данными по мутагенезу и колебательной спектроскопии с временным разрешением. Если речь идет о фотохимических процессах, с точки зрения моделирования требуется локализация минимумов на поверхностях потенциальной энергии основного и возбужденных электронных состояний, а также расчет вертикальных энергий переходов и

дипольных моментов переходов. Полученные данные сравниваются с экспериментальными спектрами поглощения и флуоресценции, колебательными спектрами и данными по мутагенезу.

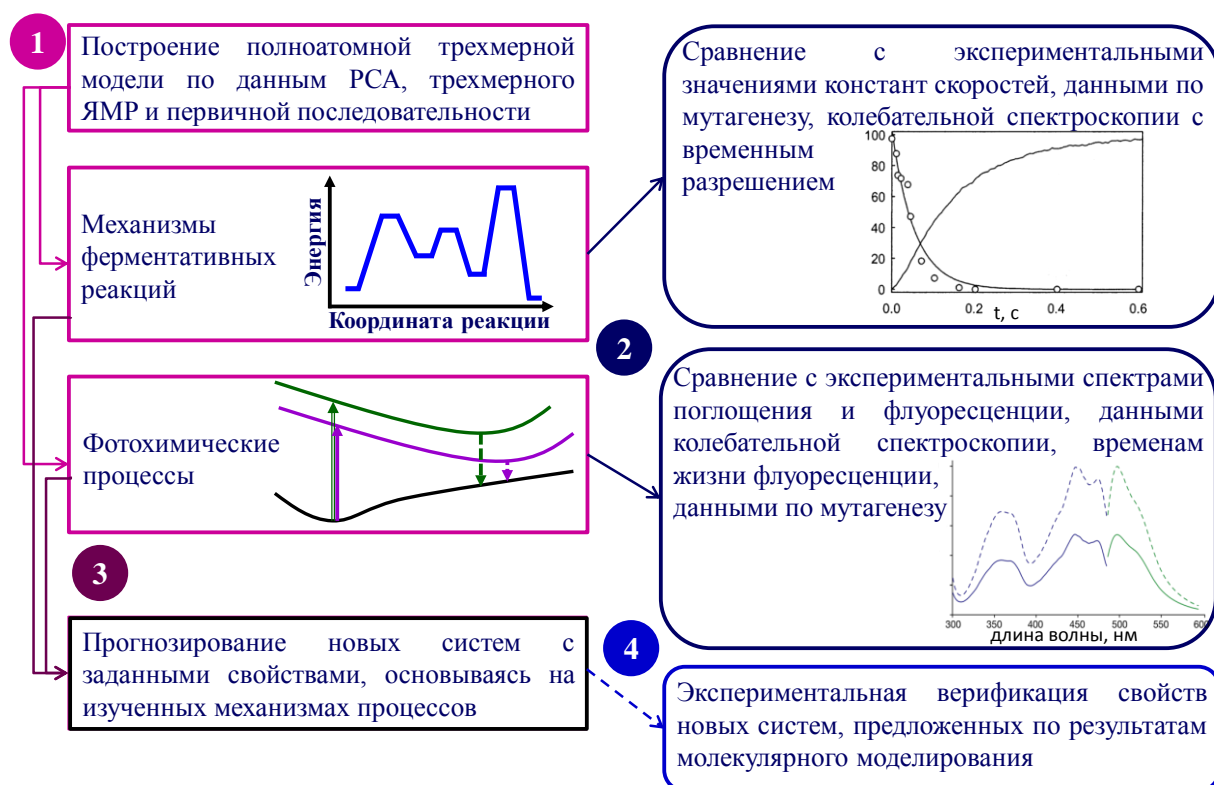


Рис. 1.1. Общая схема решения задач.

В том случае, если предложенные модели описывают все существующие экспериментальные данные для выбранных систем, на следующем этапе проводится прогнозирование новых систем с заданными свойствами или разрабатываются рекомендации по дополнительным экспериментам, способным подтвердить предложенный механизм.

На последнем этапе проводятся совместные исследования с группами экспериментаторов для опытной проверки сделанных прогнозов и рекомендаций.

1.3. Гидролиз пенициллина G пенициллинацилазой

Пенициллинацилаза является промышленным ферментом, необходимым для синтеза и гидролиза антибиотиков β -лактамового ряда, а также для стереоспецифического ацилирования и деацилирования аминов в водных растворах. Особенностью этого фермента, выделяющего его среди других

сериновых гидролаз, является то, что каталитический серин β Ser1 находится на N-конце аминокислотной цепи, поэтому аминогруппа основной цепи может выступать в качестве основания в реакции. На рисунке 1.2 показана схема реакции гидролиза с образованием 6-аминопенициллановой кислоты (6-АРА) и фенилуксусной кислоты (РАА).

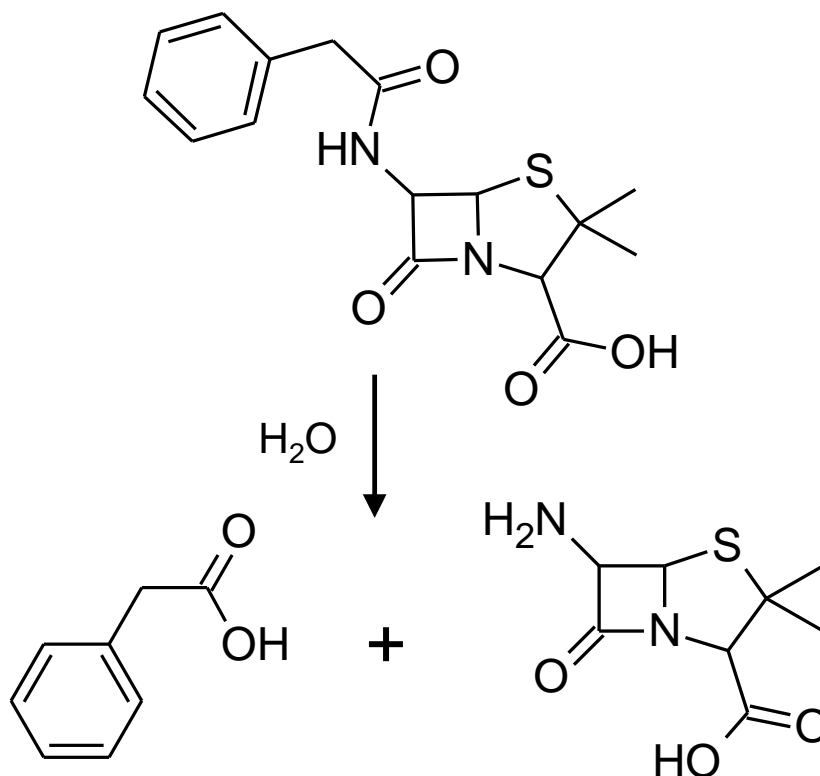


Рис. 1.2. Схема реакции гидролиза пенициллина G.

Для описания профиля реакции на поверхности потенциальной энергии использовался метод КМ/ММ с описанием вкладов ММ части в квантово-механическую подсистему в рамках подхода потенциала эффективных фрагментов. КМ подсистема описывалась методом DFT с протоколом PBE0/6-31G*, ММ – с помощью силового поля AMBER. В КМ подсистему входили субстрат, серин β Ser1 и боковая цепь аргинина β Arg263. Всю реакцию можно разделить на две стадии – ацилирование и деацилирование (рис. 1.3). На стадии ацилирования происходит нуклеофильная атака атома кислорода серина β Ser1 на карбонильный атом углерода субстрата, сопровождающаяся переносом протона со спиртовой группы серина на концевую аминогруппу этого же остатка. Это приводит к образованию тетраэдрического интермедиата. На второй стадии происходит разрыв связи C-N и образуется ацилированный фермент и 6-аминопенициллановая кислота [37].

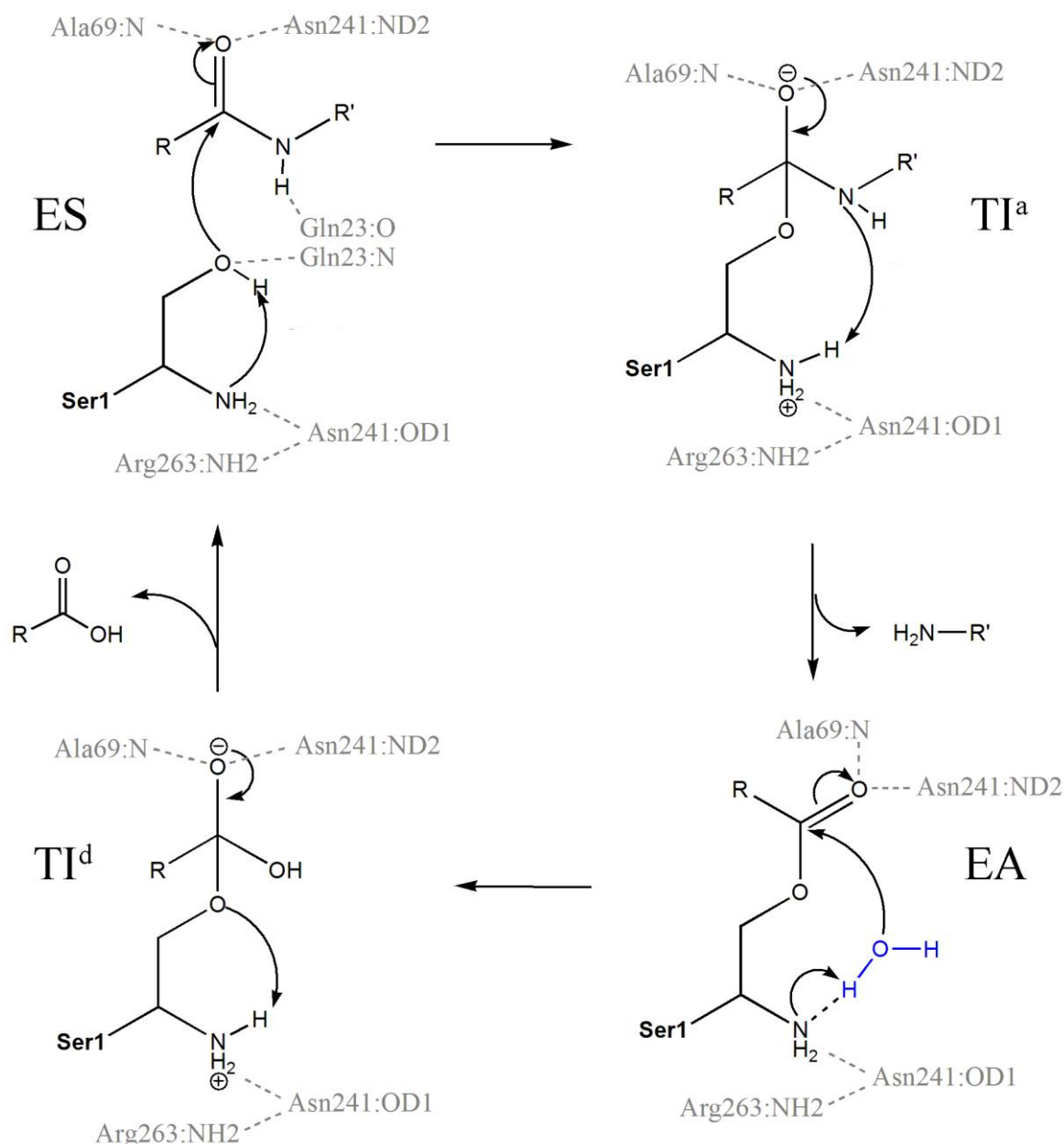


Рис. 1.3. Стадии ацилирования и деацилирования реакции гидролиза пенициллина G пенициллинацилазой.

После окончания стадии ацилирования 6-APA уходит из активного центра, и оставшийся ацилированный полупродукт сольватируется водой. Это приводит к необходимости переопределения квантовой подсистемы, и, как следствие, совмещению двух частей энергетического профиля (рис. 1.4) по точке, соответствующей ацилированному ферменту.

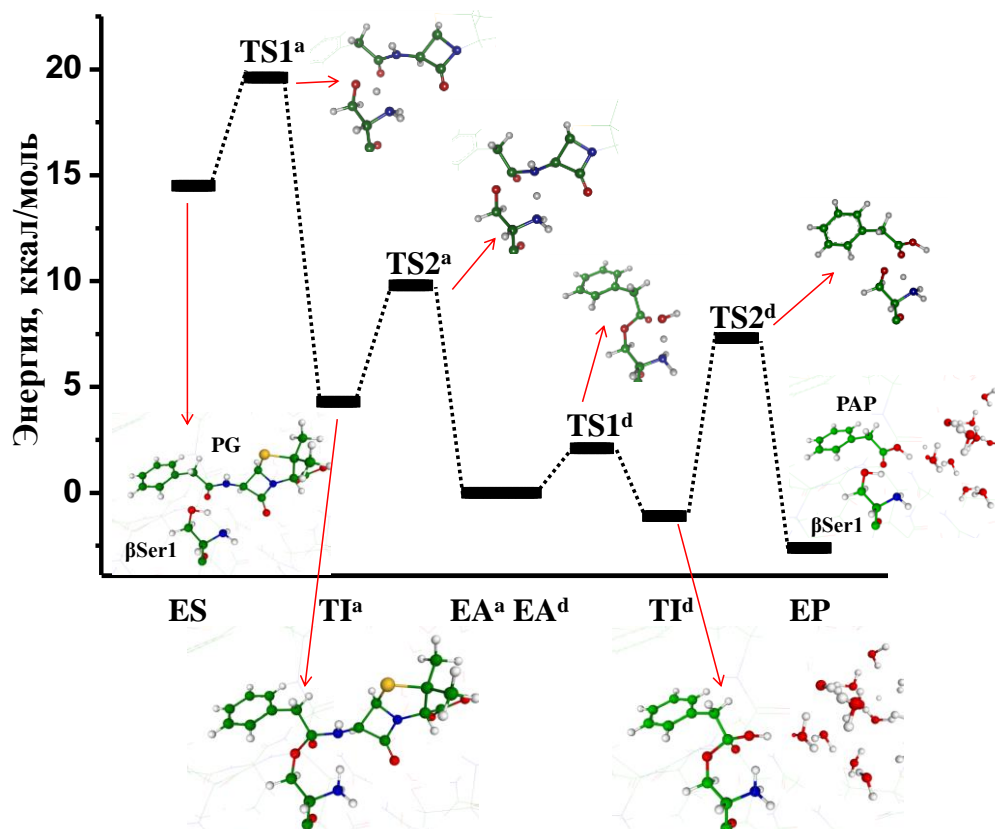


Рис. 1.4. Профиль поверхности потенциальной энергии стадий ацилирования и деацилирования реакции гидролиза пенициллина G пенициллинацилазой.

На стадии деацилирования молекула воды, ориентированная концевой аминогруппой серина, атакует атом углерода ацилированного фермента, что приводит к образованию второго тетраэдрического интермедиата. Этот процесс сопровождается переносом протона на концевую аминогруппу серина. Далее, на последней стадии происходит разрыв связи С—О и образование продуктов.

Активный центр находится на поверхности фермента и субстрат сольватирован молекулами воды, что приводит к его значительной подвижности. Методом молекулярной динамики с КМ/ММ потенциалами в варианте BLYP/TZV2P-GTH/CHARMM был проведен анализ подвижности субстрата в фермент-субстратном комплексе. В качестве структуры для сравнения использовалась структура фермент-субстратного комплекса, полученная в КМ/ММ протоколе, описанном выше. Наиболее важным является расстояние С(PNN)...О(βSer1), составляющее 2.50 Å для равновесной геометрической конфигурации (рис. 1.5). Это расстояние является ключевым и во многом определяет энергетические затраты стадии нуклеофильной атаки атома углерода атомом кислорода. Структуры, в которых это расстояние увеличено, будут иметь

большой барьер нуклеофильной атаки. На рис. 1.6 приводится распределение по расстояниям, полученное из КМ/ММ-МД расчетов, показывающее, что доля структур с небольшими расстояниями (менее 2.60 Å) составляет около 2 %. Если представить схему реакции в виде



где ES – нереакционные фермент-субстратные комплексы, ES' – комплексы, приводящие к химической реакции, TI – тетраэдрический интермедиат и предположить равновесие между ES и ES' , связанное с тем, что обе конформации легко переходят друг в друга в КМ/ММ-МД расчете, можно записать выражения для равновесия с соответствующей константой, определенной из доли реакционных конформаций

$$K = \frac{[ES']}{[ES]} = 0.023$$

В этом случае эффективное значение константы скорости образования TI будет определяться как

$$k_{eff} = K \cdot k,$$

что эффективно понижает константу скорости приблизительно в 50 раз. Это указывает на то, что при оценке константы скорости для ферментативных реакций, происходящих на поверхности фермента, важно учитывать вклады динамики фермент-субстратного комплекса.

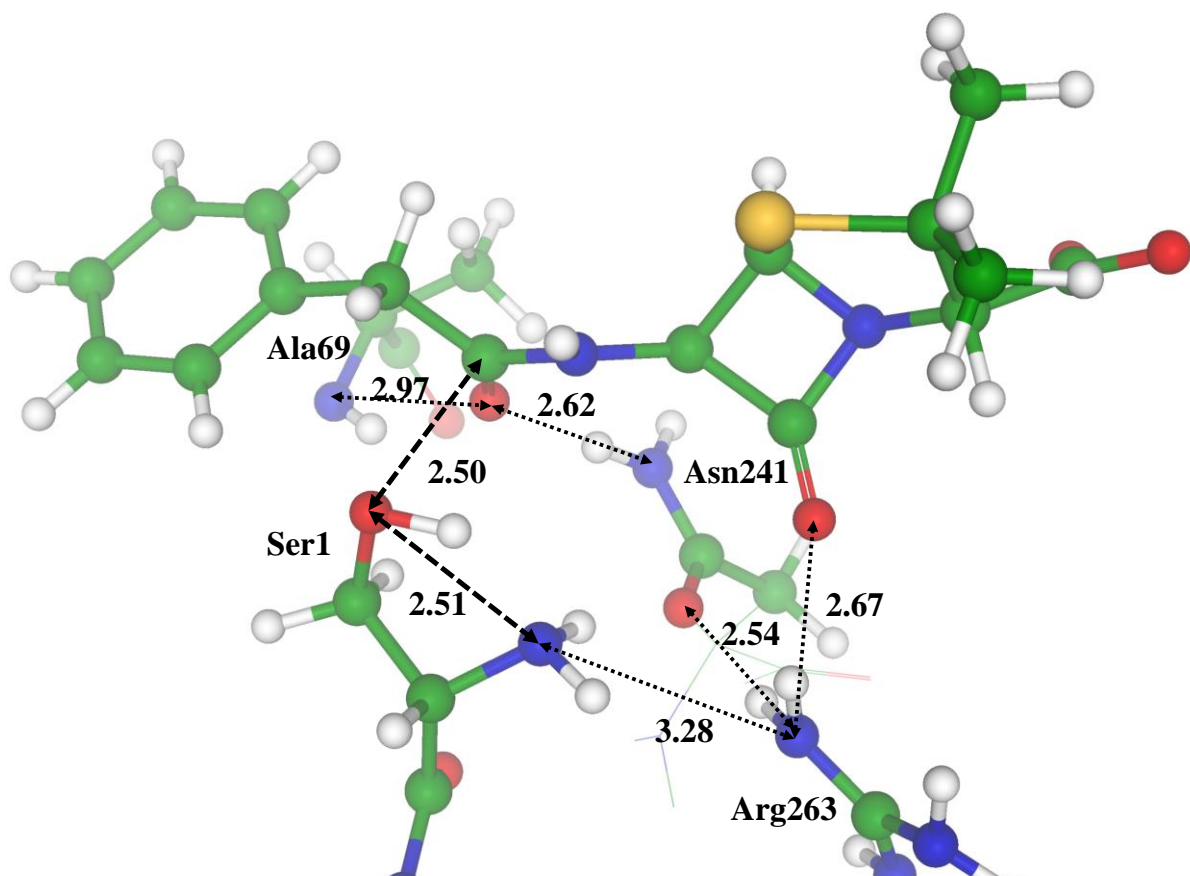


Рис. 1.5. Фермент-субстратный комплекс пенициллина G в активном центре пенициллинацилазы.

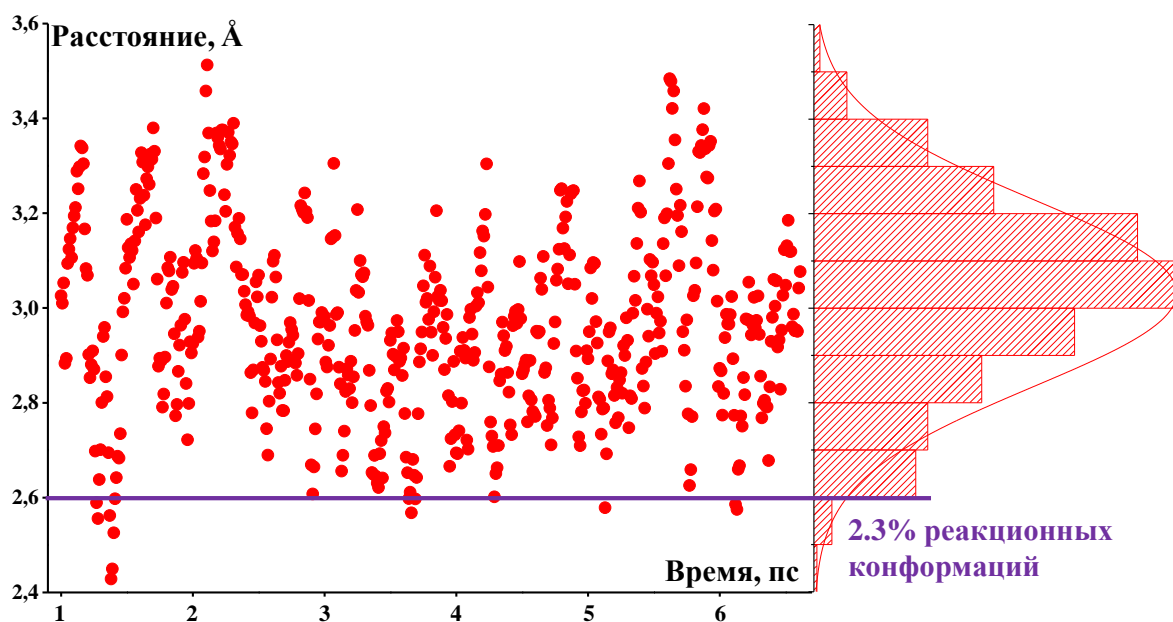


Рис. 1.6. Распределение по расстояниям $C(PNN)\dots O(\beta Ser1)$ в фермент-субстратном комплексе.

Для определения чувствительности получаемых данных к выбранному протоколу расчетов первая стадия реакции $ES \rightarrow TS1^a \rightarrow TI^a$ рассматривалась с

различными КМ частями (рис. 1.7) и различными протоколами расчета. Во всех приведенных ниже расчетах применялся метод КМ/ММ в варианте электронного внедрения с точечными зарядами из силового поля AMBER.

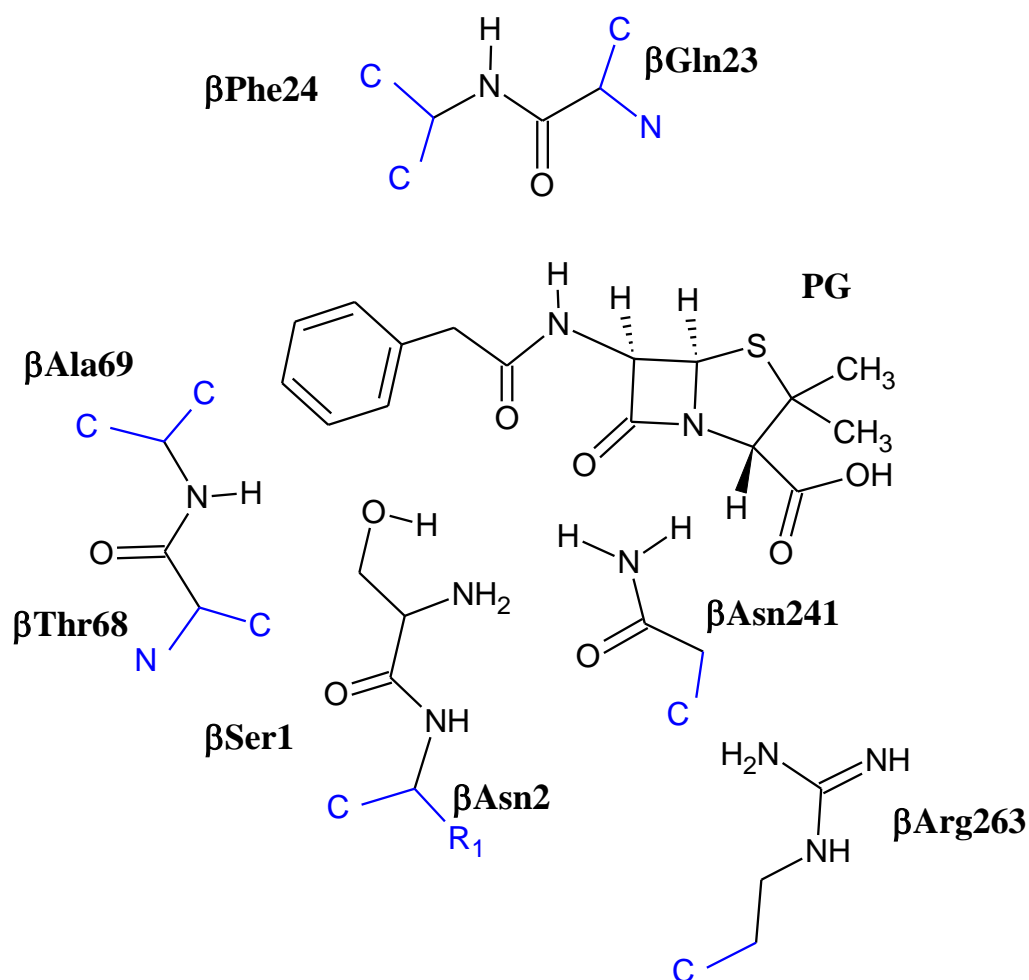


Рис. 1.7. КМ подсистема, выбранная в расчетах по протоколам 3 и 4. Синим показаны атомы на границах КМ и ММ частей.

В работе рассматривались следующие расчетные схемы:

Протокол 1 (П-1): Референсный протокол расчета, в котором получен профиль реакции (рис. 1.4). КМ часть состояла из субстрата (PG), β Ser1 и боковой цепи β Arg263 и описывалась PBE0/6-31G*. Влияние ММ подсистемы на КМ учитывалось с помощью потенциалов эффективных фрагментов. ММ часть описывалась силовым полем AMBER.

Протокол 2 (П-2): КМ часть состояла из субстрата (PG), β Ser1 и боковой цепи β Arg263 и описывалась PBE0/cc-pvdz. Влияние ММ подсистемы на КМ учитывалось с помощью точечных зарядов силового поля AMBER. ММ часть

описывалась силовым полем AMBER. Переходное состояние было подтверждено расчетом гессина.

Протокол 3 (П-3): КМ часть состояла из субстрата (PG), β Ser1, боковой цепи β Arg263, оксианионного центра (β Asn241, β Thr68 and β Ala69) и фрагмента β Gln23, взаимодействующего с субстратом и описывалась PBE0/cc-pvdz (рис. 1.7). Влияние ММ подсистемы на КМ учитывалось с помощью точечных зарядов силового поля AMBER. ММ часть описывалась силовым полем AMBER. Переходное состояние было подтверждено расчетом гессина.

Протокол 4 (П-4): Протокол аналогичный П-3 (рис. 1.7), но с функционалом VB1K (hybrid Hartree-Fock-density functional model Becke88-Becke95 1-parameter model for Kinetics).

Протокол 5 (П-5): КМ часть состояла из субстрата (PG), β Ser1, боковой цепи β Arg263, оксианионного центра (β Asn241, β Thr68 and β Ala69) и описывалась BLYP/GPW-TZV2P. ММ подсистема описывалась силовым полем CHARMM.

На рисунке 1.8 представлены расстояния, выбранные для сравнения протоколов (табл. 1.1-1.3).

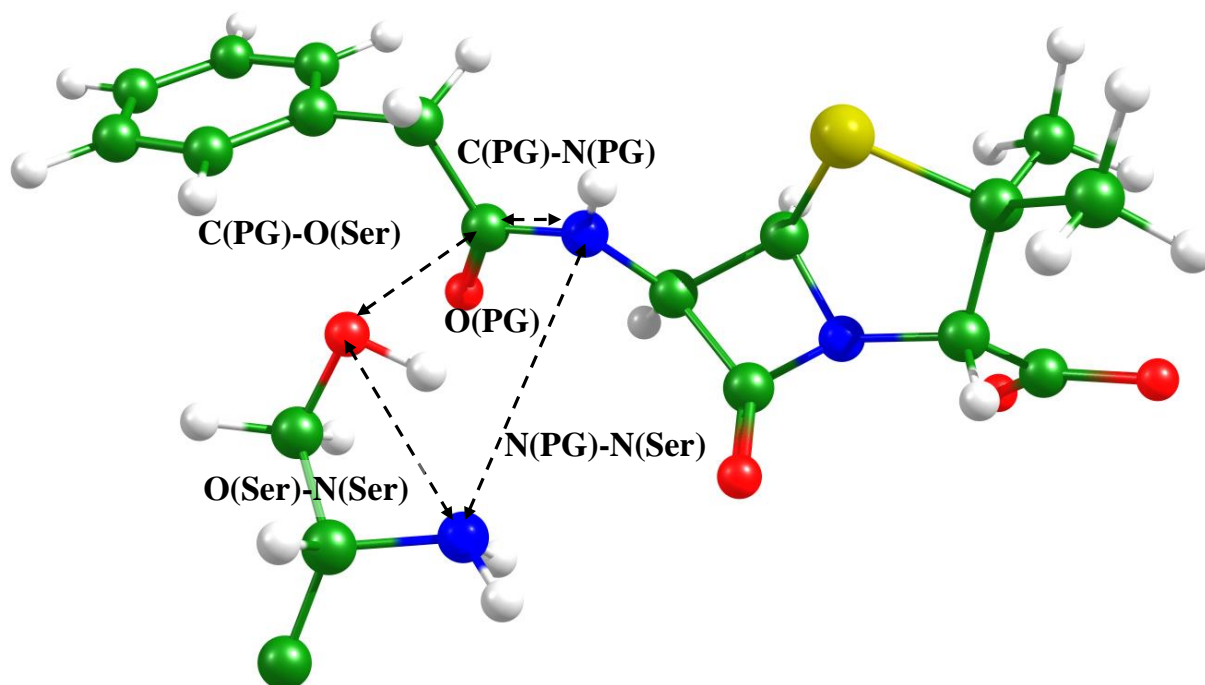


Рис. 1.8. Ключевые геометрические параметры первой стадии реакции гидролиза пенициллина G в активном центре пенициллинацилазы.

Таблица 1.1. Ключевые расстояния в структуре фермент-субстратного комплекса.

Протокол Расстояние, Å	П-1	П-2	П-3	П-4	П-5
C(PNN)-O(Ser)	2.50	2.49	2.56	2.59	2.46
O(Ser)-N(Ser)	2.51	2.57	2.55	2.56	2.61
C(PNN)-N(PNN)	1.38	1.37	1.37	1.36	1.38
N(Ser)-N(PNN)	3.42	3.81	3.87	3.87	3.91
O(PNN)-N(Ala69)	2.96	2.95	3.08	3.13	2.93
O(PNN)-N(Asn241)	2.62	2.96	3.15	3.19	3.21

Таблица 1.2. Ключевые расстояния в структуре первого переходного состояния TS1^a.

Протокол Расстояние, Å	П-1	П-2	П-3	П-4
C(PNN)-O(Ser)	2.32	2.28	2.40	2.42
O(Ser)-N(Ser)	2.37	2.40	2.39	2.37
C(PNN)-N(PNN)	1.38	1.38	1.37	1.36
N(Ser)-N(PNN)	3.25	3.53	3.67	3.65
O(PNN)-N(Ala69)	2.79	2.91	3.02	3.07
O(PNN)-N(Asn241)	2.61	2.89	3.04	3.08

Таблица 1.3. Ключевые расстояния в структуре тетраэдрического интермедиата TI^a .

Протокол Расстояние, Å	П-1	П-2	П-3	П-4	П-5
C(PNN)-O(Ser)	1.56	1.57	1.55	1.53	1.53
O(Ser)-N(Ser)	2.75	2.77	2.82	2.77	2.87
C(PNN)-N(PNN)	1.51	1.51	1.49	1.48	1.60
N(Ser)-N(PNN)	2.87	2.80	2.87	2.88	2.93
O(PNN)-N(Ala69)	2.85	2.84	2.83	2.86	2.80
O(PNN)-N(Asn241)	2.63	2.87	2.88	2.90	2.92

Различные схемы расчетов приводят к схожим значениям геометрических параметров в соответствующих стационарных точках, что свидетельствует о стабильности получаемых результатов.

В таблице 1.4 приведены относительные энергии стационарных точек, полученные каждым из методов. Для протокола расчета П-5 не были выделены вклады от различных энергетических членов и значение полной КМ/ММ энергии TI^a оказалось на 1.5 ккал/моль меньше, чем для ES (не приведено в таблице). Важно отметить, что энергия КМ части без учета вкладов ММ рассчитана для геометрических параметров стационарной точки из КМ/ММ, то есть не является истинной стационарной точкой для кластерного расчета. Тем не менее можно утверждать, что стабилизирующая роль белковой матрицы является значительной. Поскольку предполагается, что все молекулярные группы, участвующие в реакции рассматриваются в КМ подсистеме, энергия ММ части должна меняться незначительно. В этом отношении наиболее правильными являются протоколы 3 и 4 с большой КМ частью.

Таблица 1.4. Относительные энергии стационарных точек и вклады в общую энергию системы. В каждом случае за 0 ккал/моль принята энергия ES. Все энергии представлены в ккал/моль.

Протокол	Стац. точка	Энергия КМ части без вкладов от ММ	Энергия КМ части с вкладами от ММ	Энергия ММ части	Полная КМ/ММ энергия
П-1	TS1 ^a	15.2	4.4	0.7	5.1
	TI ^a	24.9	-14.2	4.0	-10.2
П-2	TS1 ^a	20.8	7.5	1.6	9.1
	TI ^a	24.8	-1.5	3.5	2.1
П-3	TS1 ^a	15.9	5.8	0.8	6.6
	TI ^a	19.3	-3.4	0.4	-2.9
П-4	TS1 ^a	19.0	7.8	0.8	8.6
	TI ^a	23.8	-0.5	0.6	0.2

1.4. Светособирающая антенна LH1 бактериальной фотосистемы

Изучение бактериальных фотосистем представляет интерес как с точки зрения фундаментальной науки, так и в связи с возможными приложениями, связанными с альтернативными источниками энергии. Работа таких систем крайне сложна, в них происходит поглощение света кофакторами светособирающих антенн, а далее энергия переносится в реакционный центр, где уже непосредственно происходит фотосинтез. Изучение таких систем крайне затруднительно с вычислительной точки зрения, что связано как с большим размером самой системы и необходимостью описывать не только белковый комплекс, но и окружающий его липидный бислой с сольватной оболочкой [38,39], так и с необходимостью описывать синглетные и триплетные электронные состояния [40,41].

Особенностью светособирающей антенны LH1 термофильной бактерии *Thermochromatium tepidum* является её повышенная термическая стабильность по сравнению с другими бактериями. Такое поведение определяется наличием катионов кальция в структуре LH1, и их вымывание приводит к потере этого свойства [42–44]. Существующие экспериментальные данные по трехмерной структуре комплекса ограничивались кристаллической структурой с разрешением 4.8 Å, в которой были расшифрованы только основные цепи LH1 и реакционного центра RC бактерии *Rhodospseudomonas palustris* (PDB ID:1PYH) [45]. Полноатомная модель была получена в результате замены RC структуры низкого разрешения на модель из кристаллической структуры RC с разрешением 2.2 Å (PDB ID: 1EYS) [46], для построения α -спиралей LH1 использовались структурные шаблоны из светособирающего комплекса LH2 (PDB ID: 2FKZ) [47] и данные о первичной последовательности рассматриваемого комплекса.

Расчеты проводились методом классической МД с силовыми полями CHARMM для белковых макромолекул, бактериохлорофиллов, бактериофеофитинов и гемов, и CGenFF [48] для каротиноидов и хинона в каноническом ансамбле NPT с шагом интегрирования 1 фс при T=300 К. Электростатические взаимодействия описываются по методу Эвальда, основанному на разделении энергии на короткодействующую и длиннодействующую части, описывающиеся в действительном и Фурье пространствах соответственно, что обеспечивает лучшую сходимость в каждом слагаемом. Программная реализация такого подхода добавляет разложение на сетке, что приводит к эффективной реализации алгоритмов на суперкомпьютерах. Длина МД траекторий составляла 50 нс, а размер системы порядка полумиллиона атомов. Выбранная белковая система помещалась в липидный бислой и сольватировалась молекулами воды (рис. 1.9). Для поиска сайтов связывания в воду были добавлены катионы кальция и противоионы хлорида, и изучалось их динамическое поведение [49–52].

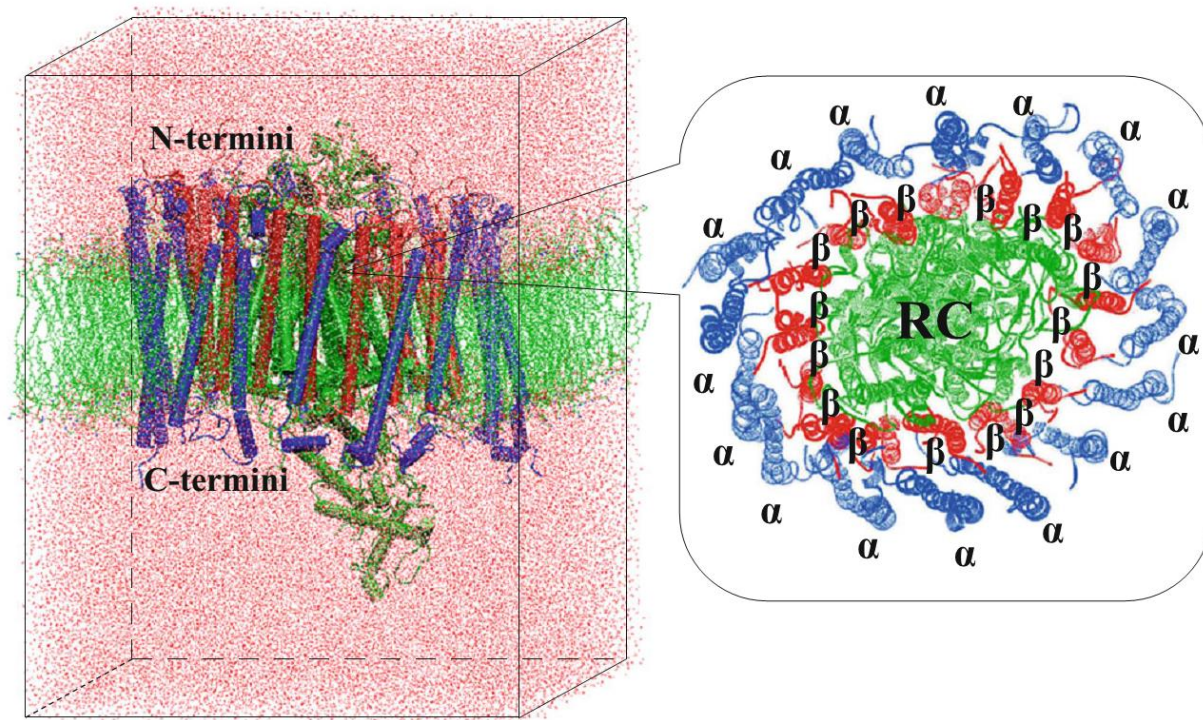


Рис. 1.9. Модельная система комплекса LHI-RC бактерии *Thermochromatium tepidum*, помещенного в липидный бислои и сольватированного молекулами воды. Вода и липидный бислои показаны красными точками и зелеными линиями, соответственно. Реакционный центр, α и β цепи LHI показаны зелеными, синими и красными спиралями или трубками, соответственно. На вставке показан вид сверху для комплекса LHI-RC.

После уравнивания в систему добавлялись 500 катионов кальция и нейтрализующие их хлорид анионы. На рис. 1.10 выделены катионы кальция, находящиеся вблизи белка после расчета МД траектории 50 нс, практически все они находятся с С-концов α и β спиралей LHI. Анализ поведения кальция вдоль траектории показывает, что те катионы, которые вначале могли находиться далеко от поверхности белка, диффундируют к предполагаемому сайту связывания и образуют координационные связи с аминокислотными остатками β Leu46 и α Asp49 (рис. 1.11), остальные координационные связи при этом заполнены молекулами воды. Таким образом постепенно заполняются все сайты связывания. Особенностью такого окружения катиона кальция является то, что две аминокислоты из координационной сферы относятся не только к разным спиральям (α и β), но и к разным мономерам, что обеспечивает дополнительную связь между субъединицами, приводя к увеличению прочности структуры, и, как следствие, к повышению термической стабильности.

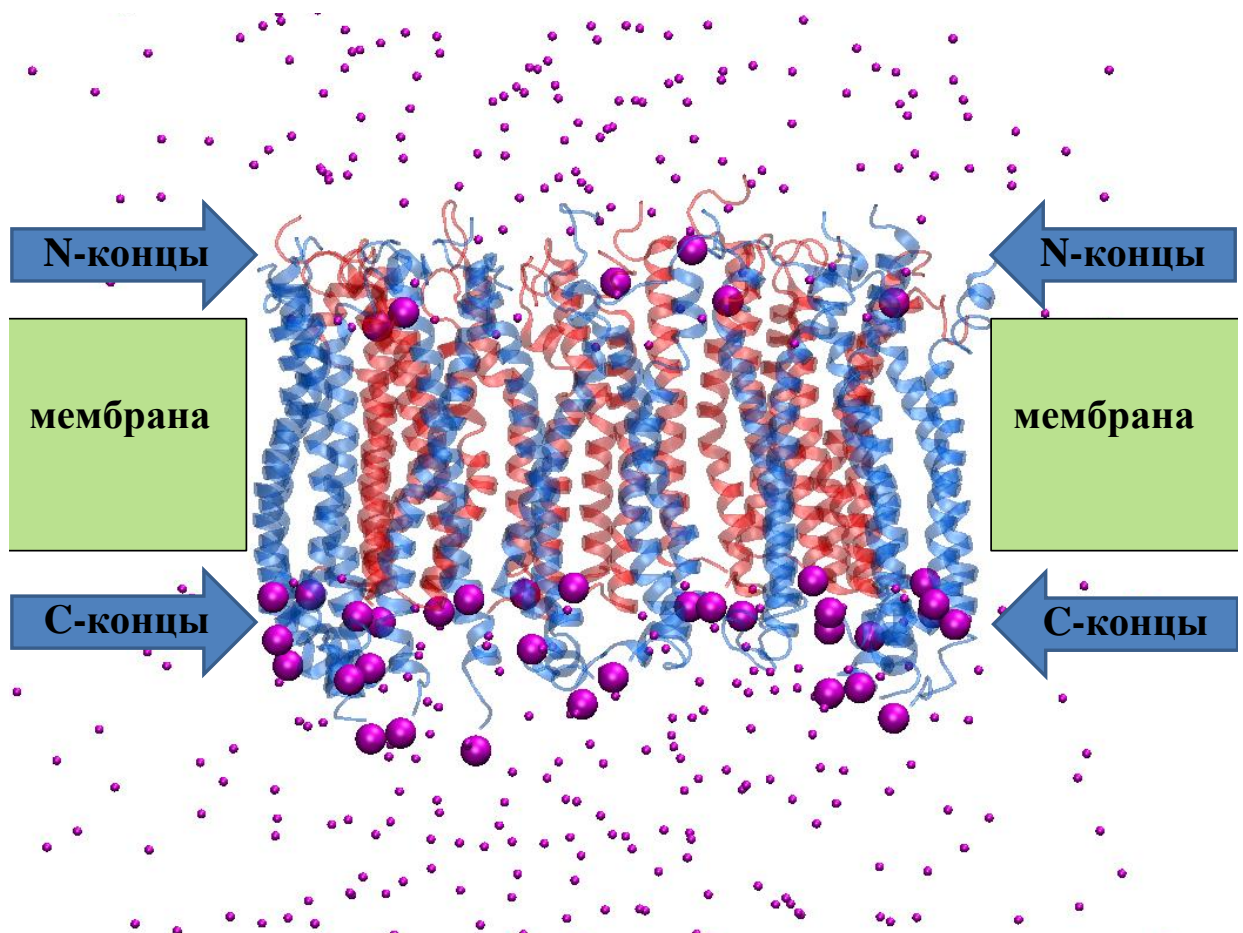


Рис. 1.10. Расположение катионов кальция в модельной системе (пурпурным); жирным выделены катионы кальция вблизи ($< 3 \text{ \AA}$) белка.

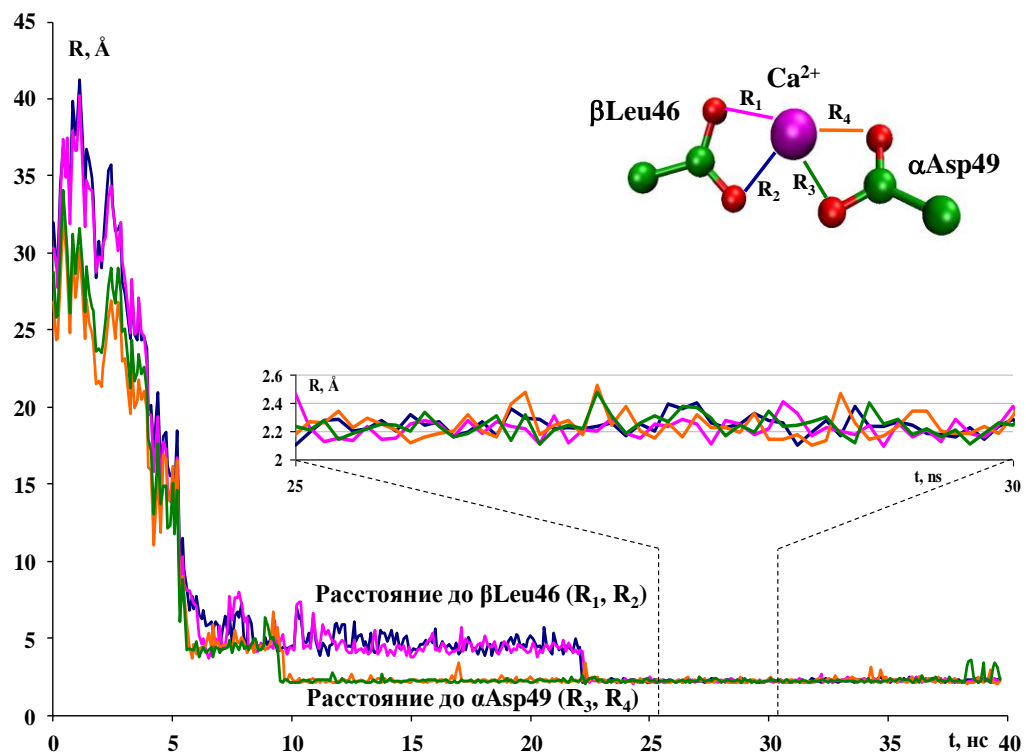


Рис. 1.11. Изменение расстояние между одним из катионов кальция и аминокислотными остатками βLeu46 и αAsp49 вдоль МД траектории.

Позднее была получена кристаллическая структура высокого разрешения комплекса LH1-RC с катионами кальция (PDB ID: 3WMM [53]), которая подтвердила полученные в моделировании сайты связывания, однако помимо основной цепи лейцина и боковой цепи аспартата в координационную сферу также входили атом кислорода амидной группы боковой цепи α Asn50 и атом кислорода основной цепи α Trp46. Модельная система белкового комплекса LH1-RC, основанная на этой кристаллической структуре, также помещалась в мембрану и сольватировалась аналогичным образом. Далее для полученной системы проводились МД расчеты по протоколу, описанному выше. В данном случае в системе присутствовали только катионы кальция, связанные с остатками светособирающей системы и анализировалась динамика этих центров связывания. В результате МД расчета координационная сфера магния разрушается и в ней остаются только β Leu46 и α Asp49 (рис. 1.12), как было предложено в моделировании, описанном выше (рис. 1.13). Объяснение такому наблюдению может быть связано с тем, что в кристалле мало молекул воды и, возможно их нет вблизи катиона кальция, в результате чего он формирует координационную сферу из атомов кислорода ближайших аминокислотных остатков [54].

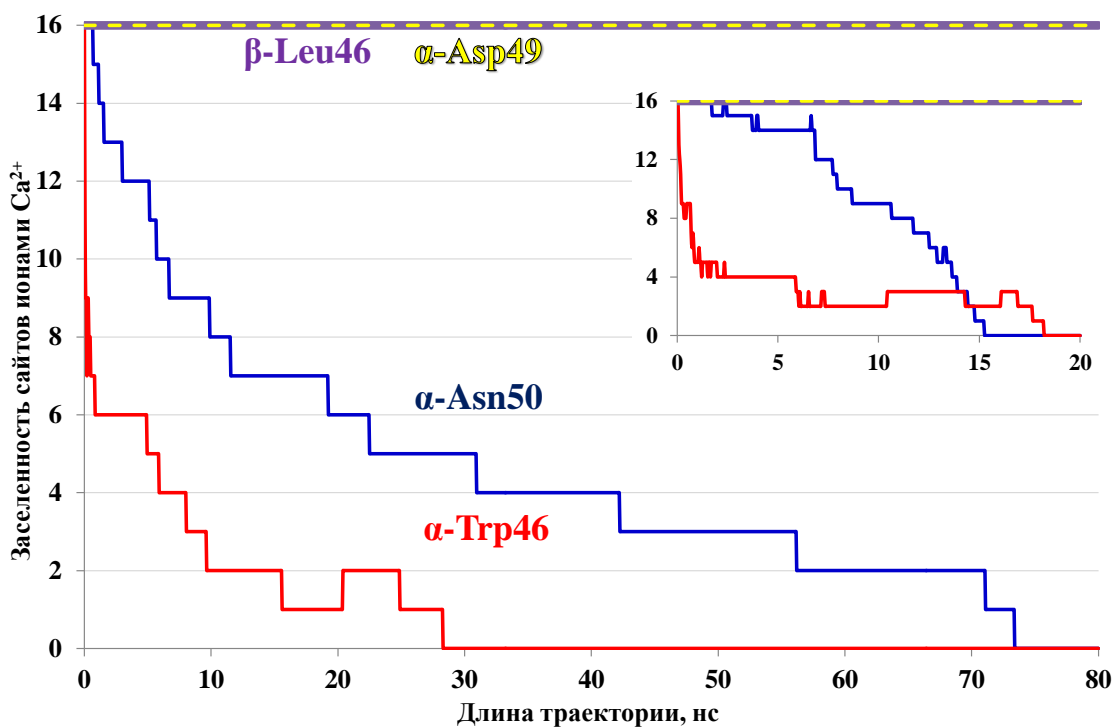


Рис. 1.12. Эволюция 16 сайтов связывания кальция. По оси ординат отложено число ионов кальция, взаимодействующих с соответствующим аминокислотным остатком. Во врезке показаны результаты ускоренной молекулярной динамики.

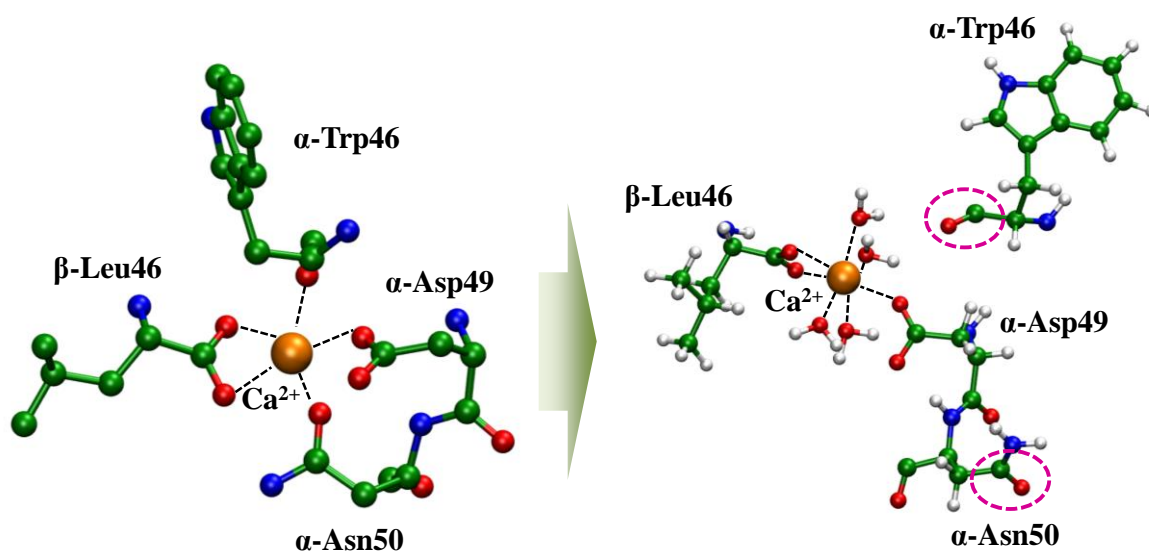


Рис. 1.13. Слева показана координационная сфера кальция в кристаллической структуре 3WMM [53]. Справа – координационная сфера кальция в результате МД расчета.

Другая особенность связана с тем, что структура реакционного центра имеет вогнутость в мембранной области и в случае, когда, как в кристалле, субъединицы LH1 расположены по правильному эллипсу, образуется пустота, которая в сольватированной системе будет заполняться водой, либо липидный бислой будет сжимать кольцо LH1 вокруг RC. Идеальная овальная структура LH1, возможно, образуется из-за особенности кристаллизации (рис. 1.14).

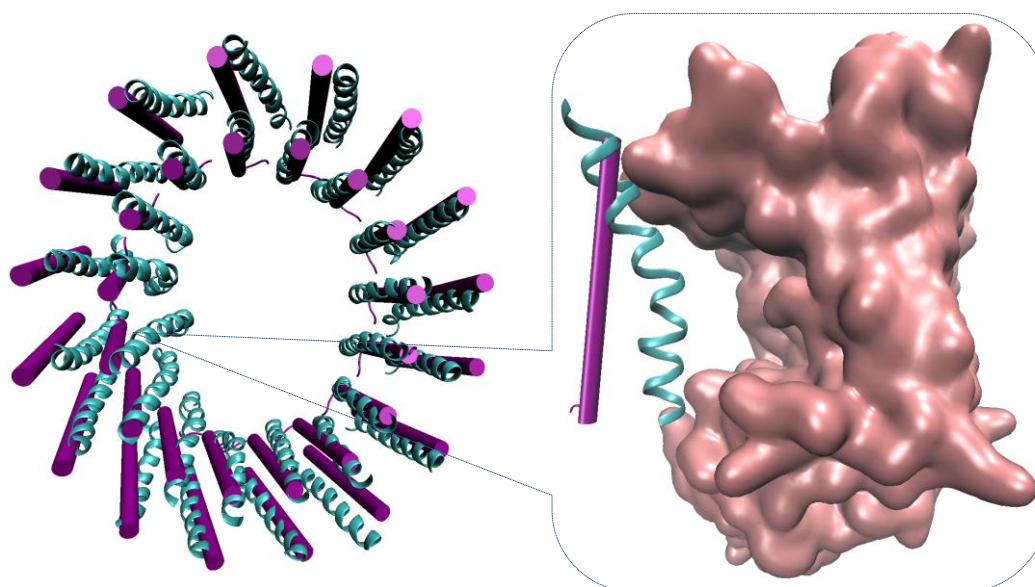


Рис. 1.14. Наложение кольца LH1, полученного в молекулярной модели и в кристалле (PDB ID: 3WMM) голубым и пурпурным, соответственно. На врезке справа розовым показан фрагмент реакционного центра и относительное расположение внутренних спиралей.

1.5. Результаты главы 1

- Предложена общая схема решения задач, состоящая из построения полноатомной модели, описания механизма процесса методами суперкомпьютерного молекулярного моделирования, верификации полученных результатов на основании сравнения с доступными экспериментальными данными, прогнозирования новых систем с заданными свойствами и рекомендаций по дополнительным экспериментальным исследованиям для более полного понимания механизма, а также последующей экспериментальной проверки.
- Проведено моделирование реакции гидролиза пенициллина G пенициллин ацилазой и проанализированы методологические вопросы, связанные с выбором размера КМ подсистемы и способа её описания.
- Показана важность учёта динамики фермент-субстратного комплекса на кинетику реакции в случае, когда субстрат находится на поверхности белка.
- Определены сайты связывания катионов кальция со светособирающей антенной LH1, на основе структурных данных предложена интерпретация повышения термической стабильности.

Глава 2. Цикл моделирования «интерпретация – прогноз» на примере матричной металлопротеиназы 2

Взаимодействие между клетками и межклеточным матриксом играет важную роль в нормальном развитии и дифференциации клеток организма [55]. Изменения в межклеточном матриксе должны строго контролироваться, так как неконтролируемое накопление его компонентов или, наоборот, чрезмерный протеолиз приводят к различным патологиям: болезни Альцгеймера, артриту, образованию опухолей и метастаз [56]. Изменение состава межклеточного матрикса контролируется группой протеолитических ферментов, функция которых заключается в расщеплении различных белков, являющихся компонентами матрикса. Матриксные металлопротеазы (ММР) представляют основную группу этих регуляторных ферментов. В частности, ММР-2 отвечает за расщепление коллагена IV типа [55].

Знание механизма ферментативного гидролиза является необходимым для рационального дизайна ингибиторов, которые впоследствии могут стать терапевтическими препаратами. На сегодняшний день разработаны препараты, основанные на хелатирующей способности небольших органических молекул. Однако такие соединения, как правило, обладают низкой селективностью по отношению к определенному типу ММР, что приводит к нарушению работы других ферментативных каскадов [55,57,58]. Более перспективной является разработка ингибиторов на основе олигопептидов и их миметиков так как они могут обладать большей специфичностью, вызванной протяженной структурой и возможностью взаимодействовать с большим числом сайтов связывания целевого фермента; также, не являясь ксенобиотиками, они будут наносить меньше вреда организму [59].

Так как ММР – цинк-зависимый фермент, моделирование механизма реакции в его активном сайте является более сложной вычислительной задачей, чем в активных центрах без участия ионов металлов, поэтому большое внимание уделяется методическим вопросам.

2.1. Реакция гидролиза модельного олигопептида в активном центре MMP-2

2.1.1. Литературные данные

В работе [60] исследовался каталитический механизм протеолиза в активном центре стромелизина-1 (MMP-3) на примере субстрата N-метилацетамида. В качестве начального приближения был взят механизм, аналогичный каталитическому механизму реакции протеолиза в термолитине [61] (рис. 2.1).

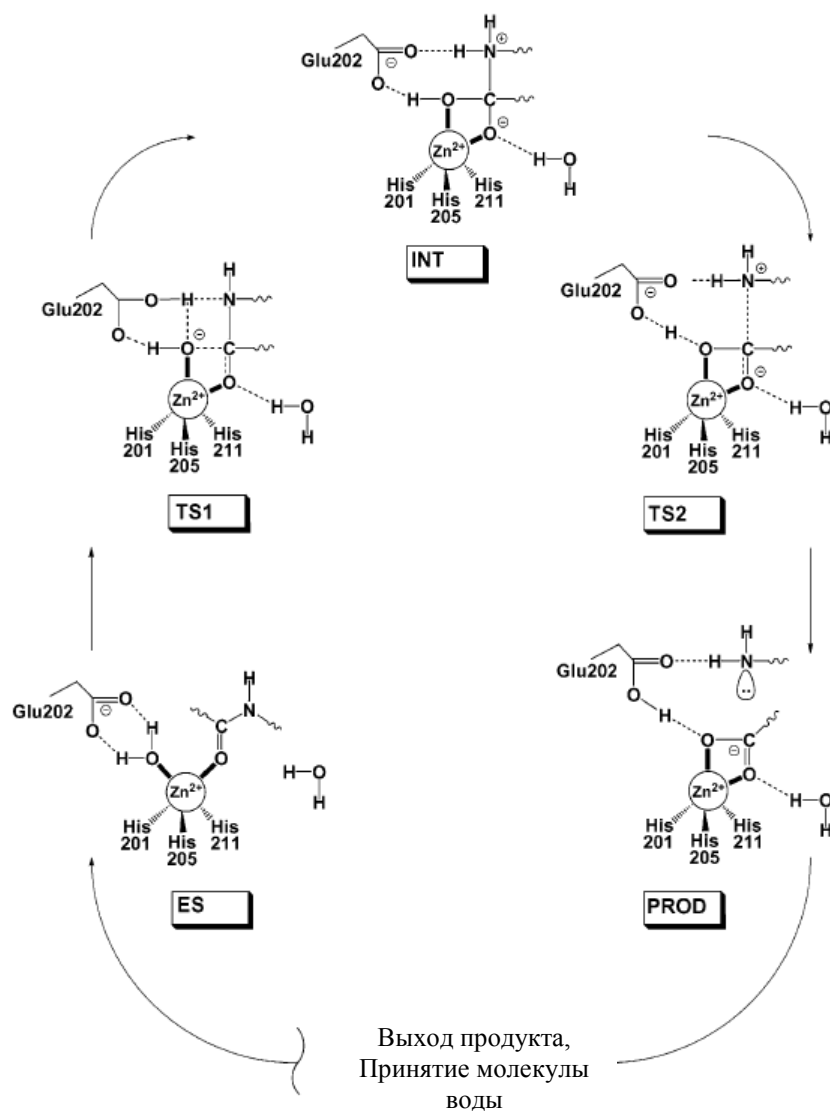


Рис. 2.1. Схема каталитического механизма протеолиза в ферменте MMP-3. Фермент-субстратный комплекс, переходные состояния, интермедиат и комплекс продуктов обозначены как ES, TS1, TS2, INT и PROD, соответственно [60].

Авторы работы [60] проводили изучение трех моделей активного центра в порядке увеличения их сложности. Краткое описание этих моделей приведено в таблице 2.1.

Таблица 2.1. Модельные системы, рассмотренные в работе [60].

Модельная система	Число атомов	Дополнительная молекула воды	Субстрат	Glu202	His201,205,211
A	56	нет	N-метил-ацетамид	бутират	имидазол
B	59	есть	N-метил-ацетамид	бутират	имидазол
B-ONIOM	50	Есть	N-метил-ацетамид	формиат	имидазол

Оптимизация геометрических параметров проводилась в рамках теории функционала электронной плотности с гибридным функционалом B3LYP в базе LANL2DZ, что для атома цинка означает описание остовных электронов с помощью эффективного остовного потенциала Los Alamos и валентных – гауссовыми функциями [62], для остальных атомов – двухэкспонентный базисный набор. Для оптимизированных стационарных точек вдоль координаты реакции проводился более точный расчет энергии в расширенном базисе 6-311G**+. Поправка на энергию нулевых колебаний и энтропийный вклад в энергию рассчитывался для температуры 298.15 K на базе рассчитанных гессианов. Диэлектрическая постоянная была принята равной 4; эффекты диэлектрического окружения оказались в пределах 2 ккал/моль.

Расширенная бутиратная модель глутаминовой кислоты в системах A и B включала всю боковую цепь остатка вместе с альфа-атомом углерода основной цепи. Это было сделано, чтобы ограничить подвижность остатка глутаминовой кислоты в моделях A и B. В систему B-ONIOM были включены атомы углерода основной цепи $N_{xx}G_{xx}H$ ($x - Gly$), ковалентно связанные с каталитическим остатком глутаминовой кислоты и тремя остатками гистидина. Это позволило ограничиться простейшей моделью остатка Glu202 – формиатом (табл. 2.1).

Из рис. 2.2 видно, что добавление молекулы воды, образующей водородную связь с карбонильным кислородом разрываемого фрагмента приводит к стабилизации переходного состояния TS1 на 4.8 ккал/моль и интермедиата INT на 5.5 ккал/моль. Энергия системы B-ONIOM рассчитывалась в рамках двухслойного гибридного метода ONIOM. Внутренний слой описывался так же, как и чисто квантовые модельные системы A и B (DFT/B3LYP/LANL2DZ), энергия внешнего

слоя рассчитывалась полуэмпирическим методом MNDO. Учет влияния окружения привел к дополнительной стабилизации переходного состояния, и барьер реакции составил 16.4 ккал/моль (рис. 2.2).

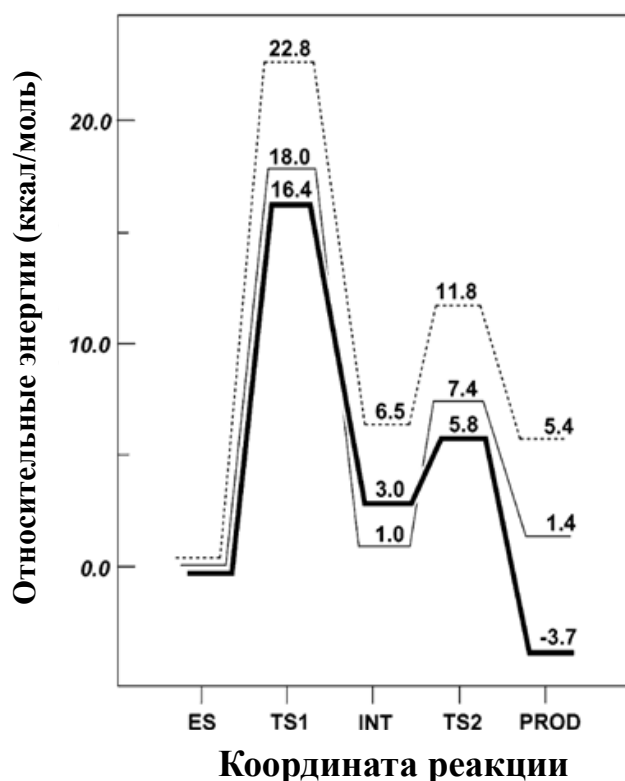


Рис. 2.2. Энергетические профили для систем А (пунктиром), В (сплошной линией) и В-ONIOM (жирным), полученные в рамках теории функционала электронной плотности с гибридным функционалом B3LYP в базе LANL2DZ [60].

Расчет в точке с использованием расширенного базиса 6-311G**+ был проведен для оптимизированных структур, полученных для системы В-ONIOM (рис. 2.3). Наибольший эффект был обнаружен для интермедиата INT, энергия которого повышается на 6.3 ккал/моль. Таким образом, более точный расчет приводит к тому, что переходное состояние TS2, соответствующее непосредственному разрыву связи C-N, становится ниже энергии интермедиата INT. Авторы интерпретируют такой профиль как одностадийный механизм, однако известно, что расчет энергий в точках методами более высокого уровня точности на геометриях, оптимизированных другими методами, может давать непредсказуемый результат. Авторы также отмечают, что из-за ограничений в размере системы, вторая часть реакции (TS2 и далее) может описываться не вполне корректно. В продукте реакции PROD метиламин связан с активным центром фермента лишь слабой водородной связью, в то время как в действительности

продукты реакции остаются в значительной степени связанными с ферментом и их движение ограничено.

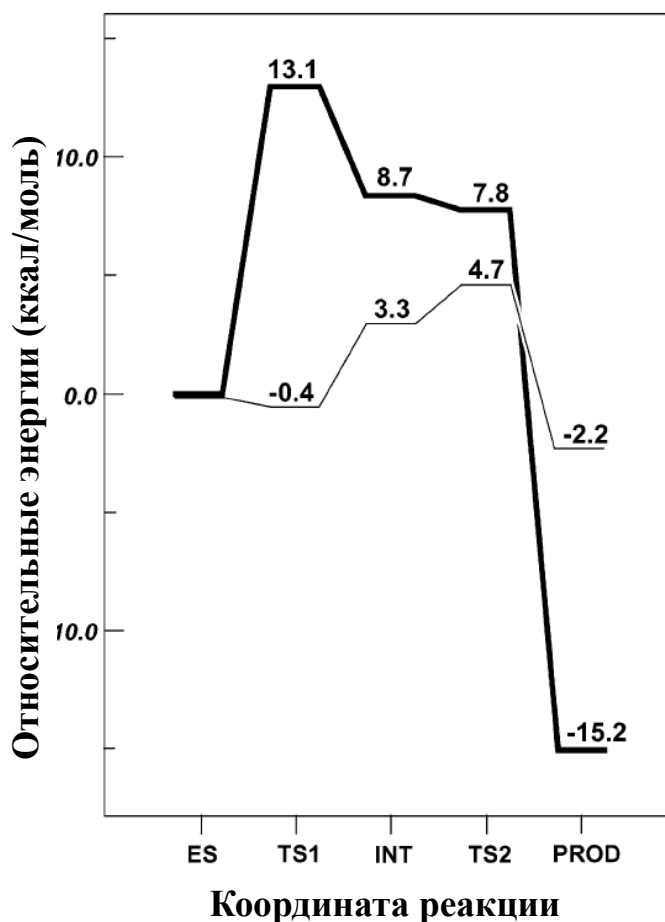


Рис. 2.3. Жирная линия - профиль свободной энергии системы B-ONIOM, полученный на основании расчетов методом DFT с функционалом B3LYP в расширенном базисе 6-311G**+; тонкая линия – вклад в энергию системы B-ONIOM внешнего слоя, энергия которого описывалась методом MNDO [60].

В работе [63] проводилось исследование механизма гидролиза пептидов, катализируемое ферментом MMP-2. Использование двух различных субстратов: Ace-Gly~Ile-Nme и Ace-Gly-Pro-Gln-Gly~Ile-Ala-Gly-Gln-Nme (Pα1) позволило оценить влияние различных факторов на каталитический процесс. Аминокислотная последовательность полипептида Pα1 отвечает α1 цепи коллагена типа I в окружении пептидной связи, гидролизуемой ферментами класса MMP.

Кластерная модель для КМ расчета включала боковые цепи следующих аминокислотных остатков: His403, Glu404, His407, His413, а также ион Zn1, нуклеофильную молекулу воды Wat1 и субстрат Ace-Gly~Ile-Nme. Квантово-механический расчет проводился в рамках теории функционала электронной плотности с гибридным функционалом B3LYP в базисе 6-31G* для атомов

неметаллов и Los Alamos ECP для атома цинка (такой смешанный базис обозначается LACVP*). Чтобы предотвратить движение групп атомом, невозможное в ММР-2, кластерные модели были оптимизированы с ограничениями на движения концевых групп. Переходные состояния были найдены с применением квази-ньютоновского метода. Энтропийный вклад в энергию рассчитывался для температуры 298.15 К.

Подготовка исходной структуры фермент-субстратного комплекса для КМ/ММ расчетов включала в себя докинг, оптимизацию и 20 нс молекулярно-динамического моделирования. Детально данная процедура описана в работе [64]. Из МД траектории были выбраны два кадра, которые подверглись 10000 шагам молекулярно-механической (ММ) оптимизации, после чего система была помещена в шар из молекул воды диаметром 25 Å с центром в Wat1. Квантовая подсистема состояла из 94 атомов и описывалась в том же приближении, что и расчеты в молекулярных кластерах. Оставшаяся часть белка и молекулы растворителя описывалась силовым полем OPLS-AA. В процессе оптимизации геометрических параметров атомы ММ части вдали от КМ области оставались неподвижными.

Электростатические взаимодействия дальнего действия между белком и растворителем были оценены методом Пуассона-Больцмана (PB). Эти расчеты проводились после удаления координат большинства ММ молекул воды в оптимизированных КМ/ММ структурах (только 50 молекул воды, ближайших к каталитическому иону цинка Zn1, было оставлено). Поправки свободной энергии были рассчитаны, объединяя ММ и PB расчеты для статистического ансамбля фермент-субстратных комплексов. Эти структуры были получены посредством классического МД моделирования, выполненного с техникой локально-расширенной выборки, при этом геометрия КМ части фиксировалась в соответствующей стационарной точке. Энергии оптимизированных структур, полученные в результате КМ расчетов, для субстрата Ace-Gly~Ile-Nme приведены на рис. 2.4.

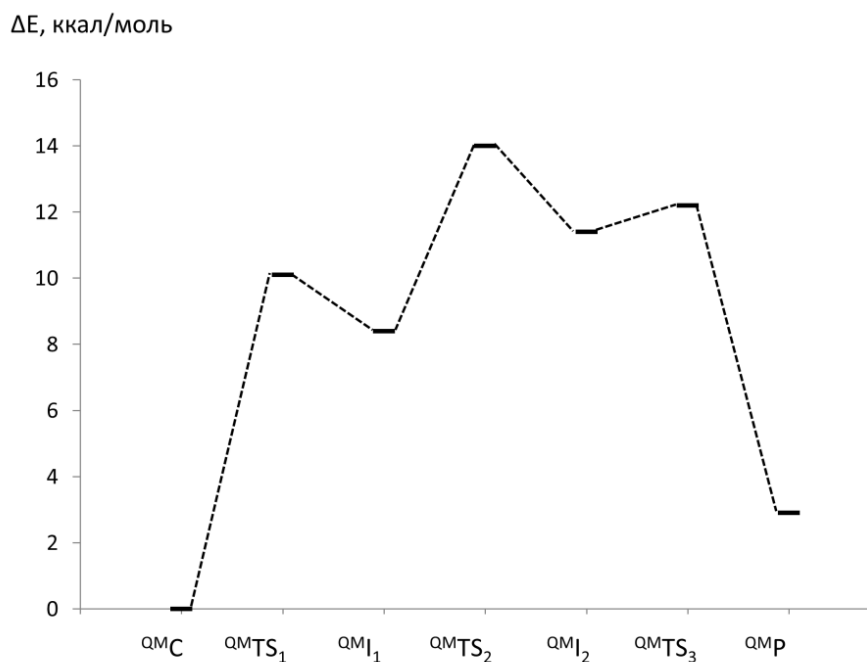


Рис. 2.4. Энергетический профиль реакции гидролиза пептида Ace-Gly-Ile-Nme, катализируемой MMP-2, полученный в результате КМ расчета в молекулярном кластере методом DFT/B3LYP/LACVP* [63].

Чтобы определить роль белкового окружения в каталитическом механизме, в КМ/ММ расчетах использовали модельную систему активного центра MMP-2 с субстратом Ра1. Основные фермент-субстратные взаимодействия представлены на рис. 2.5.

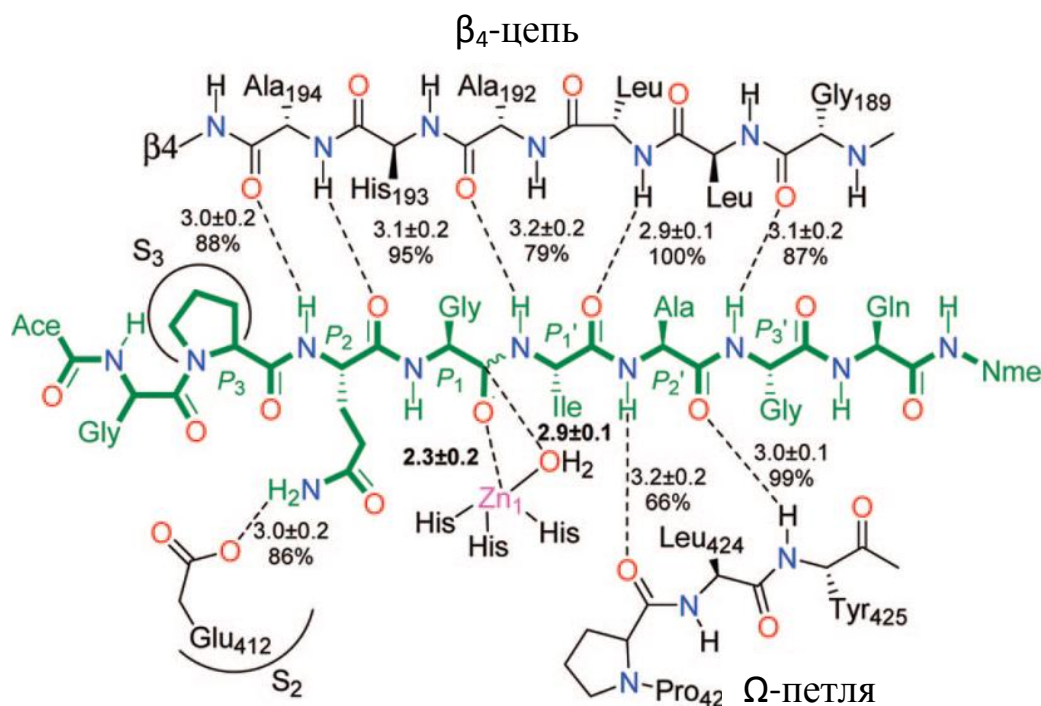


Рис. 2.5. Основные фермент-субстратные взаимодействия в каталитическом центре фермента MMP-2 [63].

При анализе МД траектории было замечено, что остатки Gly(P1)~Pe(P1') труднодоступны для растворителя. Однако в 4.2% кадрах присутствует водяной мостик Gly(P1)-O...H₂O...O-Pro423 со средними расстояниями между атомами кислорода 3.8 и 3.1 Å соответственно. Взаимодействие молекул воды со связанной с цинком карбонильной группой способствует стабилизации переходных состояний и интермедиатов. Поэтому были выбраны два кадра: А – в котором есть водяной мостик между карбонильными группами Pro423 и Gly(P1), и В – в котором водяной мостик отсутствует (отображает наиболее вероятное окружение активной части). Оба КМ/ММ профиля реакции предсказывают одинаковый механизм реакции, который в то же время похож на механизм, полученный для субстрата Ace-Gly~Pe-Nme.

Сравнение кластерных расчетов с профилями КМ/ММ показывает возрастание барьеров в последнем случае. На рис. 2.6 приведены энергетические профили реакции гидролиза Ра1 в активном центре фермента MMP-2.

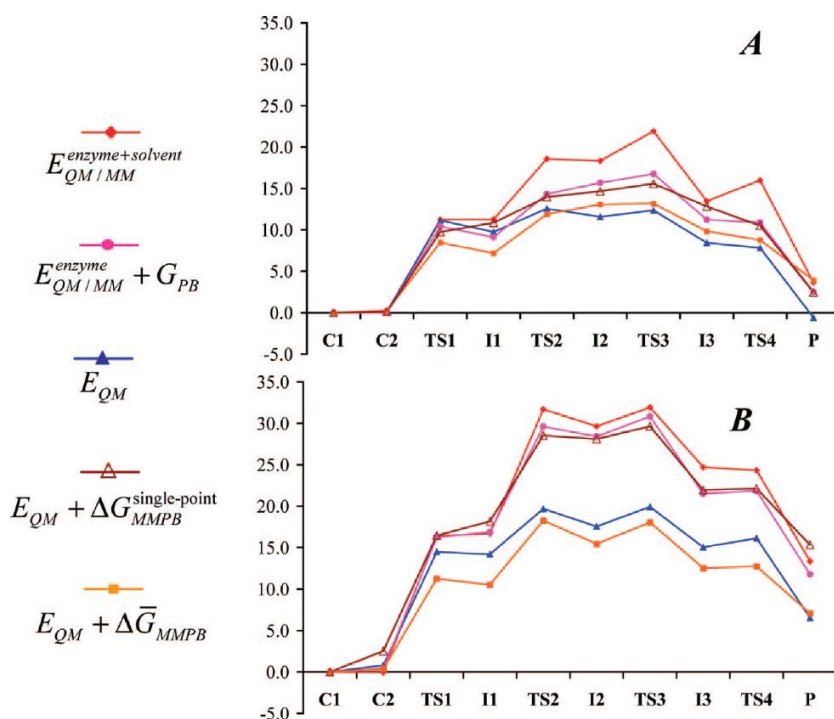


Рис. 2.6. Энергетические профили реакции гидролиза Ра1 в активном центре фермента MMP-2 [63]. $E_{QM/MM}^{enzyme+solvent}$ – относительная энергия КМ/ММ расчета; $E_{QM/MM}^{enzyme}$ – КМ/ММ энергия, рассчитанная в одной точке, для структур, содержащих 50 молекул воды, ближайших к Zn1; G_{PB} – PB расчет в точке; E_{QM} – КМ расчет в точке только для КМ части.; $\Delta G_{MMPB}^{single-point}$ – ММ-PB поправка к свободной энергии, рассчитанная в одной точке; $\Delta \bar{G}_{MMPB}$ – среднее значение ММ-PB поправки к свободной энергии.

Относительная энергия КМ/ММ расчета показывает, что включение в модельную систему белкового окружения дестабилизирует структуры $TS2 \rightarrow I2 \rightarrow TS3 \rightarrow I3 \rightarrow TS4$, связанные с протонированием $Pe(P1')$ -N атома и разрывом C-N связи, на 5-15 ккал/моль, в то время как рассчитанные энергетические барьеры первой стадии (нуклеофильной атаки) сравнимы со значениями кластерного КМ расчета.

Профили свободной энергии в ММР-2 были получены, дополнив КМ энергию реакционной части средним значением ММ-РВ поправки к свободной энергии, рассчитанной на 100 кадрах из МД траектории ($E_{QM} + \Delta\bar{G}_{MMRV}$). Таким образом, величины барьеров свободной энергии для А и В систем составили 13.2 ккал/моль (TS3) и 18.3 ккал/моль (TS2), соответственно. Для системы А был посчитан колебательный вклад в свободную энергию от атомов КМ части. Итоговое значение величины барьера свободной энергии составило 14.8 ккал/моль.

Литературные работы, описанные выше не лишены недостатков, в частности, авторы [60] проводили расчеты в небольших молекулярных кластерах, что накладывало ограничения на геометрические конфигурации так как требовалось фиксировать концевые атомы, также в таком моделировании не учитывалось поле, создаваемое белковой матрицей и полярным растворителем. В работе [63] авторы выполнили кластерные и КМ/ММ расчеты профилей, однако последние кажутся не очень убедительным. Главным образом это связано с отсутствием стабилизированных интермедиатов. Такие проблемы, в частности, могут быть связаны с неудачной исходной структурой фермент-субстратного комплекса. При подготовке структуры авторы проводили предварительный расчет методом классической молекулярной динамики; неадекватное описание структуры активного центра, содержащего катион цинка, классическими силовыми полями могло привести к сильному искажению структуры. Все недостатки предыдущих работ были учтены в данной работе и подробно разобраны.

2.1.2. Профиль потенциальной энергии реакции гидролиза модельного субстрата в активном центре ММР-2

Для моделирования реакции протеолиза использовалась кристаллическая структура каталитического домена ММР-2 в комплексе с ингибитором

(PDB ID: 1QIB) [65]. Ингибитор удалялся и его место занимал модельный олигопептидный субстрат Ace-Gln-Gly-Ile-Ala-Gly-Nme, имитирующий натуральный. Модельная система была сольватирована 16 871 молекулами воды и уравновешена в классической МД с фиксированной областью вокруг активного центра. После этого сольватная оболочка уменьшалась для последующих расчетов методом КМ/ММ. Все расчеты в этой главе выполнялись методом КМ/ММ в варианте электронного внедрения, протокол расчета КМ и ММ частей менялся. Размер КМ подсистемы составил 96 атомов; вся система составила 6 654 атомов. В ходе оптимизации геометрических параметров фиксированными оставались атомы на расстоянии более 6 Å от любого из атомов КМ части. Все результаты по структурным параметрам относятся к протоколу PBE0-D3/6-31G**/CHARMM.

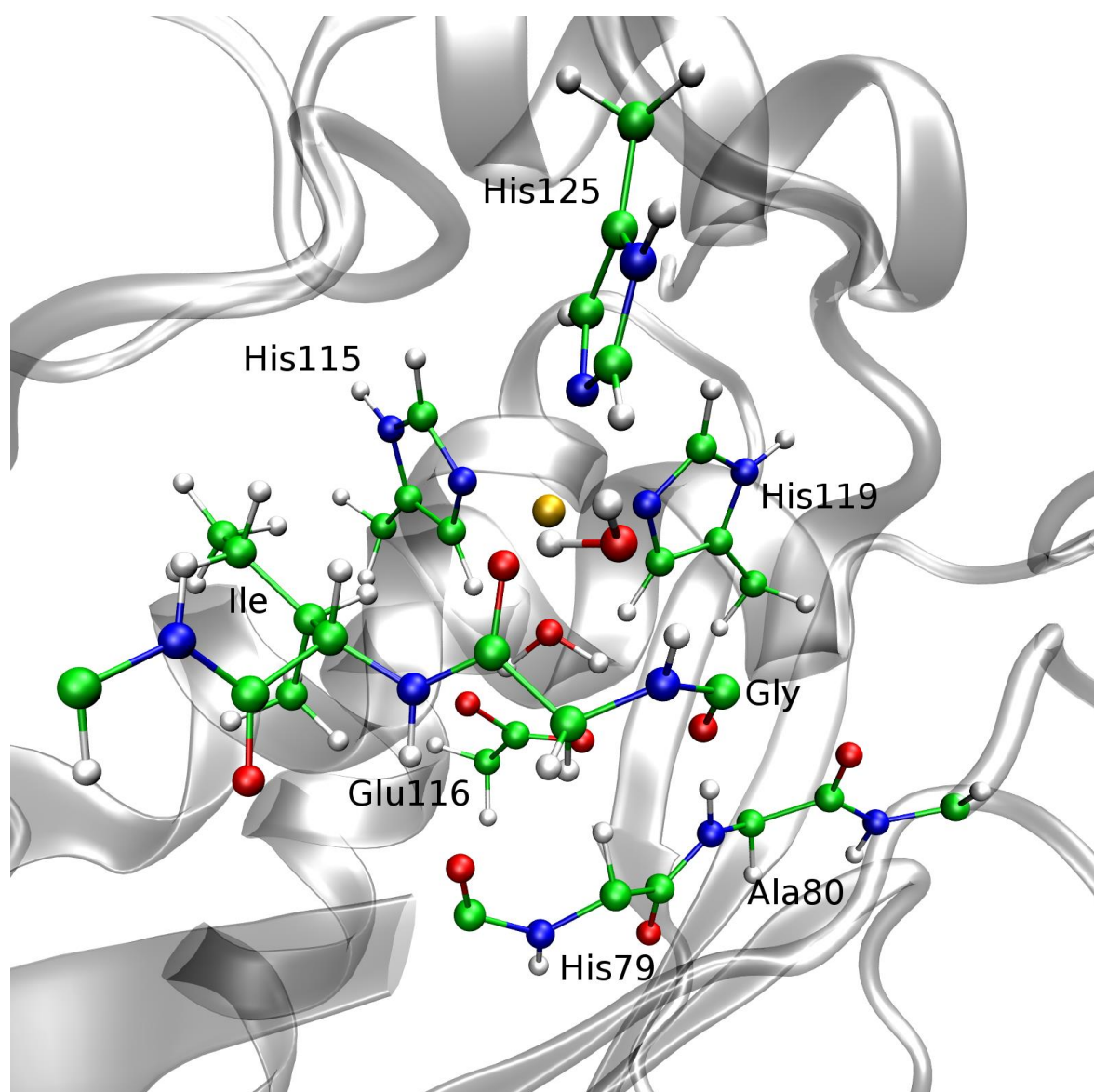


Рис. 2.7. КМ подсистема, использованная в расчетах.

Общая схема гидролиза ММР-2 показана на рис. 2.8. В фермент-субстратном комплексе каталитическая молекула воды ориентирована глутаминовой кислотой, атомом кислорода основной цепи фермента и катионом Zn^{2+} для нуклеофильной атаки атома углерода субстрата; субстрат при этом фиксируется водородными связями с ферментом, а также карбонильный атом кислорода разрываемого фрагмента ориентирован катионом цинка, что приводит к дополнительному снижению электронной плотности на карбонильном атоме углерода (рис. 2.9). Все эти факторы создают выгодные для реакции условия [66].

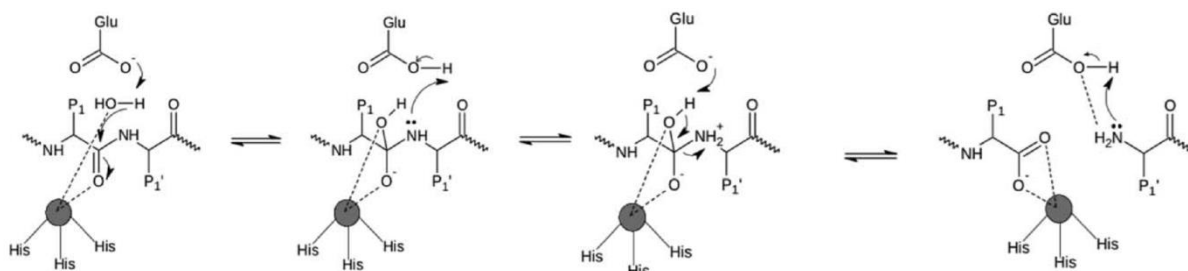


Рис. 2.8. Общая схема реакции гидролиза олигопептида в активном центре матричной металлопротеиназы-2.

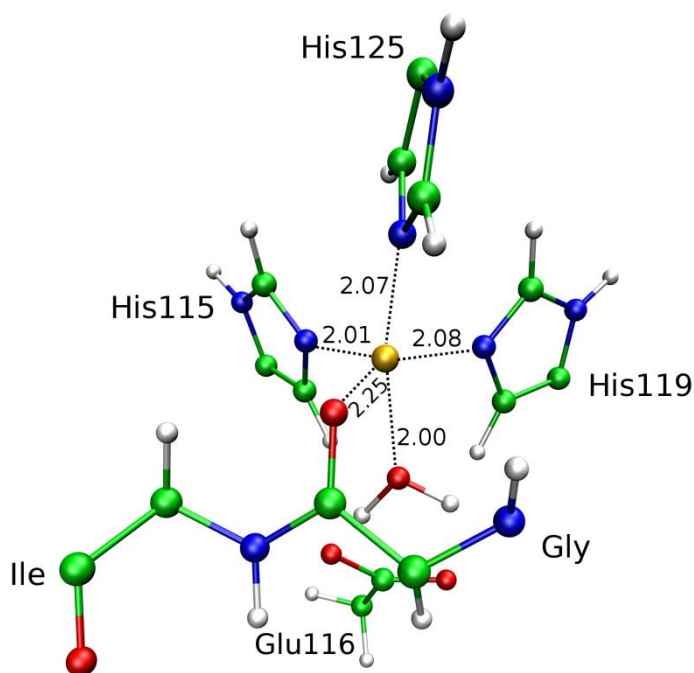


Рис. 2.9. Равновесная геометрическая конфигурация фермент-субстратного комплекса. Здесь и далее длины связей указаны в ангстремах, зеленым, синим, красным, белым и желтым показаны атомы углерода, азота, кислорода и цинка, соответственно.

В результате первой стадии образуется тетраэдрический интермедиат, координированный катионом цинка (рис. 2.10). Далее происходит переориентация сетки водородных связей, перенос протонов и разрыв связи C-N, что и завершает гидролиз (рис. 2.10).

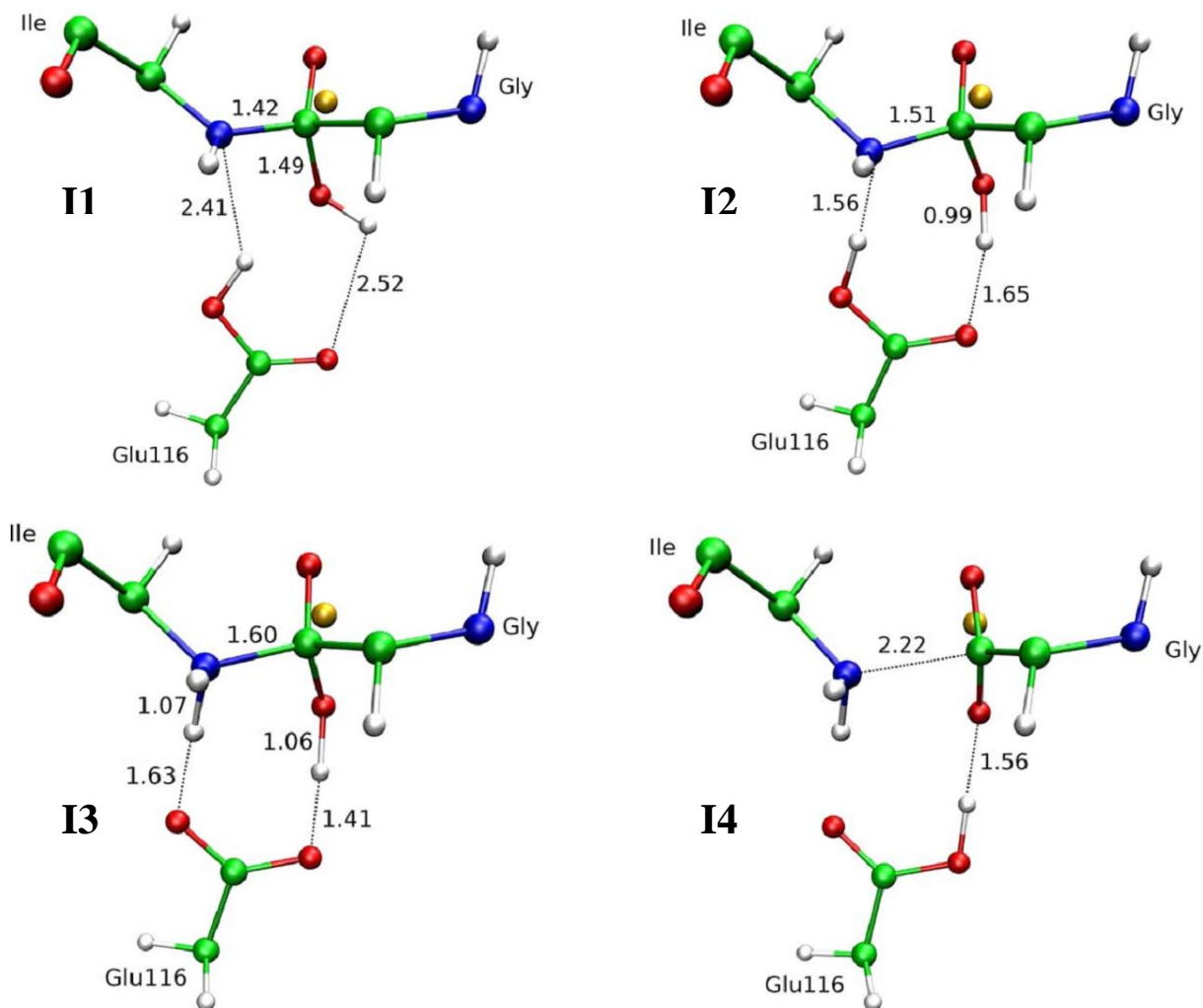


Рис. 2.10. Интермедиаты I1, I2, I3, I4 реакции гидролиза модельного субстрата в MMP-2, полученные методом PBE0-D3/6-31G**/CHARMM.

На рис. 2.11 показаны сечения поверхности потенциальной энергии, полученные с разными протоколами расчета. Наибольший барьер соответствует стадии нуклеофильной атаки и составляет 6-10 ккал/моль в зависимости от выбранного функционала, при этом равновесные геометрические параметры практически совпадают. Также были проведены расчеты энергий в точках методом DLPNOCCSD(T)/def2-TZVP/CHARMM для равновесных геометрических конфигураций, полученных в приближении PBE0-D3/6-31G**/CHARMM. Сходство полученных профилей также свидетельствует об адекватности полученной модели.

В результате реакции образуются два продукта – С-продукт, содержащий карбоксильную группу в месте разрыва связи, и N-продукт с аминогруппой. При этом каталитическая кислота Glu116 оказывается в протонированной форме (рис. 2.10). Такая структура не может считаться окончательным продуктом реакции, так как в результате каталитического акта катализатор (т.е. в данном случае активный центр фермента) должен возвращаться в исходную форму.

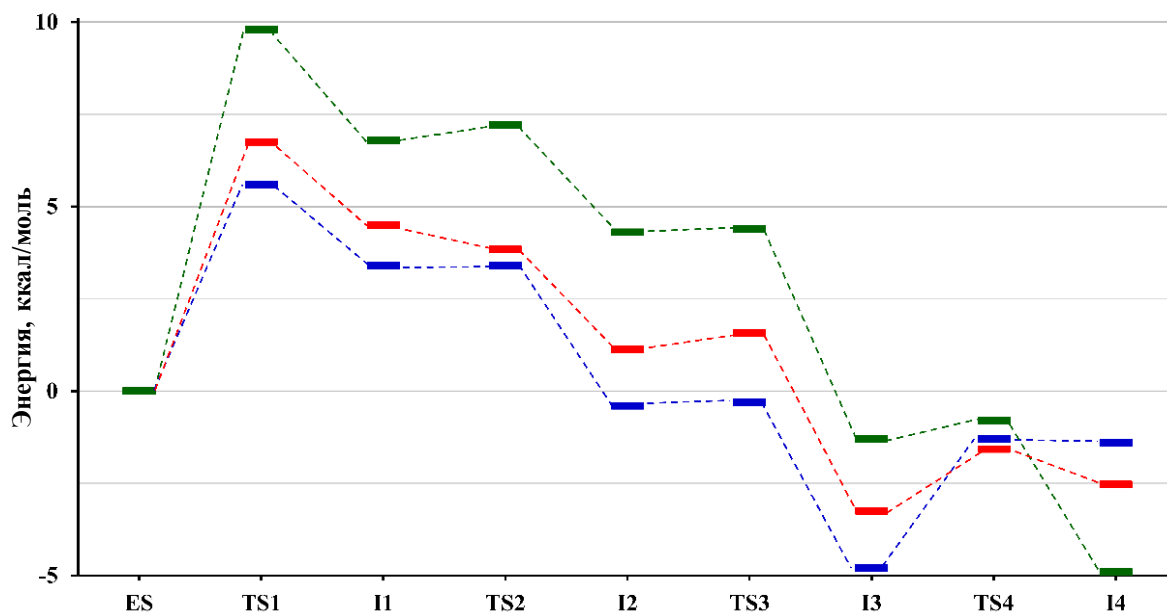


Рис. 2.11. Сечения поверхности потенциальной энергии реакции гидролиза модельного субстрата MMP-2, полученные методами PBE0-D3/6-31G**/CHARMM (синим), B3LYP/6-31G**/CHARMM (зеленым) и DLPNOCCSD(T)/def2-TZVP/CHARMM//PBE0-D3/6-31G**/CHARMM (красным).

2.1.3. Влияние начальной структуры на профиль реакции

Классические МД расчеты зачастую применяются для создания геометрической конфигурации начального приближения в последующих КМ/ММ расчетах. Однако параметры силового поля для активного центра фермента, как правило, отсутствуют, поэтому одним из подходов является фиксирование координат активного центра в МД расчете или самостоятельный подбор параметров. Этим проблемам можно избежать, если проводить молекулярно-динамический расчет фермент-субстратного комплекса с КМ/ММ потенциалами. Такой расчет был проведен с длиной траектории 12 пс, без ограничений на движения атомов. Из траектории выбирались 6 кадров, причем некоторые из них выбирались случайным образом, а другие – после визуальной инспекции

структуры активного центра. Для всех полученных структур ES комплексов проводилась оптимизация геометрических параметров и строился профиль ППЭ для первой стадии реакции (рис. 2.12)[67].

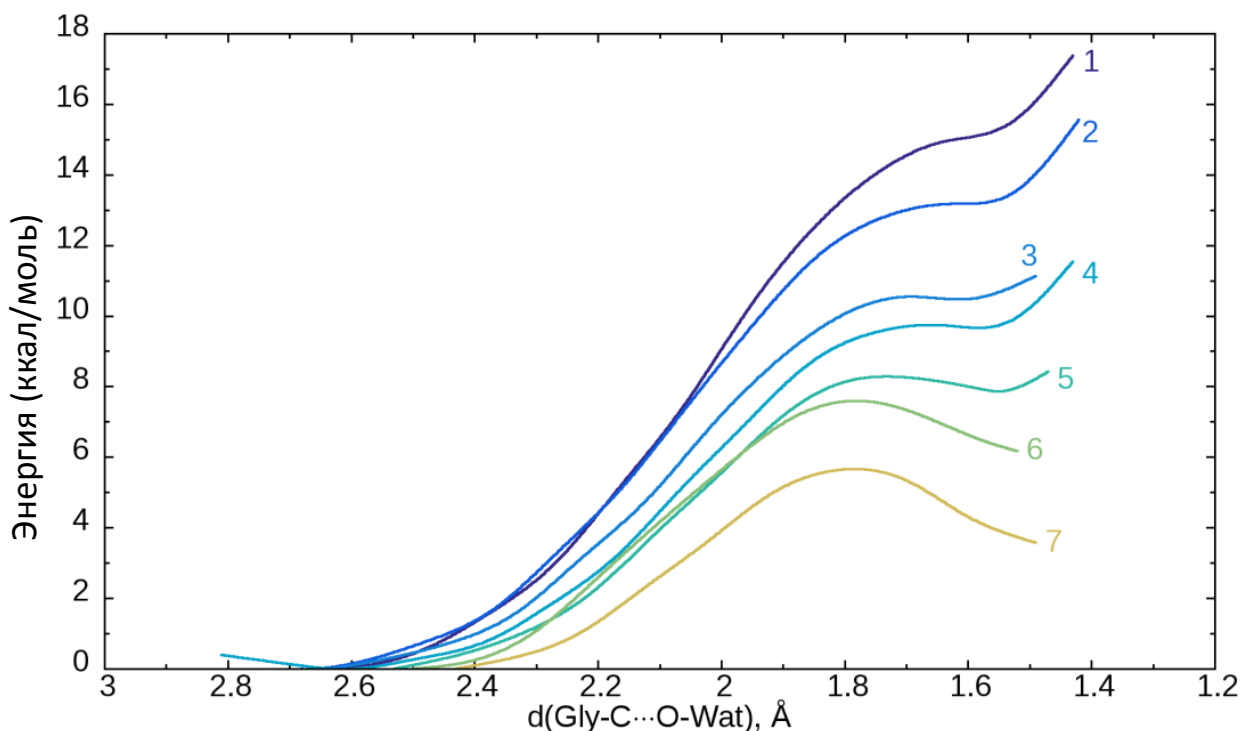


Рис. 2.12. Сечения поверхности потенциальной энергии первой стадии реакции, рассчитанные методом PBE0-D3/6-31G**/CHARMM. Кривая 7 соответствует профилю, представленному на рис. 2.10.

Анализируя полученные профили, исходные ES комплексы можно разделить на реакционные и нерекционные. К первой группе относятся профили 6 и 7, характеризующиеся небольшим барьером и стабилизированным интермедиатом II. Для профилей 1 и 2 не удалось найти равновесные геометрические конфигурации, соответствующие II. На профилях 3, 4 и 5 удалось локализовать переходное состояние и первый интермедиат, однако последний практически не стабилизирован относительно переходного состояния, поэтому такие профили также стоит отнести к нерекционным.

Выбор стартовых геометрических параметров оказывает существенное влияние на получаемые профили, и только тщательная визуальная инспекция может помочь в выборе адекватного начального приближения. Основываясь на анализе литературных данных, а также проведённых в данной работе расчетов, становится понятным, что предварительные расчеты методом классической молекулярной динамики ухудшают стартовую структуру.

Важным вопросом является поиск причины, по которой похожие на первый взгляд фермент-субстратные комплексы так сильно различаются в смысле возможности проведения каталитического акта (рис. 2.13). Детальный анализ геометрических конфигурации показал наличие трех важных параметров (табл. 2.2). В типичных нереакционных комплексах ES расстояния Gly-C...O-Wat и Zn...O-Gly увеличены, а координационная связь Zn...O-Wat, наоборот, короче. В структурах интермедиатов, напротив, меньшие значения координационной связи Zn...O-Wat соответствуют реакционным комплексам, а большие – нереакционным (табл. 2.3).

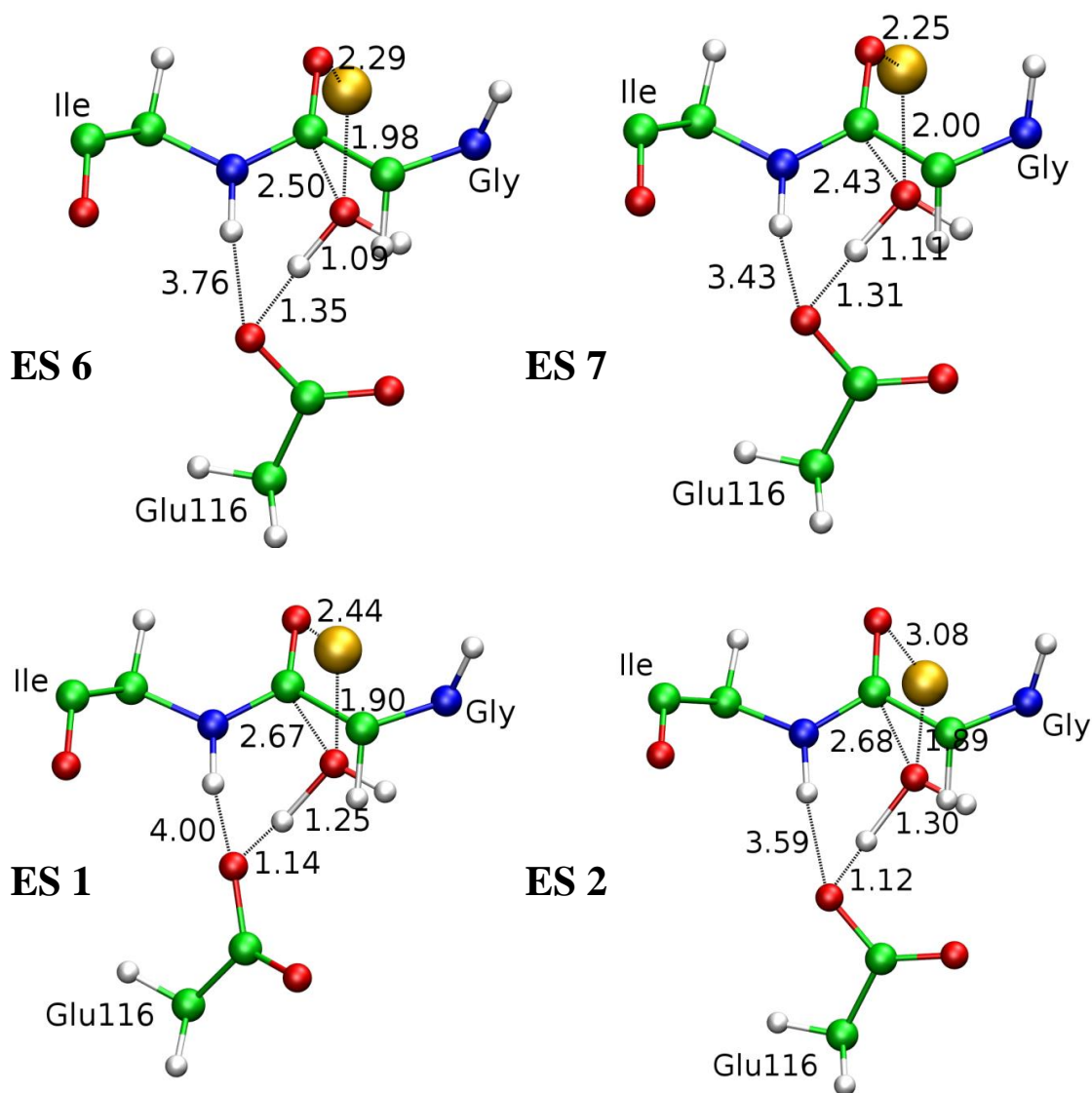


Рис. 2.13. Реакционные (сверху) и нереакционные (снизу) ES комплексы. Номера обозначены соответствующие им потенциальные кривые на рис. 2.12.

Таблица 2.2. Ключевые геометрические параметры комплексов ES.

№ профиля Расстояние, Å	№ профиля						
	1	2	3	4	5	6	7
Zn•••O-Gly	2.44	3.08	3.05	2.55	2.40	2.29	2.25
Zn•••O-Wat	1.90	1.89	1.91	1.91	1.93	1.98	2.00
Gly-C•••O-Wat	2.67	2.68	2.63	2.49	2.53	2.50	2.43

Таблица 2.3. Ключевые геометрические параметры интермедиатов I.

№ профиля Расстояние, Å	№ профиля						
	1	2	3	4	5	6	7
Zn•••O-Gly	1.98	2.02	2.00	2.01	1.93	1.93	1.93
Zn•••O-Wat	2.15	2.13	2.15	2.14	2.33	2.31	2.42
Gly-C•••O-Wat	1.64	1.63	1.59	1.64	1.55	1.52	1.49

2.1.4. Влияние размера сольватной оболочки на профиль реакции

Поскольку активный центр матричной металлопротеиназы находится на поверхности белка (рис. 2.14), и субстрат обращен одной из своих сторон к молекулам растворителя, необходимо правильно учитывать сольватацию реакционного комплекса.

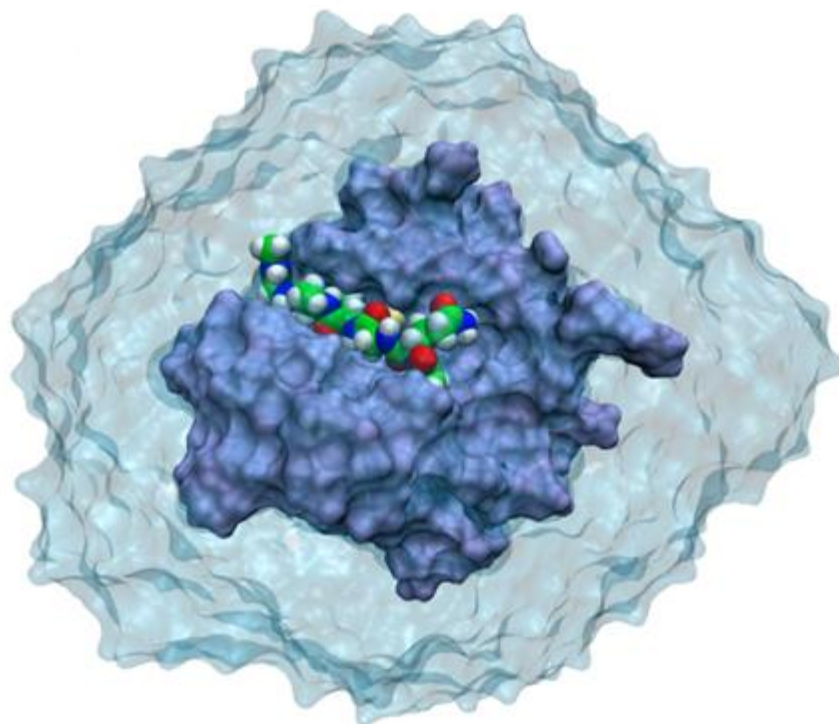


Рис. 2.14. Атомы олигопептидного субстрата показаны сферами. MMP-2 – тёмно-синей изоповерхностью, а сольватная оболочка глубиной 12 Å – голубым.

На рисунке 2.15 приведены профили поверхности потенциальной энергии, полученные из одной и той же стартовой структуры с различными толщинами сольватной оболочки. Для минимальной сольватной оболочки (2 Å) или в случае ее полного отсутствия (0 Å) наблюдается низкий энергетический барьер и практически изоэнергетическое положение ES и II. Расширение сольватной оболочки до 3 Å приводит к увеличению барьера и практически полному отсутствию стабилизации II. Последующее расширение приводит к постепенному снижению величины энергетического барьера и стабилизации интермедиата. Для того чтобы проверить насыщение при толщине водной оболочки в 12 Å были также проведены расчеты методом SMBP [68]. Этот подход предполагает разделение ММ части на 2 фрагмента, внутренний, который описывается в явном виде, и внешний, описываемый граничным потенциалом и диэлектрической проницаемостью. В нашем случае во внутреннюю область попали фрагменты, расположенные на расстоянии 16 Å от иона цинка, а внешняя область описывалась потенциалом, создаваемым 80 точечными зарядами, полученными из разложения на сетке с линейным размером ячейки 1.25 Å потенциала, создаваемого внешними частицами. Внешняя часть растворителя описывалась с помощью диэлектрической постоянной

равной 80, а макромолекулы – 1. Профиль, полученный в рамках подхода SMBP практически идентичен профилю, полученному для системы с сольватной оболочкой 12 Å, поэтому такой размер считается достаточным для расчетов.

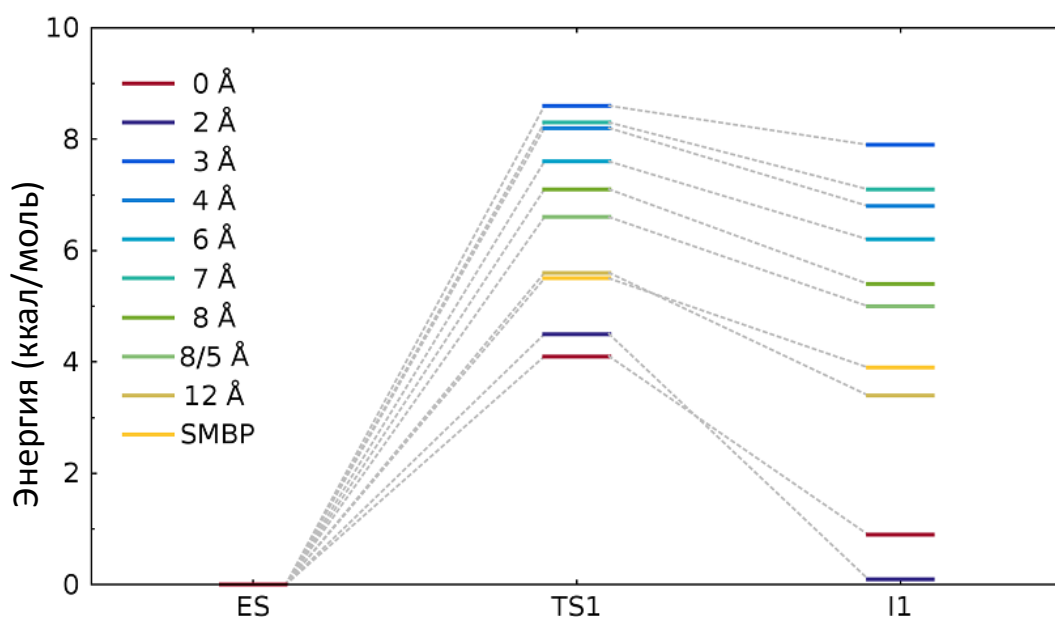


Рис. 2.15. Влияние размера сольватной оболочки на профиль ППЭ первой стадии реакции.

Для того чтобы понять причины отличий полученных профилей, были проанализированы равновесные геометрические конфигурации фермент-субстратных комплексов (табл. 2.4). Для системы без сольватной оболочки и с сольватной оболочкой 2 Å наблюдается искажение фермент-субстратного комплекса, например, меняется конформация остатка His125 (двугранный угол вокруг связи C β -C γ изменяется от величины порядка 90°, характерной для остальных модельных систем, до 130°). В условиях минимальной сольватной оболочки у дополнительной молекулы воды Wat* нет достаточного количества партнеров по водородным связям, в результате чего образуется чрезмерно короткая водородная связь с карбонильным кислородом субстрата (табл. 2.4). С другой стороны такие взаимодействия сильно стабилизируют отрицательный заряд на атоме кислорода, что приводит к понижению энергии I1.

Таблица 2.4. Расстояние Gly-O...H-Wat* (в Å) в системах с различными сольватными оболочками (столбцы соответствуют разным толщинам оболочек).

	0 Å	2 Å	3 Å	4 Å	6 Å	7 Å	8 Å	12 Å
ES	1.77	1.71	2.22	2.39	1.96	2.09	2.05	1.92
II	1.63	1.63	1.92	1.80	1.82	1.88	1.86	1.80

2.1.5. Выбор протокола расчета ППЭ

В предыдущем разделе было показано, что протокол PBE0-D3/6-31G**/CHARMM является удовлетворительным для описания профиля поверхности потенциальной энергии. Однако такой вычислительный протокол слишком затратный чтобы использовать его для построения сечения поверхности свободной энергии, то есть проведения молекулярно-динамических расчетов с КМ/ММ потенциалами. Поэтому в работе были проведены исследования по поиску менее затратных с точки зрения ресурсов методов, способных адекватно воспроизводить профили потенциальной энергии. Были рассмотрены полуэмпирические методы AM1, PM3, MNDO, MNDO/d и метод функционала электронной плотности с двумя функционалами из группы GGA (generalized gradient approximation, приближение обобщенных градиентов): PBE и BLYP. Все расчеты проводились, начиная с равновесной геометрической конфигурации фермент-субстратного комплекса, полученного в приближении PBE0-D3/6-31G**/CHARMM (рис. 2.9).

Полуэмпирические методы PM3, MNDO и MNDO/d привели к заметному искажению структуры фермент-субстратного комплекса, а метод AM1 и оба GGA функционала показали удовлетворительные результаты с точки зрения описания равновесных геометрических параметров (табл. 2.5).

Таблица 2.5. Ключевые геометрические параметры, полученные для фермент-субстратных комплексов в КМ/ММ расчетах с различными способами описания КМ части.

Протокол расчета \ Расстояние, Å	Zn•••O-Gly	Zn•••O-Wat	Gly-C•••O-Wat
PBE0-D3/6-31G**	2.25	2.00	2.43
BLYP-D3/6-31G**	2.29	2.02	2.44
PBE-D3/6-31G**	2.30	2.00	2.43
PBE-D3/6-31G*	2.33	1.97	2.39
PBE-D3/6-31G	2.38	2.02	2.44
AM1	2.38	2.26	2.37
PM3	4.29	2.16	2.97
MNDO	2.06	2.17	2.88
MNDO/d	2.05	2.12	2.86

Для оставшихся трех методов: полуэмпирического AM1 и DFT с двумя различными GGA функционалами – были построены профили первой стадии реакции. В случае AM1 первый интермедиат оказался ниже по энергии, что находится в противоречии с результатами расчетов более высокого уровня точности (рис. 2.16).

Для функционалов PBE и BLYP были взяты двухэкспонентные базисные наборы с поляризационными функциями на всех атомах и проведены расчеты профиля ППЭ первой стадии реакции. В случае функционала BLYP не удалось локализовать стационарную точку, соответствующую интермедиату II. В случае расчета ППЭ в рамках PBE-D3/6-31G**/CHARMM стабилизация II была незначительная, однако, в целом, профиль больше всего соответствовал посчитанному в рамках PBE0-D3/6-31G**/CHARMM. В дальнейшем рассматривались только различные варианты протоколов с функционалом PBE (рис. 2.16).

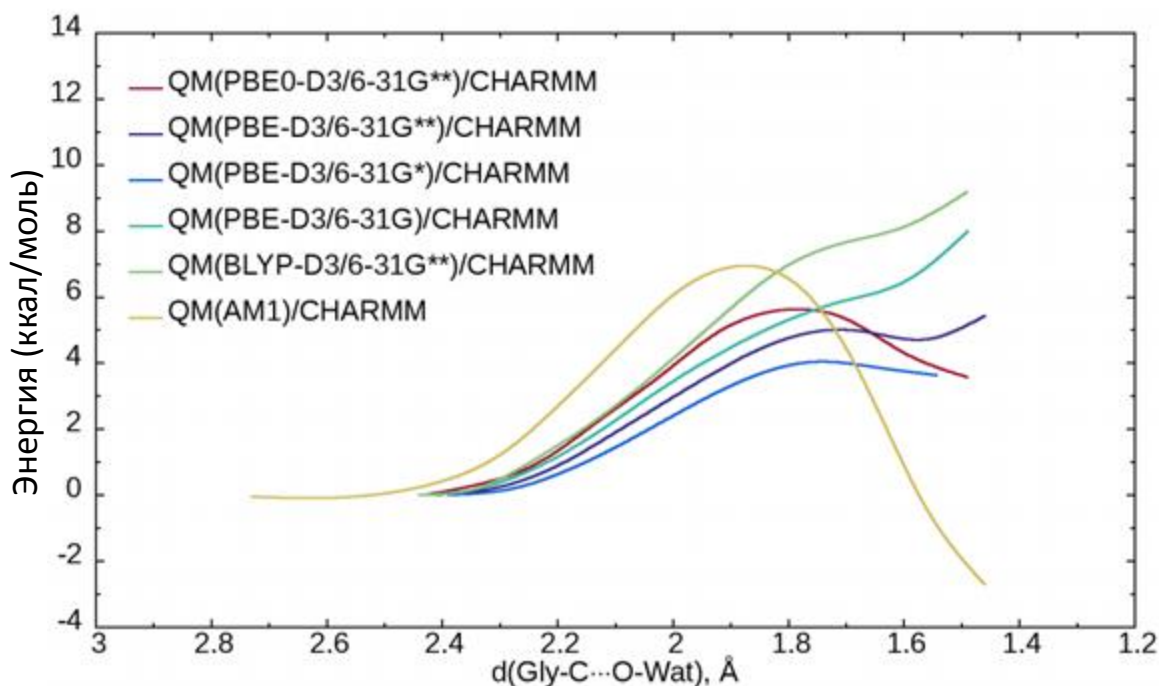


Рис. 2.16. Профили потенциальной энергии для первой стадии, полученные для фермент-субстратных комплексов в КМ/ММ расчетах с различными способами описания КМ части.

Анализ влияния поляризационных функций в расчетах с функционалом PBE в базисных наборах показал, что, в целом, геометрии комплексов ES получаются похожими во всех трех случаях: с базисами 6-31G, 6-31G* и 6-31G**. Во всех случаях наблюдается увеличение длины координационной связи Zn...O-Gly по сравнению с референсной структурой. Добавление поляризационных функций только на тяжелые атомы приводит к профилю ППЭ похожему на полученный в приближении PBE-D3/6-31G**/CHARMM, однако полное отсутствие поляризационных функций приводит к отсутствию на ППЭ стационарной точки П. Таким образом, ни один из рассмотренных подходов не является подходящим для корректного описания ППЭ.

В последнее время широкую популярность приобрел полуэмпирический вариант метода функционала электронной плотности DFTB (Self-Consistent-Charge Density-Functional Tight-Binding, SCC-DFTB) [69]. Этот подход значительно сокращает время расчета так как в нем применяется ряд приближений при описании электронной структуры, вводится набор эмпирических параметров. Особенностью этого метода является то, что параметры подбираются для наилучшего соответствия расчетам DFT, но не описания экспериментальных

величин. Вслед за методом DFTB второго порядка (DFTB2) недавно появился метод DFTB третьего порядка (DFTB3), в котором добавились дополнительные параметры для улучшения описания водородных связей и локализованных зарядов [70]. Также к настоящему моменту разработан набор параметров ЗОВ для наиболее часто встречающихся атомов (H,C,N,O,P,S) [71,72] и ионов металлов [73], в частности, Zn^{2+} , что делает возможным применение такого метода для изучения ферментативных процессов, включая реакции в металлопротеинах.

Оба варианта DFTB были проверены на нашей системе (рис.2.17, табл. 2.6) [74]. Подход DFTB2 показал себя гораздо лучше, так как при описании профиля методом DFTB3 не удалось получить структуру для интермедиата II. Основное отличие DFTB3 от DFTB2 связано с наличием новых эмпирических параметров. В работе варьировались эти параметры, а именно ζ и производные Хаббарда, однако это не привело к улучшению результатов. Дальнейшие расчеты проводились методом КМ/ММ в варианте DFTB2/CHARMM.

Уже на первой стадии видны отличия в равновесных геометрических параметрах II. Расстояние Zn...O-Wat удлинено на 0.27 Å по сравнению с референсным значением. В профиле, полученном в рамках DFTB2, отсутствует интермедиат I2, и практически безбарьерные стадии 2 и 3 заменяются стадией с барьером около 6 ккал/моль, при этом геометрические параметры стационарной точки I3 отличаются значительно. В референсном расчете на 4 стадии происходит разрыв C-N связи субстрата, сопряженный с переносом протона с атома кислорода глицина на каталитический глутамат, что приводит к повышению энергии системы. В расчетах в рамках DFTB2 связь C-N рвется на предыдущей стадии, то есть на последней стадии происходит только перенос протона.

Таблица 2.6. Ключевые расстояния в стационарных точках вдоль реакционных путей, полученных методами PBE0-D3/6-31G**/CHARMM (обозначено PBE0 в таблице), DFTB2/3OB/CHARMM (DFTB2) и DFTB3/3OB/CHARMM (DFTB3).

ES				I1			
Расстояние, Å	PBE0	DFTB2	DFTB3	Расстояние, Å	PBE0	DFTB2	
Zn•••O-Gly	2.22	2.21	2.24	Zn•••O-Gly	1.93	1.92	
Zn•••O-Wat	2.02	2.15	2.23	Zn•••O-Wat	2.41	2.68	
Gly-C•••O-Wat	2.43	2.49	2.51	Gly-C•••O-Wat	1.49	1.56	
I3				I4			
Расстояние, Å	PBE0	DFTB2	DFTB3	Расстояние, Å	PBE0	DFTB2	DFTB3
Zn•••O-Gly	2.01	1.99	2.03	Zn•••O-Gly	2.01	1.94	1.98
Zn•••O-Wat	2.18	2.65	2.62	Zn•••O-Wat	2.28	2.85	2.78
Gly-C•••O-Wat	1.38	1.34	1.36	Gly-C•••O-Wat	1.28	1.27	1.29

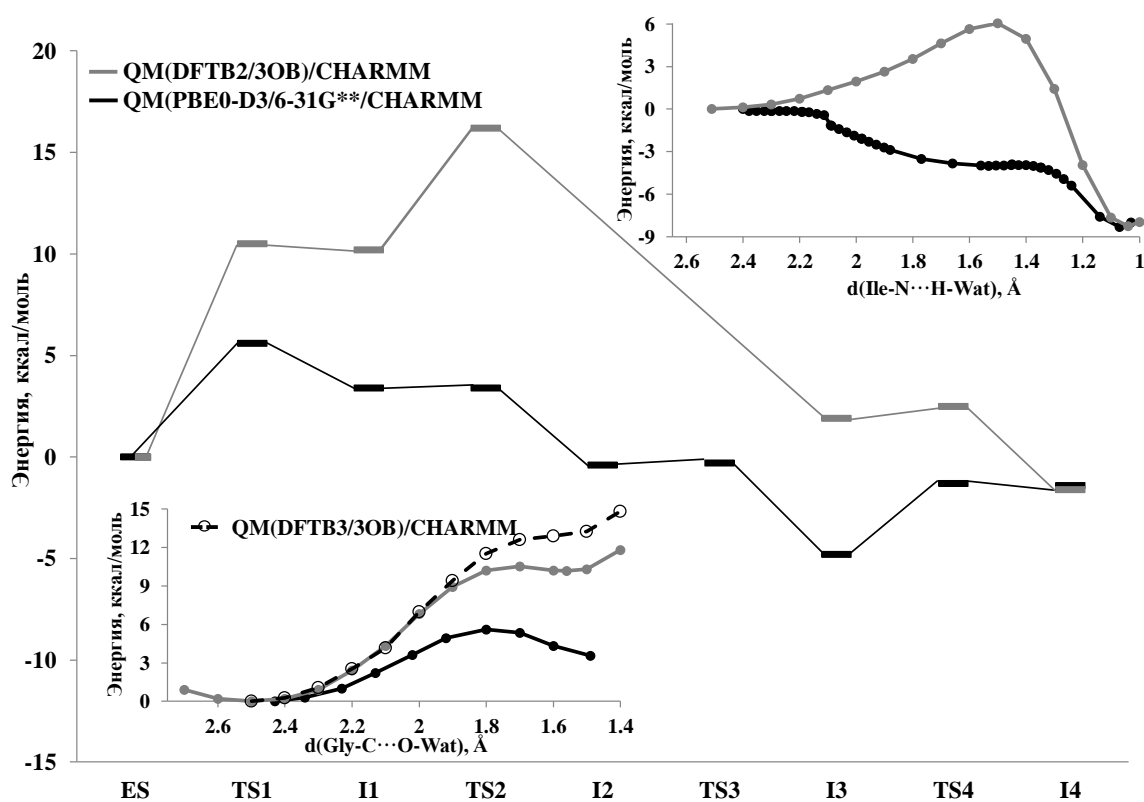


Рис. 2.17. Профили поверхностей потенциальной энергии. Во врезке слева показан профиль для первой стадии, справа: ППЭ для второй и третьей стадий.

Полученные профили ППЭ значительно различаются, отличаются и равновесные геометрические конфигурации минимумов ППЭ и их число. Это делает невозможным применение такого подхода для расчетов профиля свободной энергии.

Ещё один популярный на сегодняшний день подход связан с применением комбинированных базисов гауссовых функций и плоских волн с псевдопотенциалами на остовных электронах в сочетании с GGA функционалами для описания квантовой подсистемы при изучении профилей свободной энергии [75–78]. В рамках протокола PBE-D3/TZV2P-GPW/CHARMM были рассчитаны все сечения поверхности потенциальной энергии для первой стадии процесса, начиная с равновесных геометрических конфигураций, описанных в предыдущем разделе. На рис. 2.18 показан набор профилей, полученных в приближении PBE-D3/TZV2P-GPW/CHARMM (нумерация аналогична рис. 2.12). Видно, что порядок следования профилей сильно отличается, также как и величины барьеров. Основная проблема снова связана с тем, что в большинстве случаев не удается найти стационарную точку, соответствующую Π , а там, где она есть, её энергия практически совпадает с энергией переходного состояния.

Подводя итог, можно утверждать, что для цинк-зависимых ферментов типа матриксных металлопротеиназ нельзя использовать менее затратные с точки зрения вычислений методы, рассмотренные в данной части работы, а необходимо использовать гибридные функционалы с Гауссовыми базисами с поляризационными функциями на всех атомах типа 6-31G**.

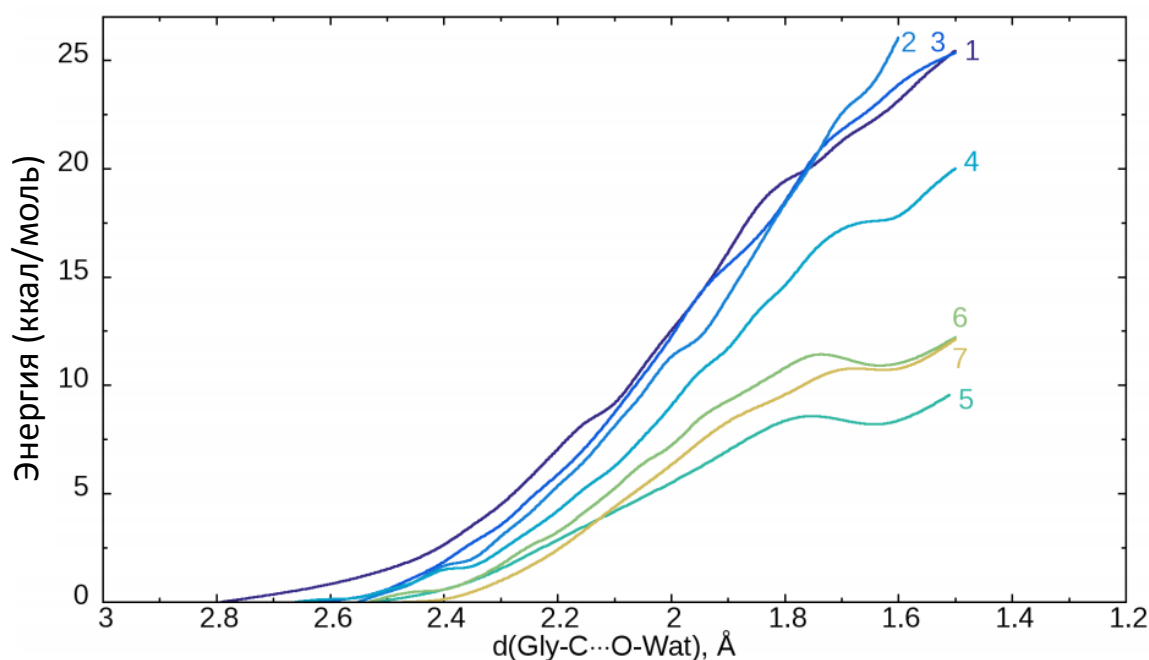


Рис. 2.18. Сечения поверхности потенциальной энергии первой стадии реакции, рассчитанные методом PBE-D3/TZVP/CHARMM. Нумерация кривых соответствует рис. 2.12.

2.1.6. Профиль потенциальной энергии реакции гидролиза модельного олигопептида в активном центре MMP-2 с мутацией E116D

Из литературных данных известно, что замена каталитически важной глутаминовой кислоты приводит к снижению активности фермента. В частности, для MMP-7 известно, что её замена на аспарагиновую кислоты приводит к изменению k_{cat} от 2.7 с^{-1} для нативного фермента до 0.61 с^{-1} для мутантной формы [79,80].

На рисунке 2.19 показан профиль реакции, полученный для мутанта MMP-2 Glu116Asp (E116D), для сравнения также приведен профиль реакции для нативного фермента, полученный в рамках того же подхода. Качественно механизмы реакций, полученные для двух форм совпадают. Повышение барьера реакции на первой стадии связано с тем, что боковая цепь аспартата на одну CH_2 группу короче, чем у глутамата, что приводит к увеличению расстояния нуклеофильной атаки, удлинению водородной связи между карбоксильной группой аспартата и молекулой воды и меньшей поляризации каталитической молекулы воды (рис. 2.20). Все остальные стадии реакции достаточно похожи [67].

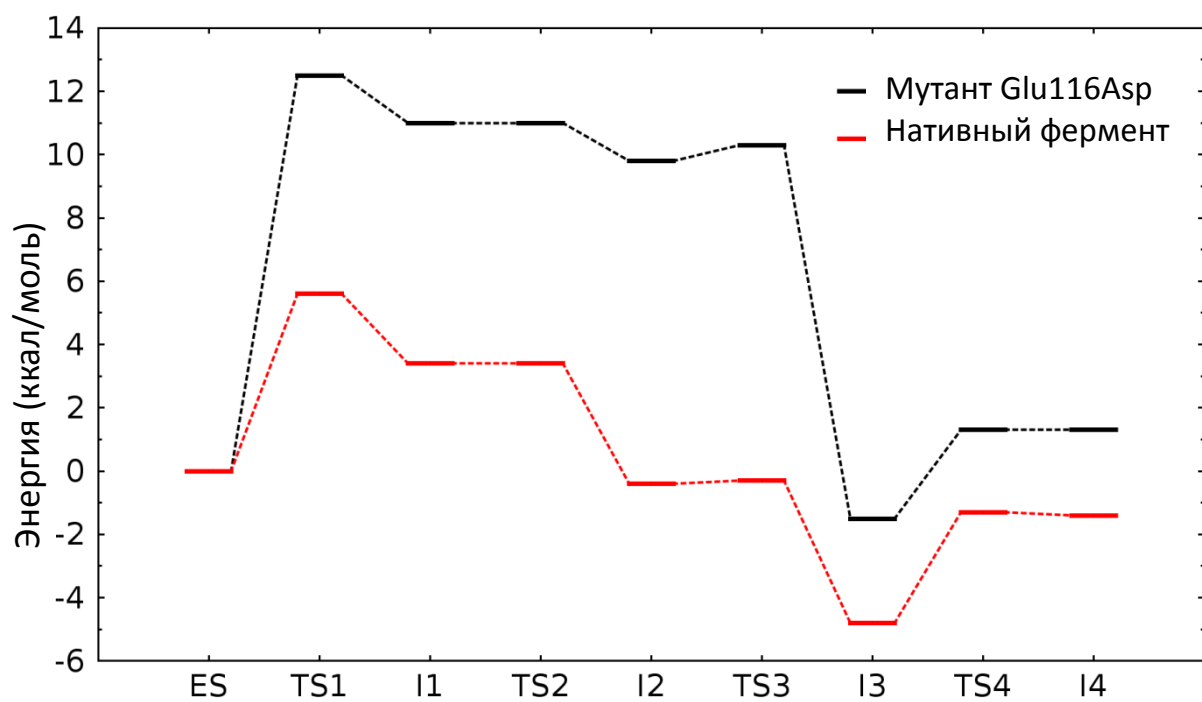


Рис. 2.19. Сечения поверхности потенциальной энергии реакции гидролиза модельного субстрата нативной формой MMP-2 (красным) и мутантной формой Glu116Asp (чёрным), полученные методом PBE0-D3/6-31G**/CHARMM.

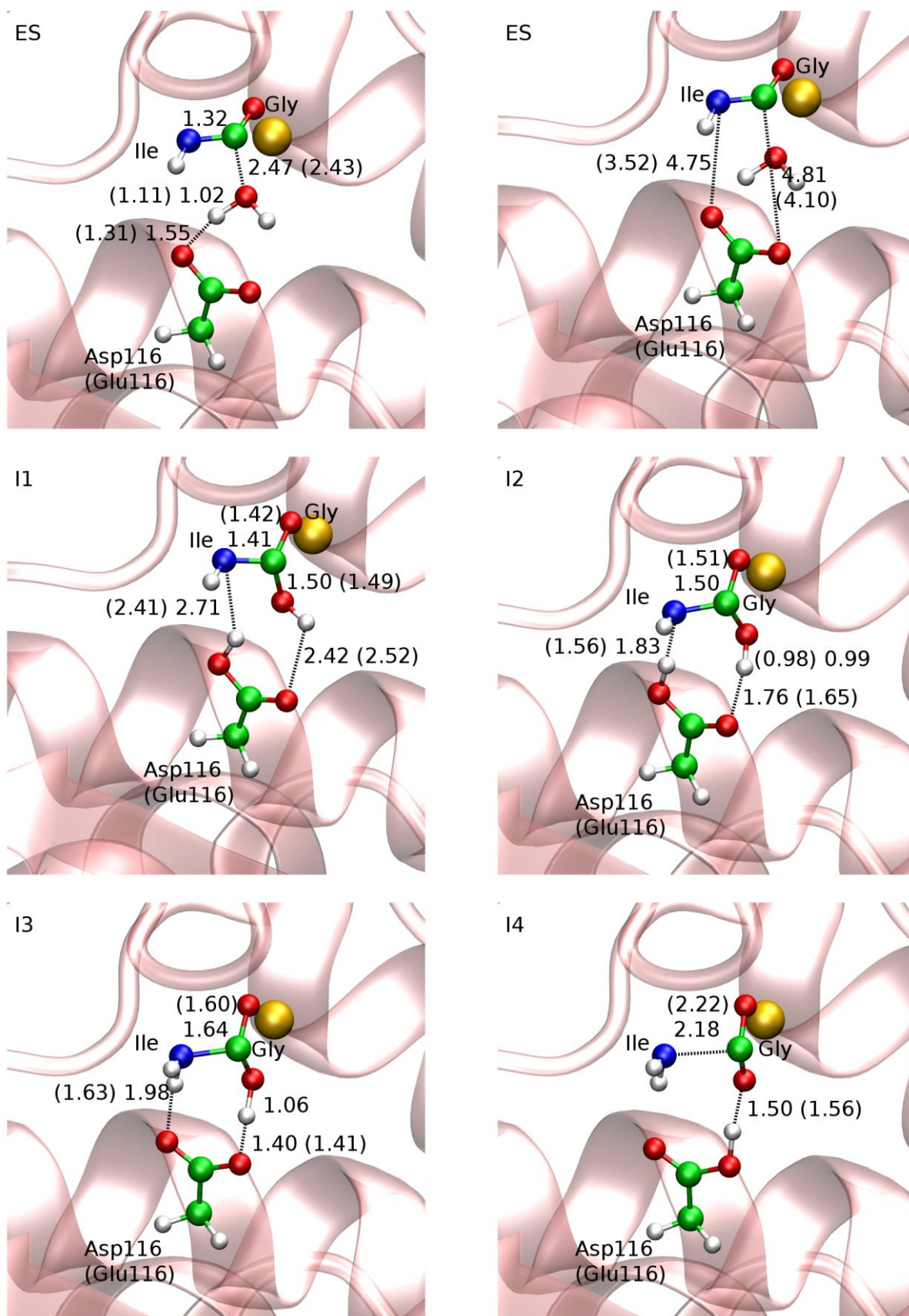


Рис. 2.20. Равновесные геометрические конфигурации стационарных точек, полученных для реакции гидролиза модельного субстрата мутантной формой MMP-2 Glu116Asp.

2.1.7. Профили свободной энергии стадии нуклеофильной атаки

В разделе 2.1.5 проведен поиск оптимального по соотношению вычислительных затрат и получаемой точности протокола расчета. Менее точные методы некорректно описывают структуру интермедиата II и не могут быть использованы для описания первой стадии рассматриваемой реакции. Поэтому были выполнены расчеты профиля свободной энергии в рамках молекулярной динамики с КМ/ММ потенциалами PBE0-D3/6-31G**/CHARMM, аналогично референсному ППЭ. В процессе расчета координата реакции делилась на окна, на каждое из которых накладывался гармонический потенциал. Далее накапливалась статистика по распределению координаты реакции внутри окна. Методом взвешенных гистограмм (weighted histogram analysis method, WHAM) или интегрированием окон (umbrella integration, UI) получали сечения профилей свободной энергии вдоль координаты реакции. Такие расчеты проводились для нативного фермента и для его мутантной формы Glu116Asp (рис. 2.21, табл. 2.7).

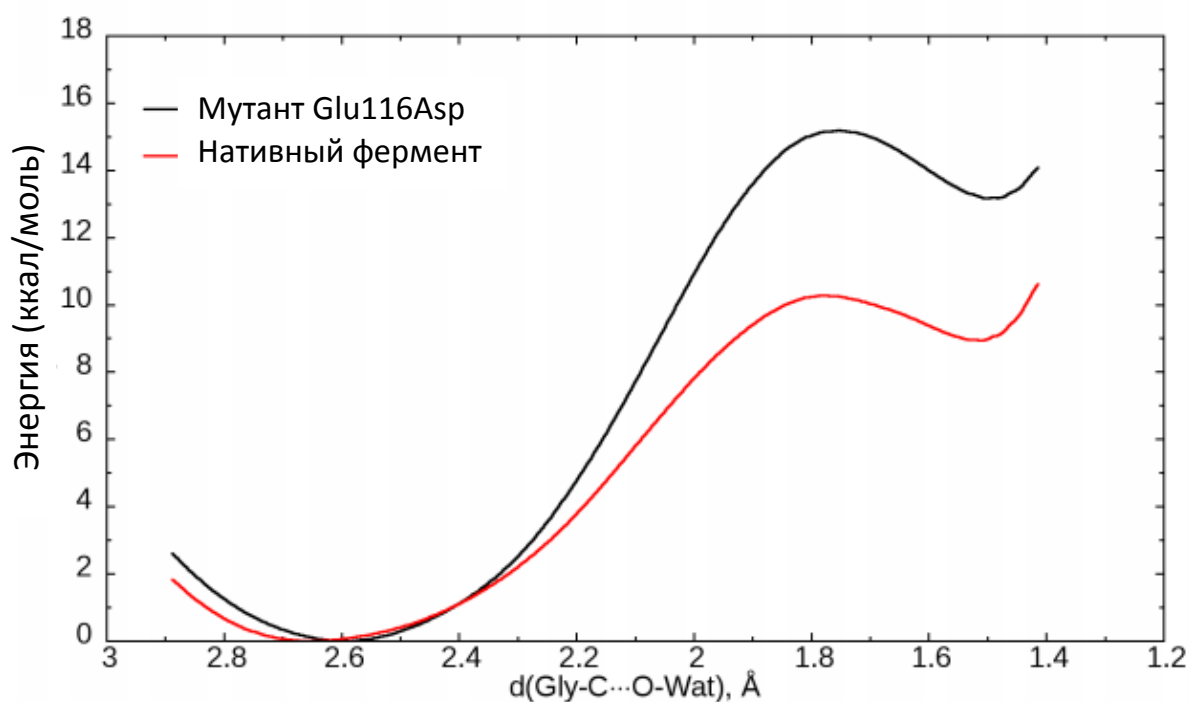
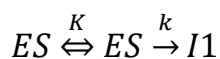


Рис. 2.21. Профили свободной энергии для первой стадии реакции гидролиза, посчитанные методом PBE0-D3/6-31G**/CHARMM для нативного фермента (красным) и мутанта Glu116Asp (чёрным).

Таблица 2.7. Относительные свободные энергии переходного состояния ΔF^\ddagger и интермедиата ΔF первой стадии реакции, полученные для нативного фермента и мутантной формы Glu116Asp. WHAM и UI относятся к способу статистической обработки результатов расчета.

	ΔF^\ddagger , ккал/моль	ΔF , ккал/моль
нативная форма MMP-2		
WHAM	10.4	8.9
UI	10.3 ± 0.4	8.9 ± 0.4
Glu116Asp мутант MMP-2		
WHAM	15.0	12.7
UI	15.2 ± 0.4	13.2 ± 0.4

Поскольку профили потенциальной энергии (рис. 2.12) и профиль свободной энергии получены в рамках одного приближения, можно сравнивать их энергетические параметры. Для профилей 6 и 7 на рис. 2.12 барьеры составляют 5.5 и 7.5 ккал/моль, соответственно, в то время как барьер на поверхности свободной энергии равен 10.3 ккал/моль. Вместе с тем, стабилизация интермедиата относительно переходного состояния составляет около 1.5 ккал/моль как на ППЭ, так и на ПСЭ. Таким образом, учёт вкладов в свободную энергию наибольшим образом влияет на прямую стадию реакции. Это можно объяснить тем, что субстрат находится на поверхности фермента и поэтому достаточно подвижен. Для того чтобы подтвердить эту гипотезу была проанализирована КМ/ММ-МД траектория фермент-субстратного комплекса. На основании полученных ранее потенциальных кривых для первой стадии реакции (рис. 2.12) были выбраны геометрические критерии реакционных фермент-субстратных комплексов: $r(\text{Zn}\dots\text{O-Gly}) < 2.5 \text{ \AA}$, $r(\text{Zn}\dots\text{O-Wat}) > 1.97 \text{ \AA}$ и $r(\text{Wat-O}\dots\text{C-Gly}) < 2.5 \text{ \AA}$. Структуры, в которых одновременно выполнялись все три геометрических критерия считались реакционными. Предполагалась следующая схема процесса:



В таком случае если рассчитать константу равновесия на первой стадии и константу скорости стадии образования II, можно получить эффективную константу скорости процесса

$$k_{eff}=K \cdot k=2.7 \cdot 10^5 \text{ c}^{-1},$$

где $K=4.5 \cdot 10^{-4}$, а $k=5.9 \cdot 10^8 \text{ c}^{-1}$. С другой стороны, если считать константу скорости для первой стадии, исходя из свободной энергии активации, полученной в результате сканирования конформационного пространства, получается значение $1.3 \cdot 10^5 \text{ c}^{-1}$, что по порядку величины сходно с полученным значением с использованием квазиравновесного приближения для фермент-субстратного комплекса. Это свидетельствует о том, что барьер на поверхности свободной энергии повышается в результате высокой подвижности структуры фермент-субстратного комплекса.

В качестве дополнительной верификации был рассчитан профиль свободной энергии наиболее популярным подходом, методом молекулярной динамики с КМ/ММ потенциалами, в котором квантовая подсистема описывалась GGA функционалом PBE с комбинированным базисом гауссовых функций и плоских волн TZV2P (рис. 2.22). У такого подхода сохранились все проблемы, рассмотренные выше в разделе 2.1.6, а именно, практически полное отсутствие стабилизации II относительно переходного состояния. Введение точечной мутации практически не приводит к изменениям в профиле свободной энергии, что также свидетельствует о недостаточной точности метода.

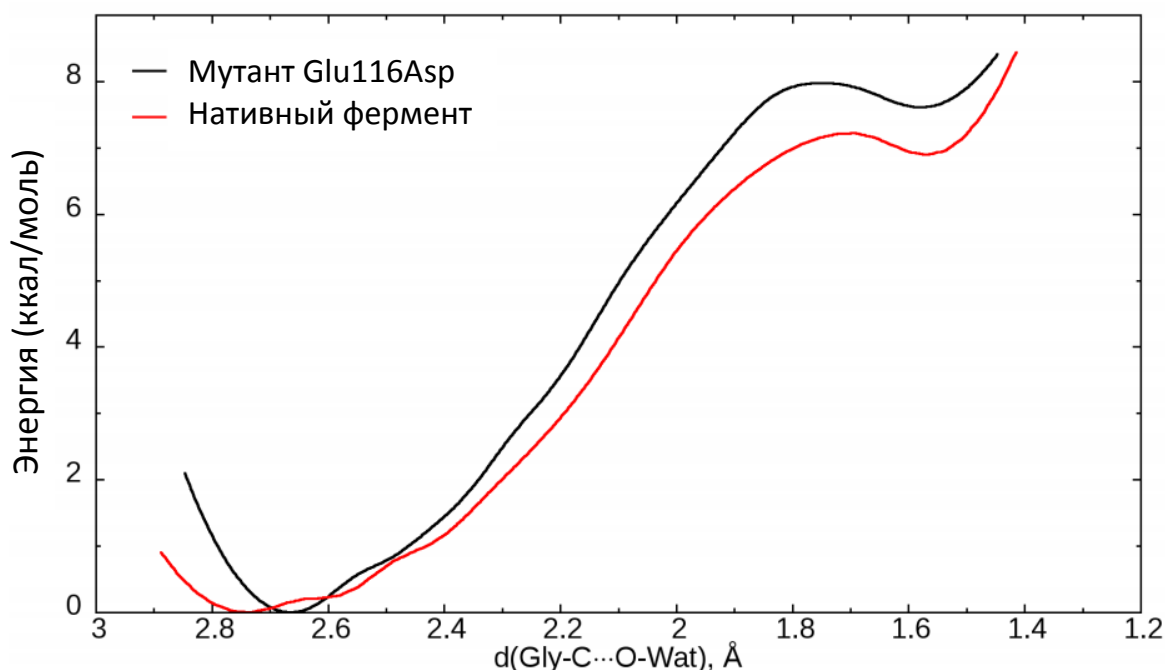


Рис. 2.22. Профиль поверхности свободной энергии, полученный методом PBE-D3/TZV2P/CHARMM для нативного фермента (красным) и мутантной формы Glu116Asp (чёрным).

2.1.8. Выход продуктов реакции

Для того чтобы завершить каталитический цикл были проведены расчеты методом молекулярной динамики с КМ/ММ потенциалами BLYP-D3/TZV2P/CHARMM. С-продукт вытягивался из координационной сферы цинка с постоянной скоростью, после чего в рамках подхода Яржинского строился потенциал средней силы [81]. Вытягивание С-продукта сопровождается самопроизвольным переносом протона с каталитической глутаминовой кислоты на N-продукт, что и завершает регенерацию фермента и свидетельствует об окончании каталитического цикла. На рис. 2.23 показаны усредненные потенциалы средней силы, полученные из нескольких траекторий. Энергия, необходимая для выхода С-продукта составляет приблизительно 20 ккал/моль для нативной формы и около 15 ккал/моль для мутанта Glu116Asp, что свидетельствует в пользу того, что стадия выхода продукта является лимитирующей для нативного фермента. При этом каталитический акт и выход продуктов в мутантной форме сопоставимы по энергии.

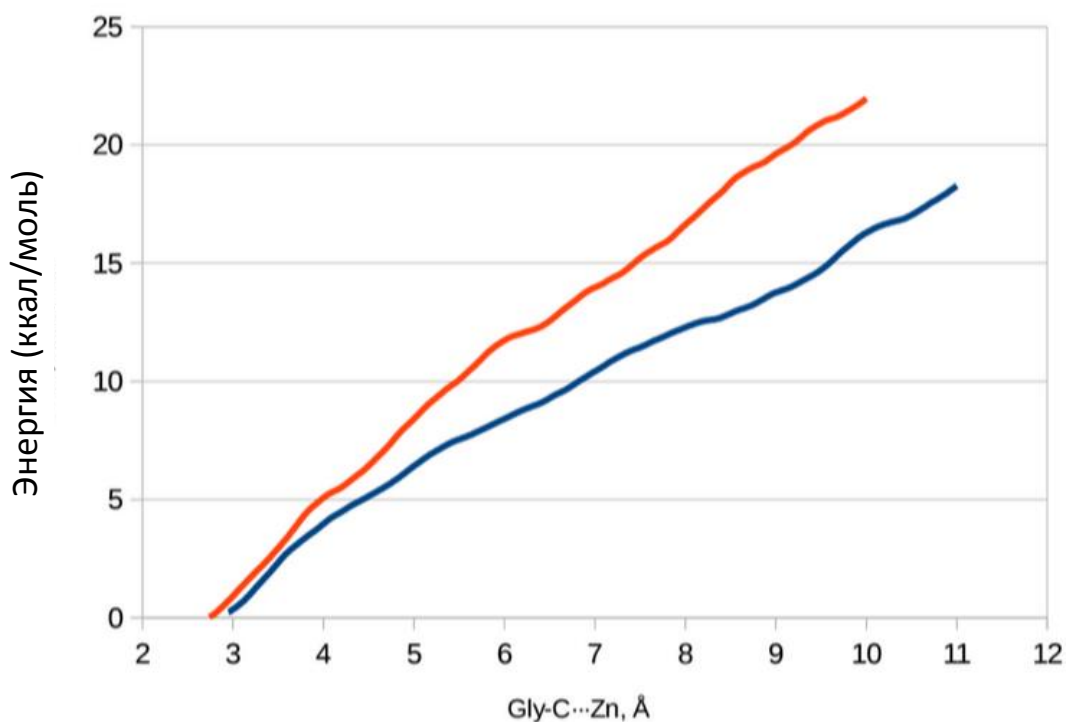


Рис. 2.23. Потенциалы средней силы, полученные для выхода N-продукта в нативном ферменте (красным) и мутанте Glu116Asp (синим).

2.1.9. Сравнение полученных результатов с экспериментальными данными

Бертини и др. представили результаты кристаллографических исследований реакционных интермедиатов гидролиза олигопептида родственным ферментом MMP-8 [82]. Кристаллы, которые удалось получить, соответствуют ингибированному ферменту, а также комплексам фермент-продукт, в которых присутствуют либо оба продукта, либо только N-продукт. Это свидетельствует о том, что интермедиаты реакции неустойчивы, и барьеры переходов небольшие, а также, что C-продукт выходит раньше, чем N-продукт. Все это хорошо описывается в рамках предложенной модели.

Стационарные и предстационарные кинетические измерения гидролиза олигопептида родственным металлоферментом TACE показали наличие быстрой химической стадии и более медленной стадии выхода продукта, что согласуется с предложенной моделью, в которой максимальный барьер химической стадии более чем в два раза меньше, чем стадии выхода продукта [83].

По данным точечного мутагенеза показано, что замена Glu116Asp приводит к уменьшению константы скорости приблизительно в 10 раз, в то время как замена

на как Gln и Ala, не способные к принятию протона, приводит к уменьшению k_{cat} в 10^3 и более раз, что подтверждает ключевую роль Glu116 [79,80].

Влияние изотопного замещения (кинетический изотопный эффект, КИЕ) при проведении экспериментов в тяжелой воде сильно различается в зависимости от конкретного субстрата, с которым проводятся эксперименты [84,85]. Значение k_H/k_D варьируется от 9 для гидролиза коллагена до 1 для синтетического полипептидного субстрата. Предполагая, что химическая реакция происходит сходным образом для разных субстратов, различия в КИЕ могут свидетельствовать о разных механизмах взаимодействия субстратов с ферментом. Для гидролиза полипептида MMP-2 значение КИЕ составляет 1.5, что свидетельствует о вовлеченности перемещения протонов в лимитирующую стадию. Поскольку переносы протонов происходят на всех стадиях, включая стадию выхода продукта, то данные по изотопному замещению не позволяют выявить лимитирующую стадию.

Описанные выше данные не противоречат тому, что стадия выхода продукта является лимитирующей. Она состоит из этапа выхода С-продукта, за которым следует выход N-продукта.

2.2. Ингибирование MMP-2

2.2.1. Ингибитор с кетометиленовым аналогом субстрата: расчеты и эксперимент

Одним из предложенных в данной работе подходов к созданию ингибиторов на основе натурального субстрата является замена разрываемой пептидной группы на кетометиленовую (рис. 2.24). Это приводит к тому, что в результате нуклеофильной атаки каталитической молекулой воды не происходит разрыва пептидной связи, а проходит реакция гидратации кетона с образованием кеталя [86,87].

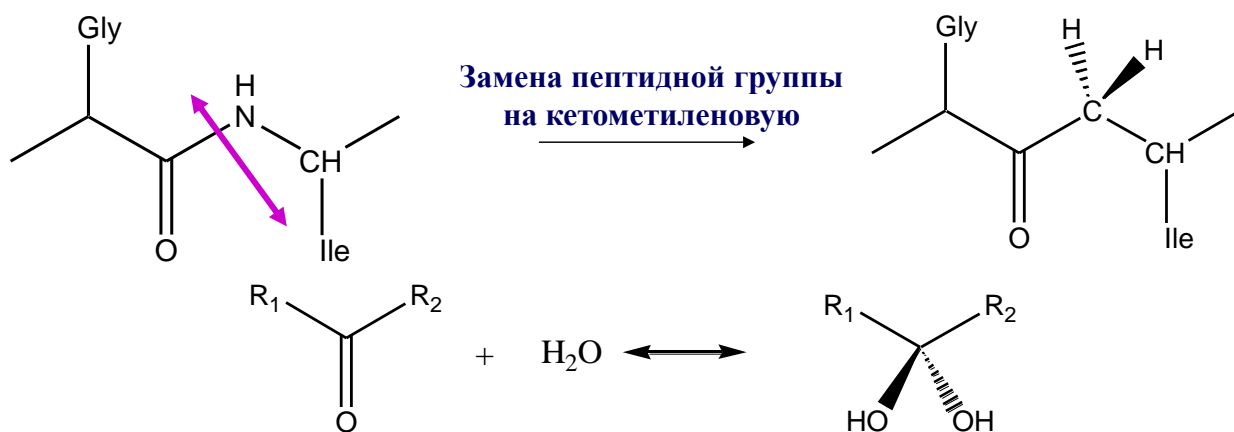


Рис. 2.24. Структура заменяемого фрагмента (сверху) и реакция гидратации кетона (снизу).

По данным расчетов методом КМ/ММ в варианте BВ1K/6-31G**/AMBER реакция гидратации проходит с низким барьером около 3 ккал/моль и равновесие в такой реакции смещено в сторону продуктов с константой равновесия порядка 10^4 (рис. 2.25). Такое значение константы равновесия сильно отличается от величины, характерной для водного раствора, где она составляет $\sim 10^{-3}$. Это связано с тем, что при образовании кетала в активном центре MMP-2 образуется координационная связь между катионом цинка и атомом карбонильного кислорода псевдоолигопептида. Важно отметить, что в данной реакции каталитическая глутаминовая кислота также участвует в реакции, являясь акцептором протона каталитической молекулы воды.

На основании проведенного моделирования был синтезирован псевдоолигопептид Gly-Pro-Gln-Gly-CO-CH₂-CH(CH₂CH(CH₃)₂)-Ala-Gly-Gln и проведены измерения его ингибирующей способности. Полученные экспериментальные данные указывают на наличие ингибирующей способности с константой ингибирования $5 \cdot 10^{-3}$ М. Таким образом, предложено и проверено экспериментально новое соединение, обладающее ингибирующей способностью по отношению к ММ-2 и являющееся прототипным для разработки ингибиторов подобного строения.

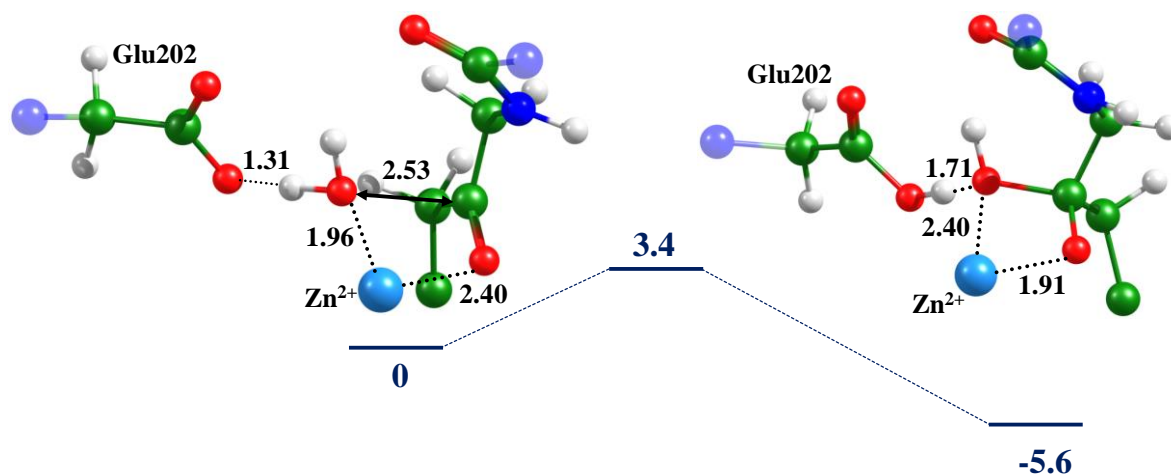


Рис. 2.25. Механизм реакции гидратации кетометиленового производного натурального субстрата в активном центре MMP-2. Энергии на профиле потенциальной энергии в ккал/моль, ключевые расстояния приведены в Å.

2.2.2. Ингибиторы с мотивом цинкового пальца

В настоящей работе предложена идея создания структурно стабильного мотива цинкового пальца Cys_2His_2 в активном центре MMP-2 при связывании фермента с ингибитором. Такой процесс сопровождается вытеснением одного из гистидинов фермента из координационной сферы цинка и введением двух остатков цистеина ингибитора и должен быть термодинамически выгодным, так как атом серы тиолята является более предпочтительным лигандом, чем атомы второго периода [88].

В литературе известен ингибитор Regasepin1 родственного фермента MMP-9, механизм действия которого не известен; его первичная последовательность похожа на продомен матриксных металлопротеиназ, который содержит цистеин, блокирующий катион цинка в активном сайте [89].

Для описания механизма ингибирования были построены две модельные системы, в одной из них MMP-9 был связан с олигопептидом, имитирующим продомен Met-Arg-Thr-Pro-Arg-Cys-Gly-Val-Pro-Asp-Leu-Gly-Arg (Inh^{Pro}), а в другом – с Regasepin1 Pro-Arg-Cys-Bip-Cys-Gly-Glu (Bip – бифенилаланин). Ингибитор Regasepin1 достраивался путем модификации аминокислотных остатков ингибитора, полученного из продомена. Поиск равновесных геометрических параметров проводился методом КМ/ММ в приближении VB1K/6-31G**/AMBER,

а расчеты траекторий для комплексов EI методом КМ/ММ-МД в варианте BLYP-D3/QZV2P-GTH/CHARMM (рис. 2.26).

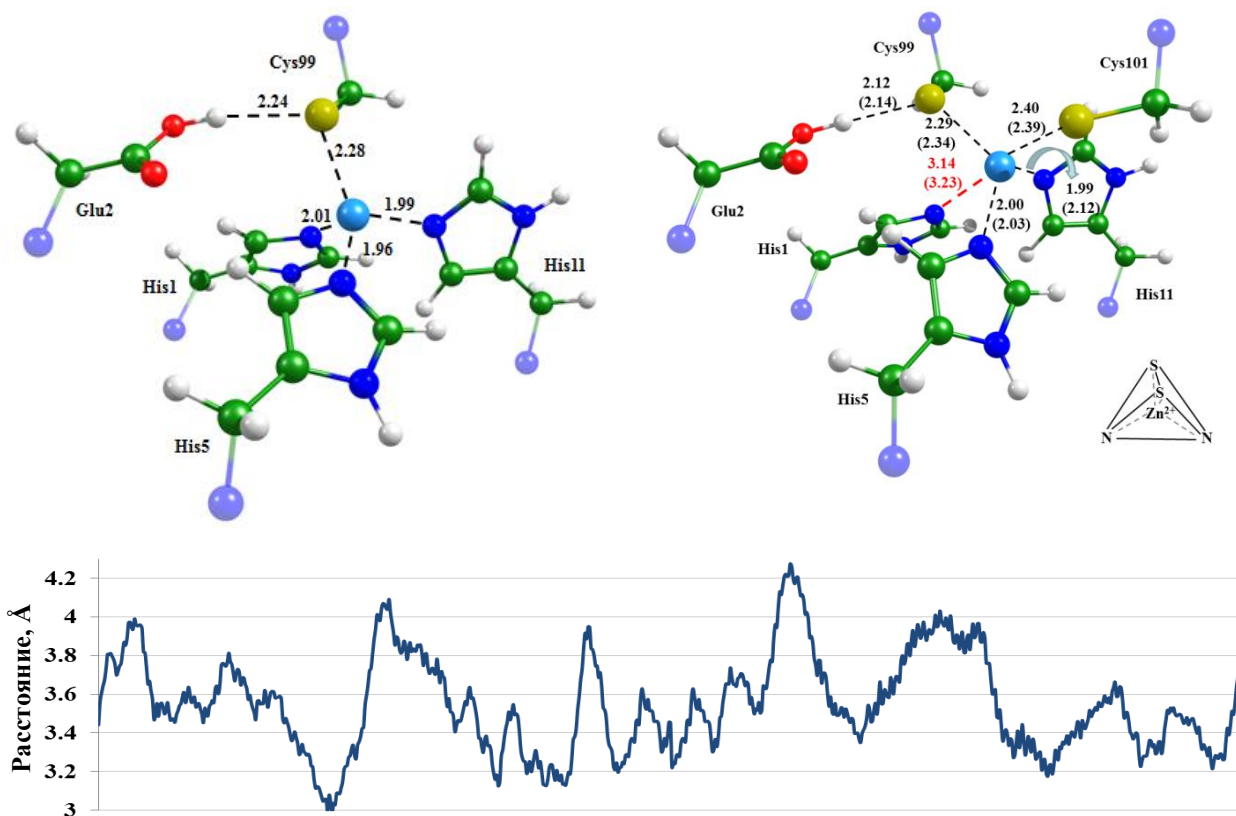


Рис. 2.26. Равновесные геометрические конфигурации комплексов MMP-9-Inh^{pro} и MMP-9-Regasepin-1. Динамика изменения расстояния между атомом азота His1 и катионом цинка в комплексе MMP-9-Regasepin-1, полученные в моделировании методом КМ/ММ-МД (снизу).

Структура комплекса MMP-9-Inh^{pro} характеризуется парой депротонированный Cys99 – протонированная Glu2 (рис. 2.26). В комплексе MMP-9-Regasepin1 оба цистеина находятся в депротонированной форме. В таблице 2.8 показаны структурные параметры полученных комплексов. Результаты минимизации и МД расчетов однозначно свидетельствуют в пользу того, что His1 выходит из координационной сферы и его место занимает остаток цистеина ингибитора в комплексе MMP-9-Regasepin1.

Таблица 2.8. Ключевые расстояния, полученные в результате КМ/ММ минимизации (Opt), КМ/ММ-МД (через 10 пс – MD 10 ps и через 60 пс – MD 60 ps) расчетов и из данных РСА(X-ray, PDB ID: 1L6J). Все расстояния приведены в Å, значения в скобках соответствуют стандартным отклонениям.

		Glu2H- Cys99S	Glu2O- Cys99S	Zn ²⁺ - Cys99S	Zn ²⁺ - His1N	Zn ²⁺ - His5N	Zn ²⁺ - His11N	Zn ²⁺ - Cys101S
MMP-9– Inh ^{pro}	Opt	2.24	3.21	2.28	2.01	1.96	1.99	-
	X-ray	-	2.95	2.32	2.26	2.05	2.21	-
	MD 10 ps	2.22 (0.19)	3.21 (0.17)	2.28 (0.06)	2.10 (0.09)	2.05 (0.07)	2.04 (0.06)	-
MMP-9– Regasepin1	Opt	2.12	3.11	2.29	3.14	2.00	1.99	2.40
	MD 10 ps	2.24 (0.16)	3.23 (0.14)	2.34 (0.07)	3.57 (0.26)	2.09 (0.07)	2.10 (0.07)	2.43 (0.09)
	MD 60 ps	2.25 (0.18)	3.23 (0.16)	2.33 (0.07)	3.59 (0.37)	2.08 (0.07)	2.10 (0.07)	2.44 (0.12)

Важным наблюдением является то, что увеличение длины траектории от 10 пс до 60 пс не приводит к изменению картины, вновь образованная координационная сфера цинка сохраняется.

Для понимания важности проведения гораздо более затратных КМ/ММ-МД расчетов по сравнению с классической МД, были получены молекулярно-динамические траектории с классическим силовым полем CHARMM. Важность такой методической работы обусловлена тем, что активный центр очень поляризован в связи с большим положительным зарядом на катионе цинка и заряды системы должны очень тщательно подбираться. Если сравнить заряды ESP, полученные в равновесной геометрической конфигурации комплекса MMP-9-Regasepin1, можно заметить, что они отличаются для одних и тех же атомов в различных остатках гистидина в зависимости от наличия или отсутствия координационной связи с цинком.

Далее приведено сравнение трех протоколов расчета:

1. КМ/ММ-МД траектория длиной 60 пс, полученная в приближении BLYP-D3/QZV2P-GTH/CHARMM.

2. Классическая МД траектория длиной 50 нс с параметрами и зарядами силового поля CHARMM.

3. Классическая МД траектория длиной 50 нс с параметрами силового поля CHARMM и зарядами ESP из КМ/ММ расчетов.

Координационная сфера цинка сохраняется в КМ/ММ-МД расчете, в то время как в обоих вариантах классических траекторий она изменяется. В случае использования классических зарядов наблюдается увеличение координационного числа (КЧ) цинка до 6 (рис. 2.27, табл. 2.9), что характерно только для комплексов с малыми лигандами, например, $Zn(H_2O)_6^{2+}$ и не характерно для больших аминокислотных лигандов, где КЧ равно 4. Такой артефактный результат, по всей видимости, связан с большими зарядами, предписанными силовым полем и слишком сильным взаимодействием с Zn^{2+} . При замене на более «мягкие» ESP заряды координационная сфера разрушается, поскольку частичные заряды на координирующих атомах гистидина становятся меньше, чем на атомах кислорода молекул воды (рис. 2.27, табл. 2.9). Таким образом, становится понятным, что применение классических силовых полей для прецизионного описания поведения активного центра фермента не рекомендуется.

Таблица 2.9. Параметры координационной сферы цинка в МД расчетах: представлены средние значения и стандартные отклонения в Å. Звездочка в правой нижней ячейке обозначает, что в координационную сферу цинка входит молекула воды, однако происходит её замена на другие молекулы воды из раствора вдоль траектории.

Протокол	Zn ²⁺ - Cys99S	Zn ²⁺ - Cys101 S	Zn ²⁺ - His1N	Zn ²⁺ - His5N	Zn ²⁺ - His11N	Zn ²⁺ - H ₂ O
КМ/ММ-МД	2.33 (0.07)	2.44 (0.12)	3.59 (0.37)	2.08 (0.07)	2.10 (0.07)	-
МД с зарядами из CHARMM	2.29 (0.05)	2.34 (0.06)	2.26 (0.08)	2.23 (0.07)	2.21 (0.06)	2.14 (0.06)
МД с ESP зарядами	2.57 (0.35)	2.88 (0.85)	5.09 (0.62)	4.75 (0.80)	2.79 (0.72)	*

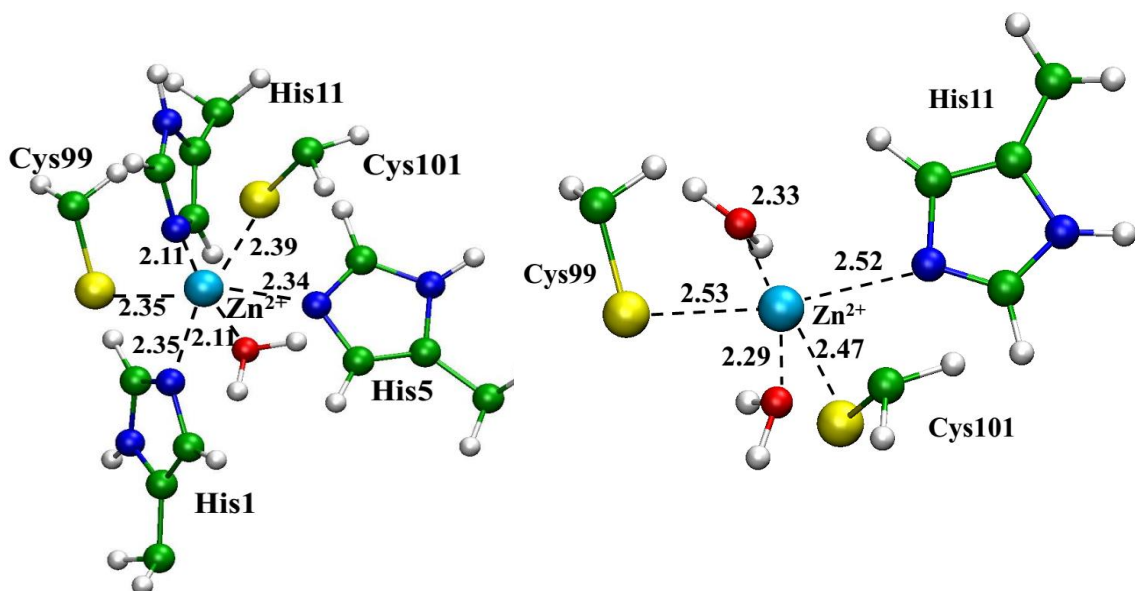


Рис. 2.27. Структура активного центра после классических МД расчетов с длинами траекторий 50 нс, полученные с зарядами из силового поля CHARMM (слева) и ESP (справа).

Так как наличие структурного мотива цинкового пальца объясняет ингибирующую способность Regasepin1 по сравнению с продоменом MMP, такой мотив можно внедрять в другие олигопептиды, способные связываться с матриксными металлопротеиназами. Так, в литературе известен олигопептид предшественник β -амилоида APP-IP, связывающийся с MMP-2 с константой ингибирования $K_i = 30$ nM [90–92]. В ходе связывания с ферментом он располагается в субстрат-связывающей щели в направлении противоположном натуральному субстрату и координирует катион цинка карбоксильной группой Asp6 (рис. 2.28). В работе были проведены расчеты КМ/ММ и КМ/ММ-МД для комплекса MMP-2-APP-IP, полученного из кристаллической структуры PDB ID: 3AYU [91]. Для внедрения мотива цинкового пальца в структуре олигопептида были проведены две точечные мутации Asp6Cys и Tyr3Cys, необходимые для образования координационных связей; такой олигопептид далее будет обозначаться как APP-IP^{ZnF}. На рис. 2.28 и в таблице 2.10 показаны равновесные геометрические параметры исследуемых систем и динамические параметры. Аналогично комплексу с Regasepin1, остаток цистеина APP-IP^{ZnF} вытесняет гистидин из координационной сферы, что подтверждается как результатами минимизации, так и МД расчетами. В равновесной геометрической конфигурации комплекса MMP-2-APP-IP связь Asp-OD2...Zn²⁺ длиннее связи Asp-

OD1...Zn²⁺, что объясняется наличием дополнительной водородной связи между Asp-OD1 и Glu2. Динамическое поведение этих связей также показывает, что взаимодействия Asp-OD2...Zn²⁺ менее прочные, чем Asp-OD1...Zn²⁺.

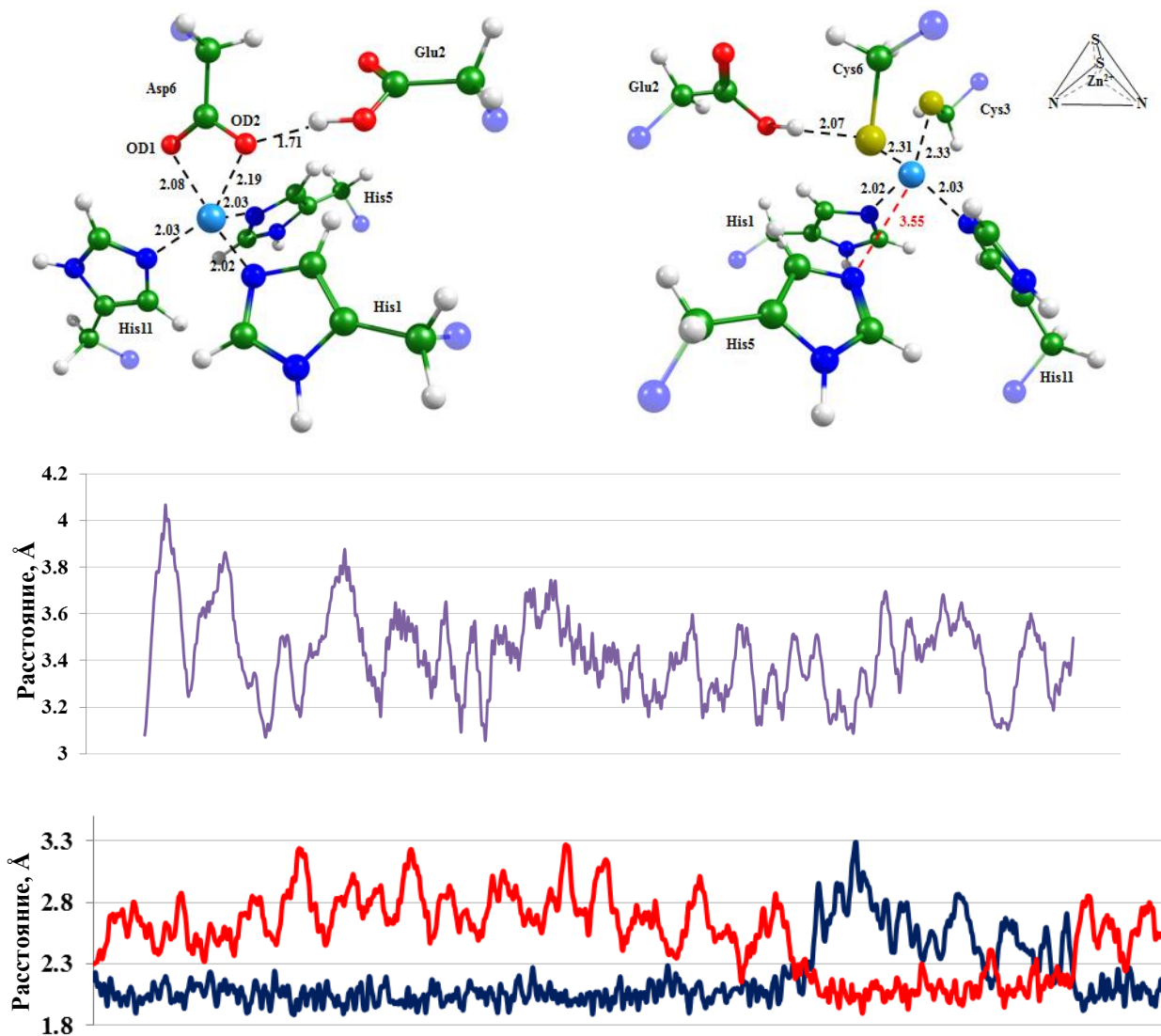


Рис. 2.28. Равновесные геометрические конфигурации комплексов MMP-2-APP-IP (слева) и MMP-2-APP-IP^{ZnF} (справа). На графиках показаны расстояния His5...Zn²⁺ (сверху), AspOD2...Zn²⁺ (красным) и AspOD1...Zn²⁺ (синим) (снизу) вдоль молекулярно-динамических траекторий в Å.

Таблица 2.10. Ключевые расстояния, полученные в результате КМ/ММ минимизации (Opt) и КМ/ММ-МД расчетов (MD) для систем MMP-2-APP-IP и MMP-2-APP-IP^{ZnF} и по данным РСА (X-ray, PDB ID: 3AYU). Все расстояния приведены в Å, значения в скобках соответствуют стандартным отклонениям.

		Glu2H- Asp6OD2	Glu2O- Asp6OD2	Zn ²⁺ - Asp6OD2	Zn ²⁺ - Asp6OD1	Zn ²⁺ - His1N	Zn ²⁺ - His5N	Zn ²⁺ - His11N
MMP-2- APP-IP	Opt	1.71	2.19	2.19	2.08	2.02	2.03	2.03
	X-ray	-	-	2.30	2.17	2.05	2.11	2.08
	MD	1.71 (0.15)	2.53 (0.31)	2.53 (0.31)	2.19 (0.26)	2.03 (0.05)	2.08 (0.06)	2.03 (0.05)
		Glu2H- Cys6S	Glu2O- Cys6S	Zn ²⁺ - Cys6S	Zn ²⁺ - Cys3S	Zn ²⁺ - His1N	Zn ²⁺ - His5N	Zn ²⁺ - His11N
MMP-2- APP-IP ^{ZnF}	Opt	2.07	3.05	2.31	2.33	2.02	3.55	2.03
	MD	2.10 (0.15)	3.10 (0.13)	2.37 (0.09)	2.37 (0.13)	2.14 (0.08)	3.37 (0.29)	2.11 (0.08)

Ещё одна модельная система, которая была изучена для внедрения мотива цинкового пальца – комплекс MMP-2 с натуральным субстратом. При замене фрагмента Gly~Ile, в котором происходит разрыв C-N связи, на D-Cys-Cys (здесь буквой D обозначен D-стереоизомер цистеина, во всех остальных случаях по умолчанию предполагаются природные L-стереоизомеры) формируется олигопептид, способный образовывать мотив цинкового пальца в активном центре (Inh^{D-Cys}). Выбор D-изомера связан с тем, что конфигурация олигопептида такова, что боковая цепь остатка на месте Gly обращена в сторону раствора, если это L-изомер, а нам необходимо, чтобы она заходила в активный центр фермента. К положительным моментам такого подхода можно отнести то, что олигопептиды, содержащие D-изомеры аминокислот меньше подвержены разрушению под действием протеаз в системах *in vivo*.

На рис. 2.29 показана равновесная геометрическая конфигурация комплекса MMP-2-Inh^{D-Cys}. В результате связывания, олигопептид разрушает имеющуюся координационную сферу цинка и замещает His5 на Cys ингибитора, также боковая цепь D-Cys вытесняет каталитическую молекулу воды из координационной сферы, тем самым полностью блокируя возможную реакцию гидролиза.

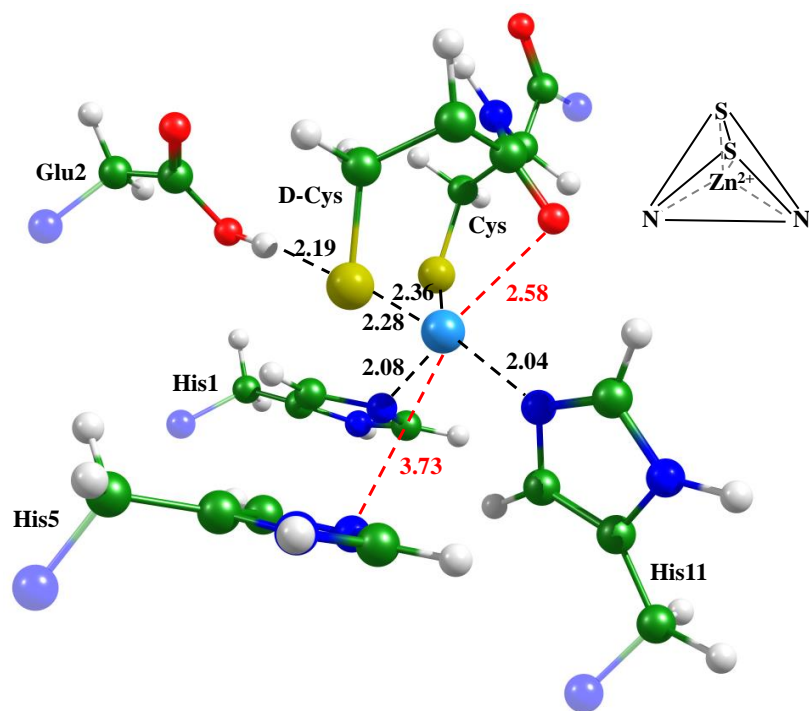


Рис. 2.29. Равновесная геометрическая конфигурация комплекса $MMP-2-Inh^{D-Cys}$. Ключевые расстояния показаны в Å.

Regasepin1 и APP-IP ориентированы в субстрат-связывающем канале в направлении противоположном, чем натуральный субстрат. Такая ориентация нарушает реакцию конформацию активного центра, в частности из-за вытеснения из координационной сферы каталитической молекулы воды. Насколько можно судить из литературных данных, нет экспериментальных подтверждений тому, что есть олигопептидные ингибиторы, связывающиеся в том же направлении, что и натуральный субстрат. Можно предположить, что это связано с особенностями устройства сайтов связывания; в частности, аминокислотный остаток непосредственно перед рвущейся связью обращен боковой цепью в раствор, в то время как следующий обращен к ферменту. Это обеспечивает наличие свободного пространства в активном центре, которое занято каталитической молекулой воды. В соответствии с этим и было выдвинуто предположение о замене остатка перед рвущейся связью на D-изомер цистеина, что и обеспечивает вытеснение молекулы воды.

Во всех трех примерах остаток цистеина олигопептида вытесняет из координационной сферы остаток гистидина фермента. Это связано с тем, что отрицательно заряженный атом серы является предпочтительным лигандом по

сравнению с азотом и кислородом исходя из теории о жестких и мягких основаниях и кислотах.

2.2.3. Производные APP-IP: расчеты и эксперимент

Обсуждавшийся выше ингибитор MMP-2 APP-IP координирует катион цинка карбоксильной группой остатка Asp6, при этом остальные остатки взаимодействуют с сайтами связывания в субстрат-связывающем канале. В работах [90,92] проводилось варьирование длины олигопептидного субстрата и было показано, что его укорачивание приводит к уменьшению ингибирующей способности. Однако не было проведено оценки влияния аминокислотной замены в шестой позиции. Поэтому в данной работе проводилось теоретическое изучение и экспериментальная проверка олигопептидов на основе APP-IP с заменами Asp6Cys и Asp6Ser.

Результаты расчетов методами КМ/ММ и КМ/ММ-МД показали, что при связывании рассматриваемых олигопептидов протон со спиртовой группы переходит на каталитическую глутаминовую кислоту Glu121 в случае APP-IP-Asp6Ser и с тиоспиртовой группы цистеина на Glu121 в случае APP-IP-Asp6Cys. На рис. 2.30 показаны равновесные геометрические конфигурации комплексов MMP-2-APP-IP-Asp6Ser и MMP-2-APP-IP-Asp6Cys. Из расчетов, приведенных в [93] известно, что в депротонированной форме энергия связи убывает в ряду $\text{CH}_3\text{O}^- > \text{CH}_3\text{S}^- > \text{CH}_3\text{COO}^-$, а в нейтральной $\text{CH}_3\text{SH} > \text{CH}_3\text{COOH} > \text{CH}_3\text{OH}$. Поскольку рассматриваемые аминокислоты цистеин и серин сбрасывают протон на Glu121, ожидается, что они все будут проявлять ингибирующие свойства.

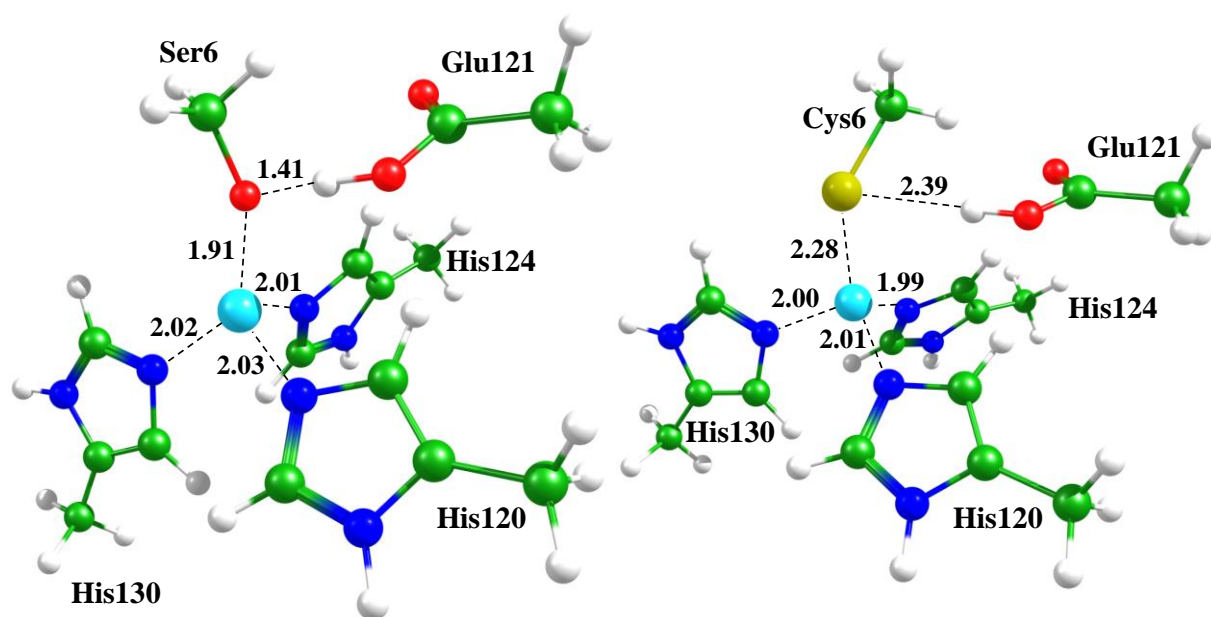


Рис. 2.30. Равновесные геометрические конфигурации комплексов MMP-2 с APP-IP-Asp6Ser (слева) и APP-IP-Asp6Cys (справа). Ключевые расстояния показаны в Å.

В лаборатории проф. А.П. Савицкого (ФИЦ Биотехнологии РАН) были проведены эксперименты с APP-IP, APP-IP-Asp6Cys и APP-IP-Asp6Ser и показано, что K_i APP-IP-Asp6Cys в 200 раз больше, чем исходного APP-IP, а APP-IP-Asp6Ser вообще не проявляет ингибирующих свойств; аналогично исходному APP-IP, APP-IP-Asp6Cys является конкурентным ингибитором, то есть связывается с активным сайтом фермента.

Отсутствие ингибирующей способности APP-IP-Asp6Ser можно объяснить различным поведением олигопептидов в растворе. Возможно наличие равновесия между двумя формами: способной и не способной образовывать комплекс с ферментом. Для подтверждения этого наблюдения были проведены расчеты методом классической молекулярной динамики, которые показали, что APP-IP является очень конформационно подвижным, в то время как для APP-IP-Asp6Cys и APP-IP-Asp6Ser можно выделить 2 и 3 наиболее часто встречающихся конформации, соответственно (рис. 2.31).

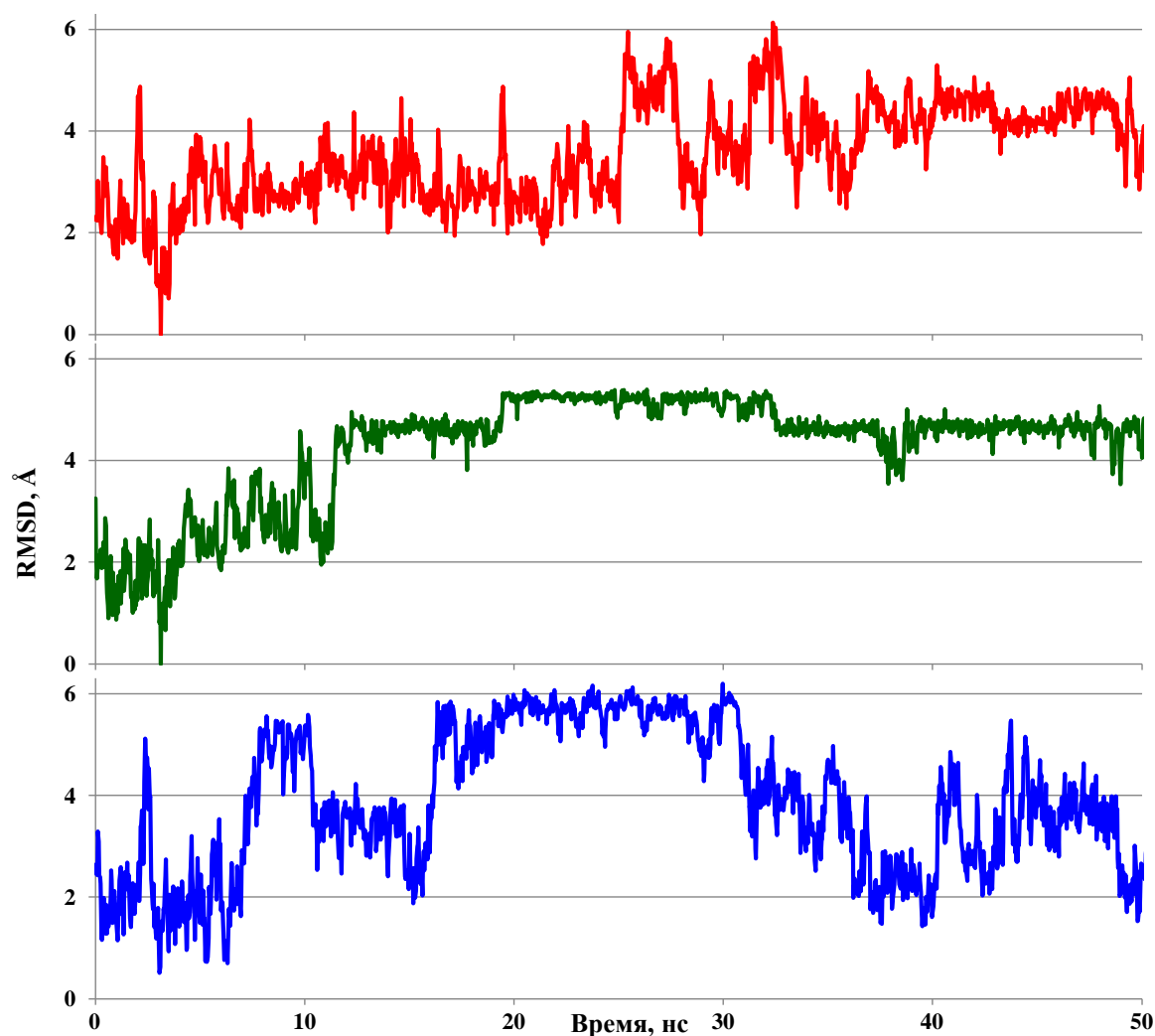


Рис. 2.31. Среднеквадратичные отклонения (RMSD) основной цепи APP-IP (красным), APP-IP-Asp6Cys (зеленым) и APP-IP-Asp6Ser (синим) вдоль МД траектории.

Анализ карт Рамачандрана распределения углов ϕ и ψ показывает, что наиболее значимо APP-IP-Asp6Ser отличается от APP-IP и APP-IP-Asp6Cys в области остатков Asn5 и Ile8 (рис. 2.32). В динамике Asn5 олигопептида APP-IP-Asp6Ser отсутствуют конформации, соответствующие диапазону углов $120^\circ < \psi < 180^\circ$; основная конформация Leu8 в APP-IP-Asp6Ser отсутствует в двух других олигопептидах. Различное динамическое поведение в растворе может приводить к изменению фракции молекул, готовых к связыванию. Среди рассматриваемых олигопептидов поведение APP-IP-Asp6Ser явно отличается от APP-IP и APP-IP-Asp6Cys, что и может служить причиной отсутствия ингибирующих свойств.

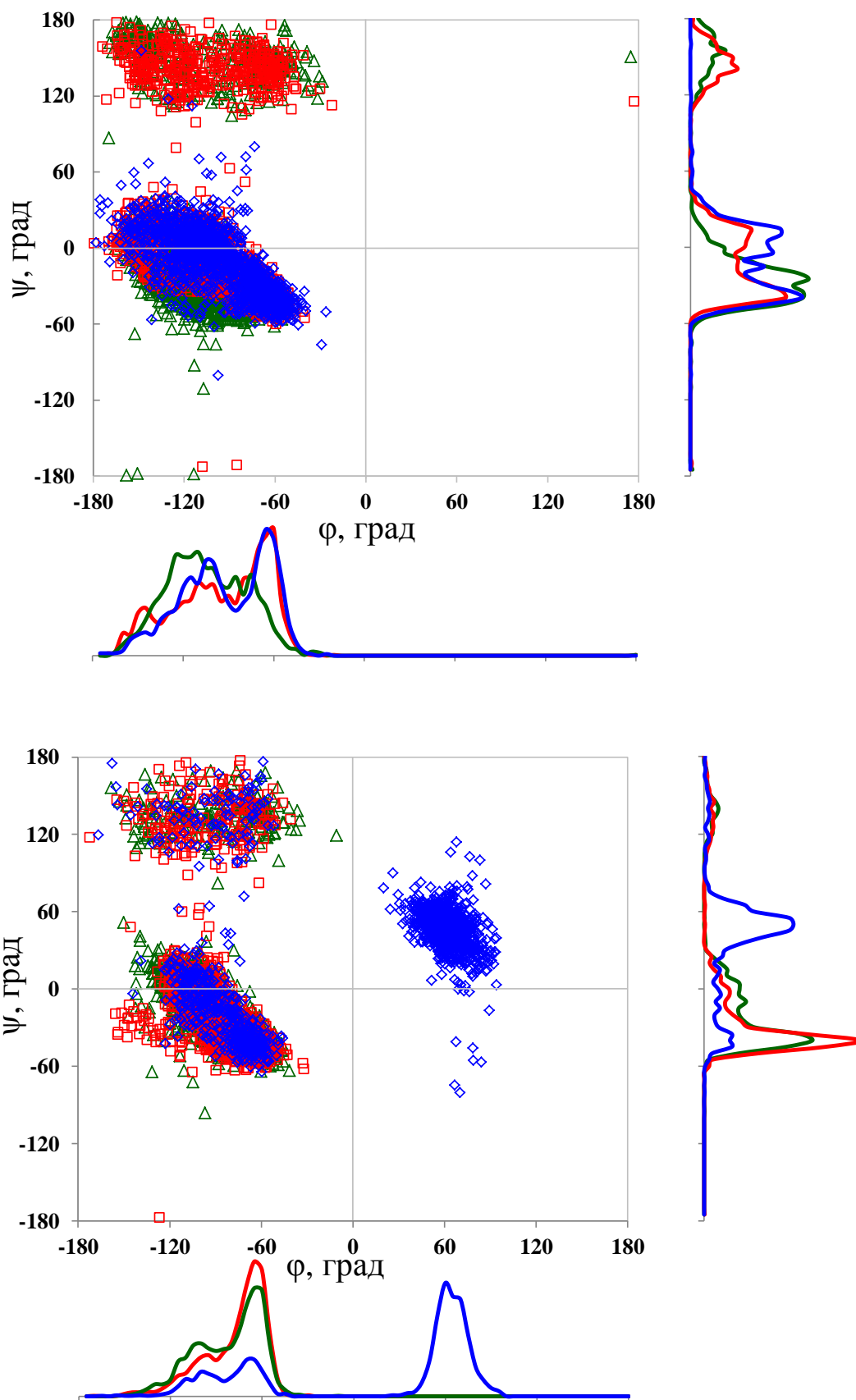


Рис. 2.32. Распределения углов ϕ и ψ на картах Рамачандрана для остатков Asn5 (сверху) и Leu8 (снизу). Красным, зеленым и синим показаны значения, соответствующие APP-IP, APP-IP-Asp6Cys и APP-IP-Asp6Ser, соответственно.

2.3. Результаты главы 2

- На примере матричной металлопротеиназы MMP-2 проведен полный цикл «интерпретация – прогноз», включающий изучение механизма протеолиза, поиск новых ингибиторов и их экспериментальную проверку.
- Проведено моделирование реакции гидролиза модельного субстрата матричной металлопротеиназы MMP-2, включая стадию выхода С-продукта из активного центра для нативной формы фермента и мутанта Glu116Asp.
- Рассмотрены методические вопросы, связанные с моделированием реакций в цинк-зависимых ферментах, и даны рекомендации по выбору протокола расчетов.
- Основываясь на данных о механизме реакции, предложены ингибиторы на основе олигопептидов и их миметиков, успешно прошедшие экспериментальную проверку.

Глава 3. Реакция гидролиза ГТФ в комплексах малых ГТФаз с белками ускорителями: механизм и способы его верификации

Исследования механизма реакции гидролиза гуанозинтрифосфата (ГТФ, GTP) комплексами малых ГТФаз с белками ускорителями представляют важную задачу. Среди рассматриваемых в данном разделе систем – комплексы Ras-GAP (рис. 3.1) и Arl3-RP2, отвечающие за передачу сигналов в клетках; нарушение их работы связывают с развитием ряда заболеваний, в частности при онкологических заболеваниях наблюдаются мутации в белковом комплексе Ras-GAP [94–96], а изменения в функционировании Arl3-RP2 приводят к слепоте [97,98].

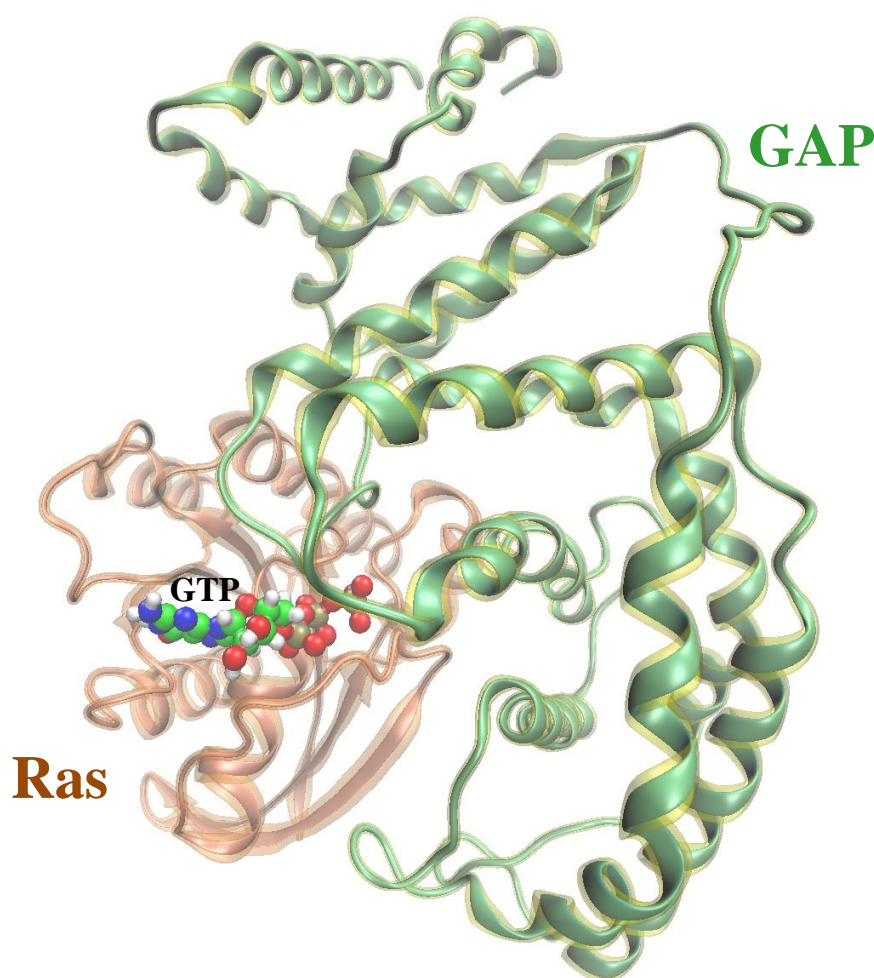


Рис. 3.1. Комплекс малой ГТФазы Ras и белка ускорителя GAP с ГТФ (GTP).

Интерес к белковому комплексу Ras-GAP не уменьшается уже в течение многих лет, причем как со стороны экспериментальных, так и теоретических исследований. Это, прежде всего, связано с медицинской важностью такого

белкового комплекса. Arl3-RP2 изучен в меньшей степени. В целом эти комплексы очень похожи, однако некоторые отличия в структуре активного центра позволяют предположить, что и механизм реакции гидролиза ГТФ будет немного отличаться, что было обнаружено в ходе решения задачи.

3.1. Гидролиз ГТФ в белковом комплексе Ras-GAP

3.1.1. Литературные данные

В данной главе большее внимание уделяется сопоставлению механизма реакции с экспериментальными данными, нежели чем методическим вопросам, поэтому в литературной части будут разбираться как теоретические, так и экспериментальные работы.

Механизм реакции гидролиза ГТФ ферментативным комплексом Ras-GAP изучается с начала 2000-х годов и интерес к этому процессу до сих пор не угасает [99–108] (включая недавние обзоры [102,104,109]). Далее будут коротко прокомментированы наиболее значимые из теоретических работ. В работе [101] был предложен механизм реакции гидролиза с участием боковой цепи Gln61 (рис. 3.2). В соответствии с рассчитанным механизмом, атака молекулой воды атома фосфора сопровождается переносом протона с молекулы воды на глутамин и с глутамина на атом кислорода отщепляемой фосфатной группы. Расчеты выполнялись методом Хартри-Фока с базисом LANL2DZ(d,p)ECP для всех атомов, кроме магния и базисом 6-31G для Mg^{2+} . Квантовая часть модельной системы составила около 40 атомов, ММ подсистема описывалась силовым полем AMBER, а электростатическое поле, создаваемое ММ подсистемой методом потенциалов эффективных фрагментов. Такой подход не может претендовать на правильное количественное описание, однако качественное представление о механизме реакции дает верно (рис. 3.3).

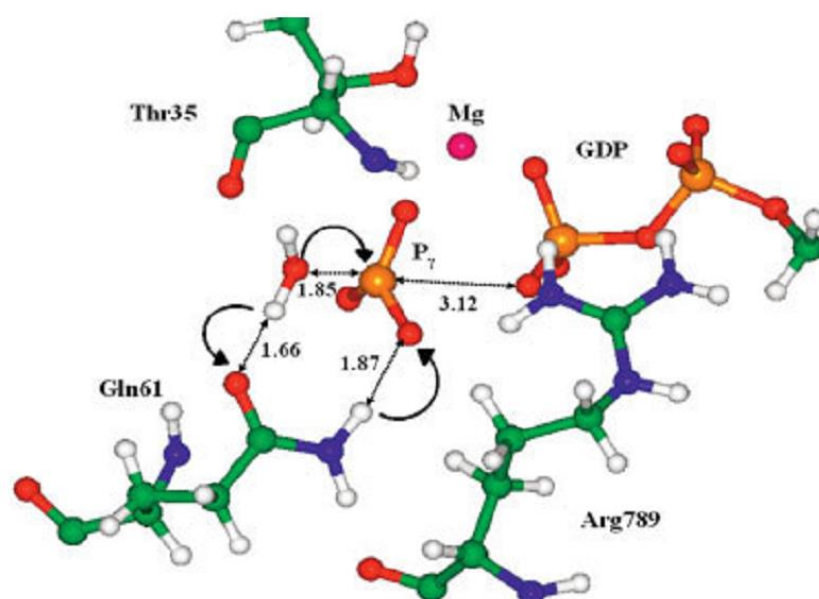


Рис. 3.2. Механизм реакции гидролиза ГТФ, предложенный в работе [101].

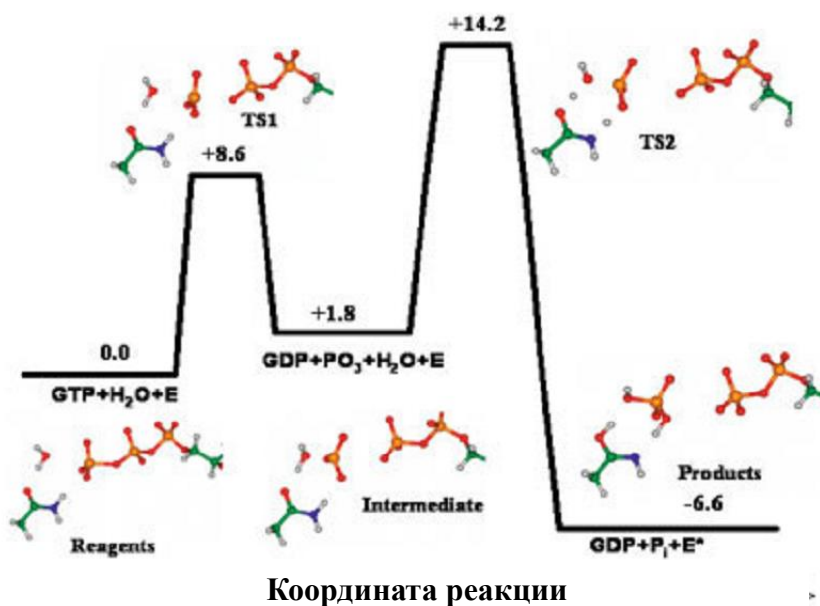


Рис. 3.3. Энергетический профиль реакции гидролиза ГТФ, предложенный в работе [101].

Предложенный в работе [101] механизм был подтвержден в более поздней работе группы А. Варшела [99]. Авторы использовали метод эмпирических валентных связей (empirical valence bond, EVB) (рис. 3.4).

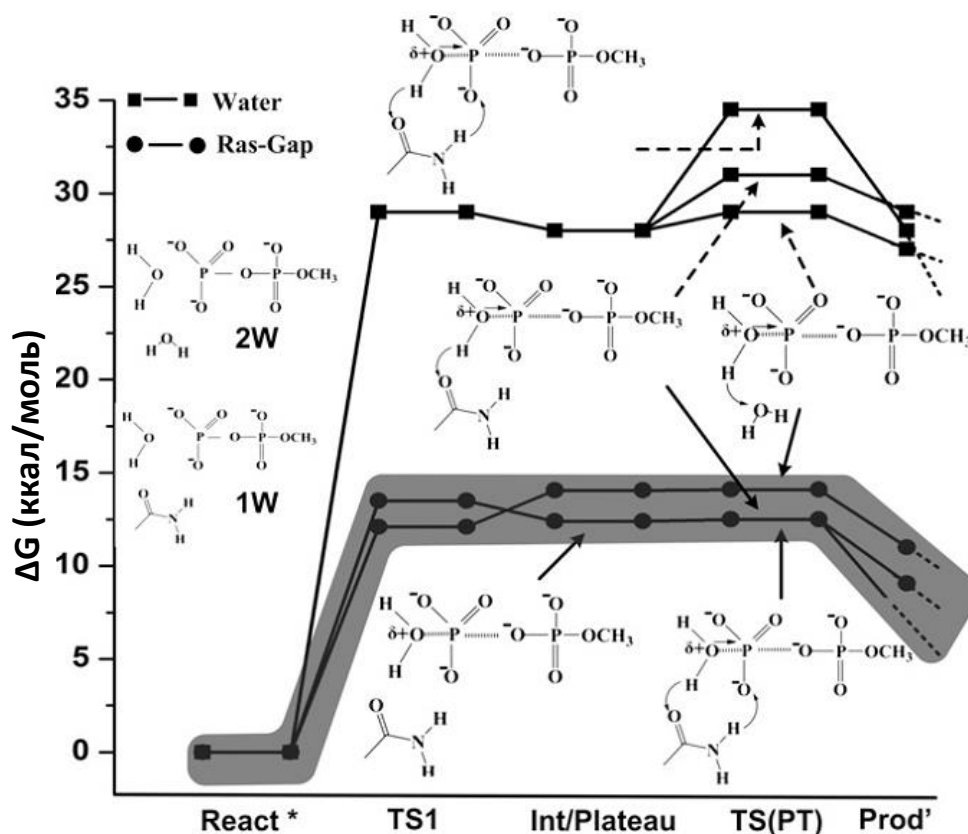


Рис. 3.4. Профили свободной энергии для реакции гидролиза ГТФ в белковом комплексе Ras-GAP и водном растворе [99].

Два принципиально разных подхода дают одинаковое представление о механизме реакции, однако количественные характеристики различаются. К недостатку выполненных ранее работ можно отнести то, что рассмотрение реакции заканчивается на стадии образования неорганического фосфата H_2PO_4^- и таутомерного глутамина, и никак не обсуждается вопрос возврата глутамина обратно в амидную форму.

К важным экспериментальным работам следует отнести работы по колебательной спектроскопии с временным разрешением, а также данные о предстационарной кинетике. Данные колебательной спектроскопии будут подробно рассмотрены в соответствующем разделе при сравнении с полученными теоретически колебательными спектрами. В данном разделе важно обратить внимание на кинетические эксперименты, представленные в работе [110] для комплекса Ras-GAP (в качестве белка ускорителя изучался сходный с ним белок NF1, но поскольку отличия с точки зрения кинетики минимальные, далее он также будет фигурировать как GAP). Полная кинетическая схема, рассмотренная в работе состоит из (1) связывания GAP с комплексом белка Ras с ГТФ, (2) гидролиза ГТФ

в активном центре белкового комплекса с образованием гуанозиндифосфата (ГДФ, GDP) и неорганического фосфата Pi, (3) выхода неорганического фосфата, (4) диссоциации белков:



Место КМ/ММ моделирования химической реакции в активном центре белкового комплекса относится к стадии 2 от фермент-субстратного комплекса до комплекса фермент-продукты, поэтому для сопоставления результатов расчетов с экспериментом необходимо знать константы скоростей отдельных стадий процесса, но не данные стационарной кинетики. Для экспериментального определения скорости расходования ГТФ на второй стадии были выбраны условия избытка фермента и проводились измерения методом остановленной струи с последующим определением соотношения ГТФ/ГДФ методом ВЭЖХ [110]. Выход неорганического фосфата контролировался с помощью флуорогенного субстрата в растворе; было обнаружено, что скорость этого процесса приблизительно вдвое меньше скорости гидролиза. На рис. 3.5 показаны экспериментальные кинетические зависимости расходования ГТФ и накопления неорганического фосфата. Обе кривые описываются моноэкспоненциальной кинетикой первого порядка с константой скорости расходования ГТФ $k_2=19.5 \text{ c}^{-1}$ (здесь константа k_2 относится ко второй стадии общей схемы процесса и выделена жирным) и накопления неорганического фосфата в растворе $k_3=7.8 \text{ c}^{-1}$. Такое соотношение констант скоростей предполагает наличие относительно стабильного интермедиата, который будет накапливаться с константой скорости k_2 и расходоваться с k_3 . Из условия материального баланса кинетические кривые были обработаны и к ним добавлена пунктирная линия, соответствующая комплексу GAP·Ras·GDP·Pi. Такому комплексу соответствуют все интермедиаты, в которых уже произошел разрыв связи P_γ-O_{βγ} и неорганический фосфат ещё находится в активном центре фермента.

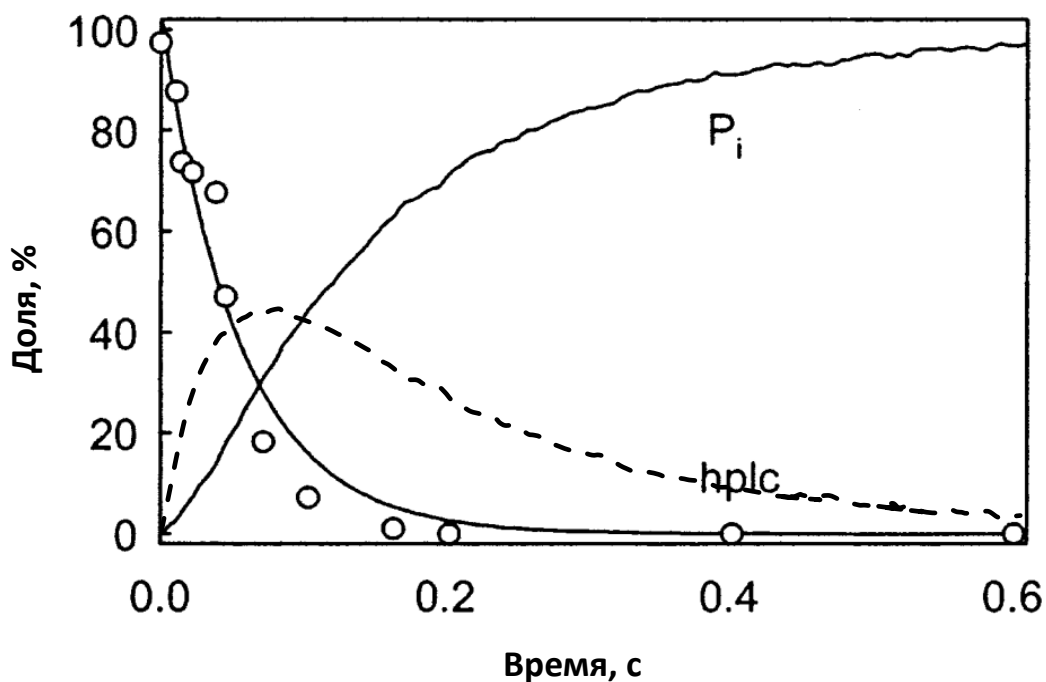


Рис. 3.5. Кинетические кривые, полученные в работе [110]. Спадающая кривая соответствует убыли ГТФ, кривая накопления относится к неорганическому фосфату в растворе, пунктирная кривая показывает изменение концентрации комплекса GAP·Ras·GDP·P_i. Данные получены при температуре 303 К.

По данным низкотемпературной колебательной спектроскопии с временным разрешением [111] константа скорости расщепления фермент-субстратного комплекса GAP·Ras·GDP·P_i составляет $0.77 \pm 0.24 \text{ с}^{-1}$ при $T=260 \text{ К}$. Такое значение соответствует константе скорости 19 с^{-1} при температуре 303 К.

3.1.2. Механизм гидролиза ГТФ в белковом комплексе Ras-GAP

В работе рассматривалась модельная система, состоящая из белкового комплекса Ras-GAP с гуанозинтрифосфатом, полученная из кристаллической структуры PDB ID: 1WQ1 [112]. Размер модельной системы составлял более 5000 атомов, из которых 90 описывались в рамках теории функционала электронной плотности в варианте PBE0-D3/cc-pvdz (рис. 3.6). Вся остальная часть белковой макромолекулы и сольватирующие молекулы воды описывались с помощью классического силового поля AMBER [113–115].

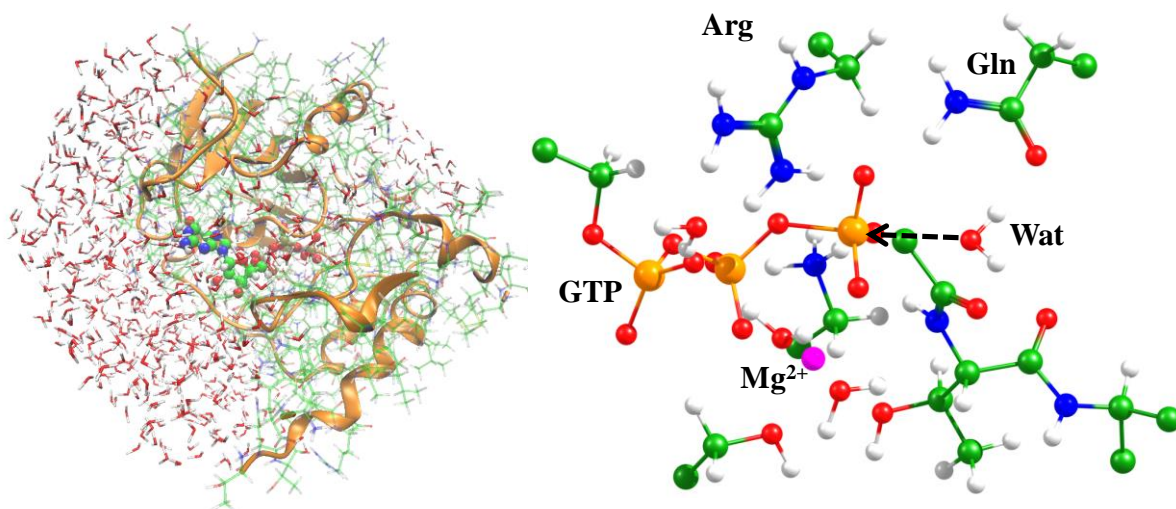


Рис. 3.6. Модельная система для КМ/ММ расчетов (слева) и КМ подсистема (справа).

Мы установили, что механизм рассматриваемой реакции состоит из пяти элементарных стадий (рис. 3.7). Первые две стадии ($ES \rightarrow I1$ и $I1 \rightarrow I2$) относятся к разрыву $P_\gamma-O_{\beta\gamma}$ связи и образованию неорганического фосфата $H_2PO_4^-$ (Pi). В результате образуется таутомерная имидная форма глутамина и необходимо провести три дополнительных стадии для регенерации фермента, то есть возвращения обратно в амидную форму функциональной группы глутамина.

На рис. 3.8 показаны геометрические параметры полученных стационарных точек, соответствующих минимумам на поверхности потенциальной энергии и переходным состояниям (TS). На первой стадии реакции происходит разрыв связи $P_\gamma-O_{\beta\gamma}$ и каталитическая молекула воды подходит ближе к атому фосфора P_γ . В результате образует молекула метафосфата $P_\gamma O_3^-$, при этом связь с молекулой воды не образуется ($r(P_\gamma \dots O-Wat) = 1.87 \text{ \AA}$). На второй стадии происходит перенос протона с каталитической молекулы воды на атом кислорода глутамина и с атома азота глутамина на атом кислорода отщепившегося фосфата, а также образование ковалентной связи между атомом кислорода молекулы воды и фосфором P_γ . Таким образом, на второй стадии образуются неорганический фосфат $H_2PO_4^-$ и имидная форма глутамина (рис. 3.9). В структуре интермедиата I2 неорганический фосфат координирован водородными связями с молекулярными группами белка Ras (Thr35, Gln61, Lys16, Mg^{2+}) и GAP (Arg789).

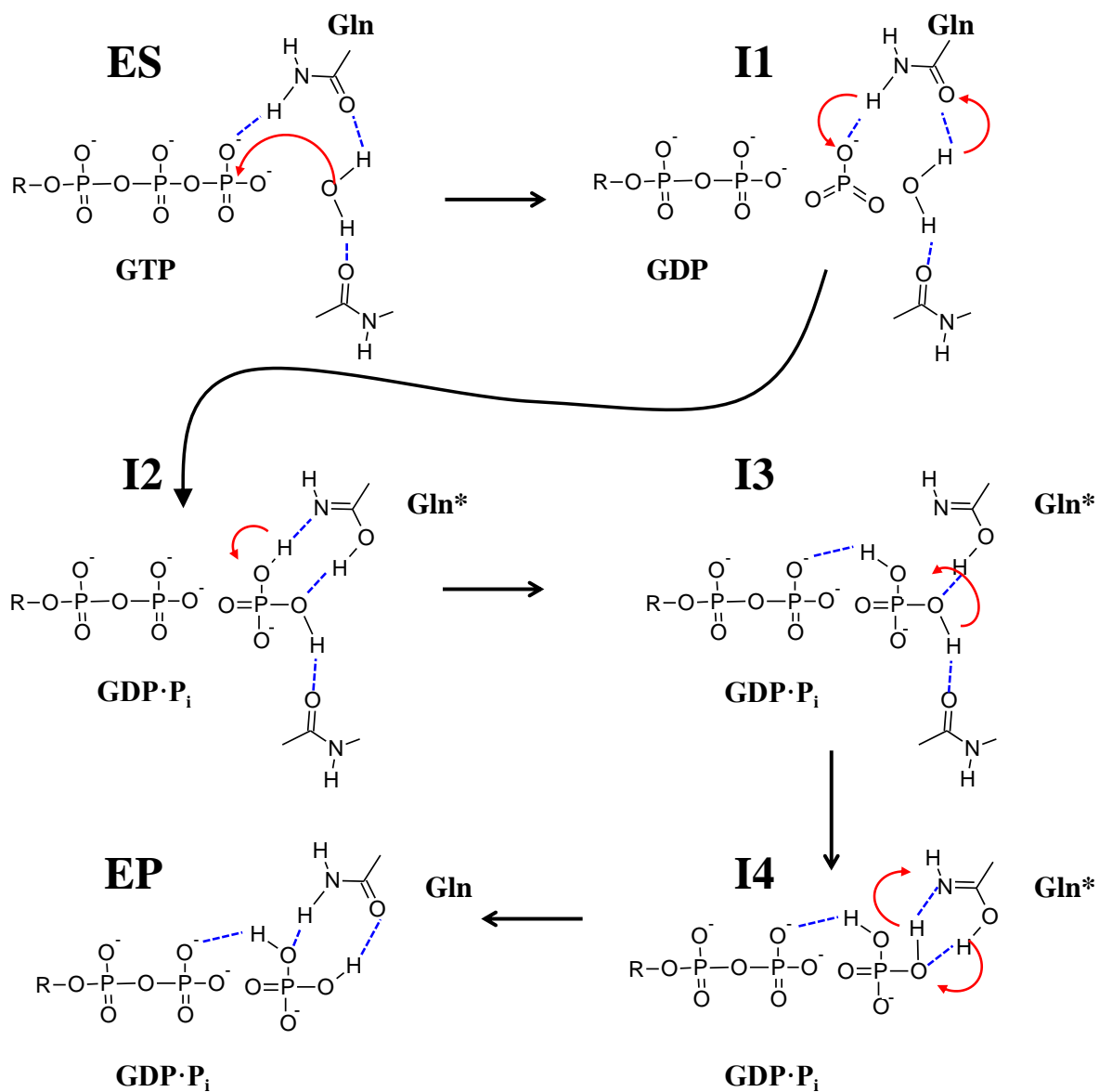


Рис. 3.7. Механизм реакции гидролиза ГТФ в активном центре белкового комплекса Ras-GAP.

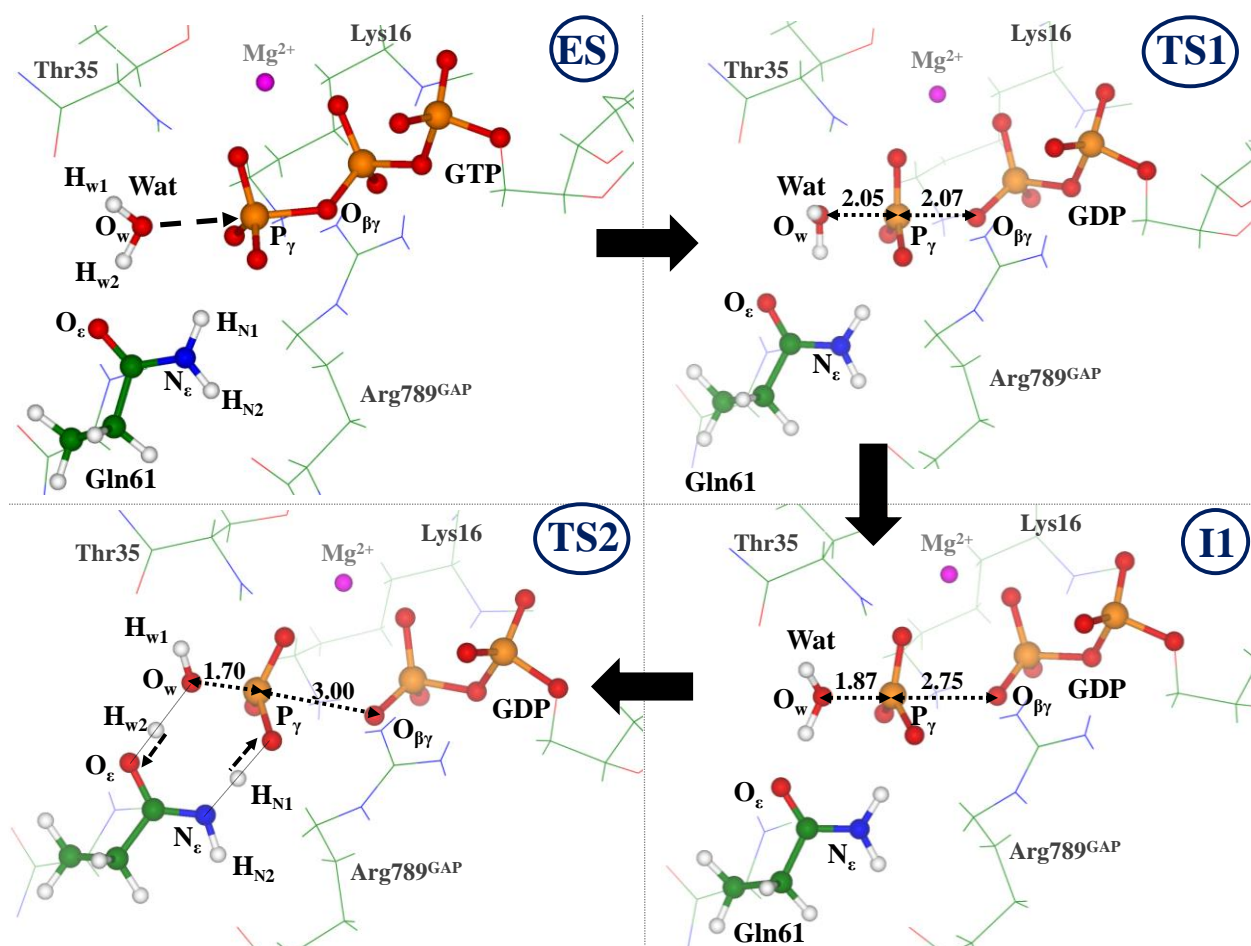


Рис. 3.8. Равновесные геометрические конфигурации стационарных точек, соответствующих минимуму на ППЭ ES и I1 и переходным состояниям TS1 и TS2 реакции гидролиза ГТФ в белковом комплексе Ras-GAP. Здесь и далее в главе 3 расстояния представлены в Å.

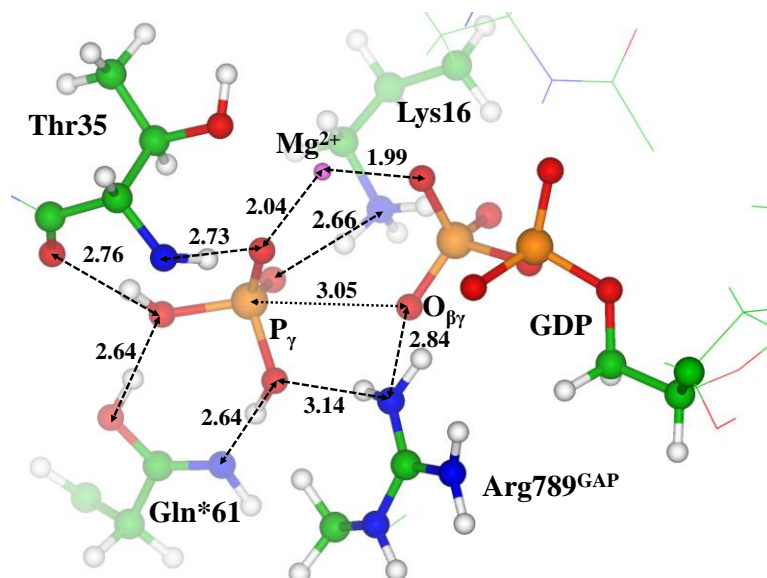


Рис. 3.9. Равновесная геометрическая конфигурация интермедиата I2 реакции гидролиза ГТФ в белковом комплексе Ras-GAP.

В соответствии с предложенным механизмом, регенерация фермента начинается со стадии поворота O_2-H_{N1} группы вокруг $P_\gamma-O_2$ связи неорганического фосфата (рис. 3.11), в результате чего образуется водородная связь H_{N1} с атомом $O_{\beta\gamma}$ β -фосфатной группы ГДФ. Следующий поворот происходит вокруг связи $P_\gamma-O_w$ группы O_w-H_{w1} с образованием интермедиата I4. На последней стадии происходит перенос протонов H_{w1} и H_{w2} аналогично стадии $I1 \rightarrow I2$. Как видно из энергетической диаграммы (рис. 3.10), барьеры на стадии регенерации фермента заметно выше, чем на стадии разрыва связи P-O.

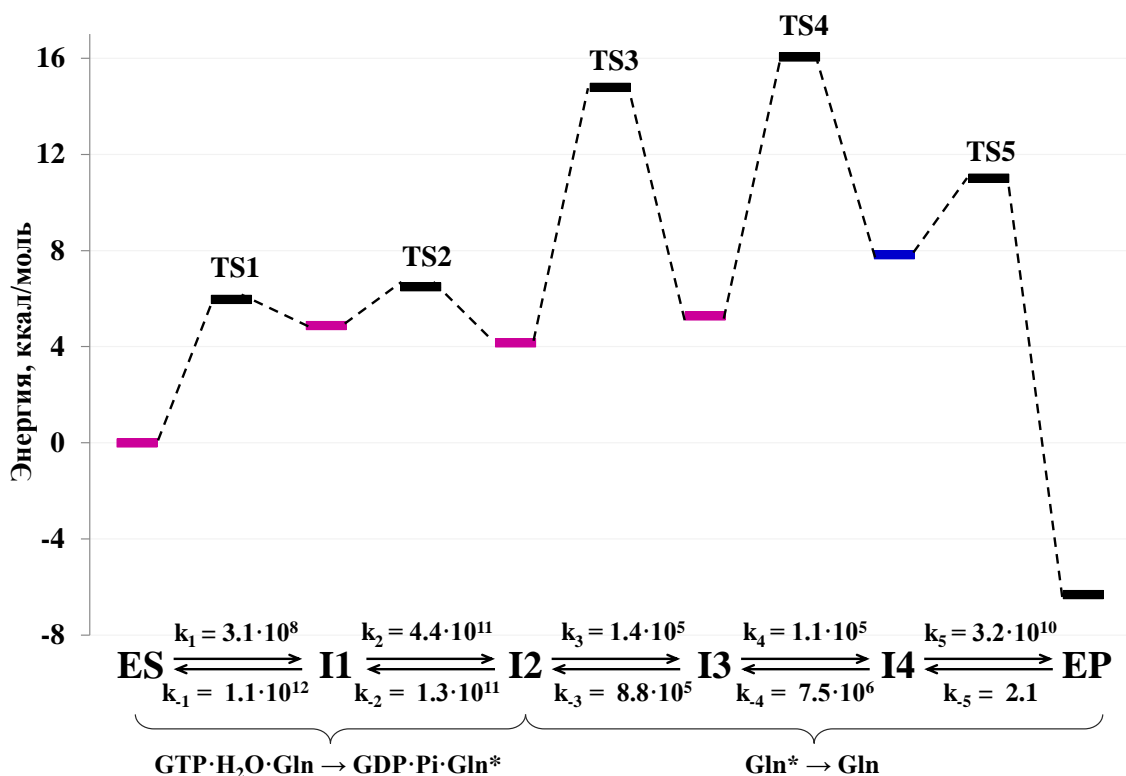


Рис. 3.10. Энергетический профиль реакции гидролиза ГТФ в белковом комплексе Ras-GAP. В нижней части рисунка показаны константы скоростей элементарных стадий, вычисленные по теории активированного комплекса при $T = 303 \text{ K}$ (в с^{-1}).

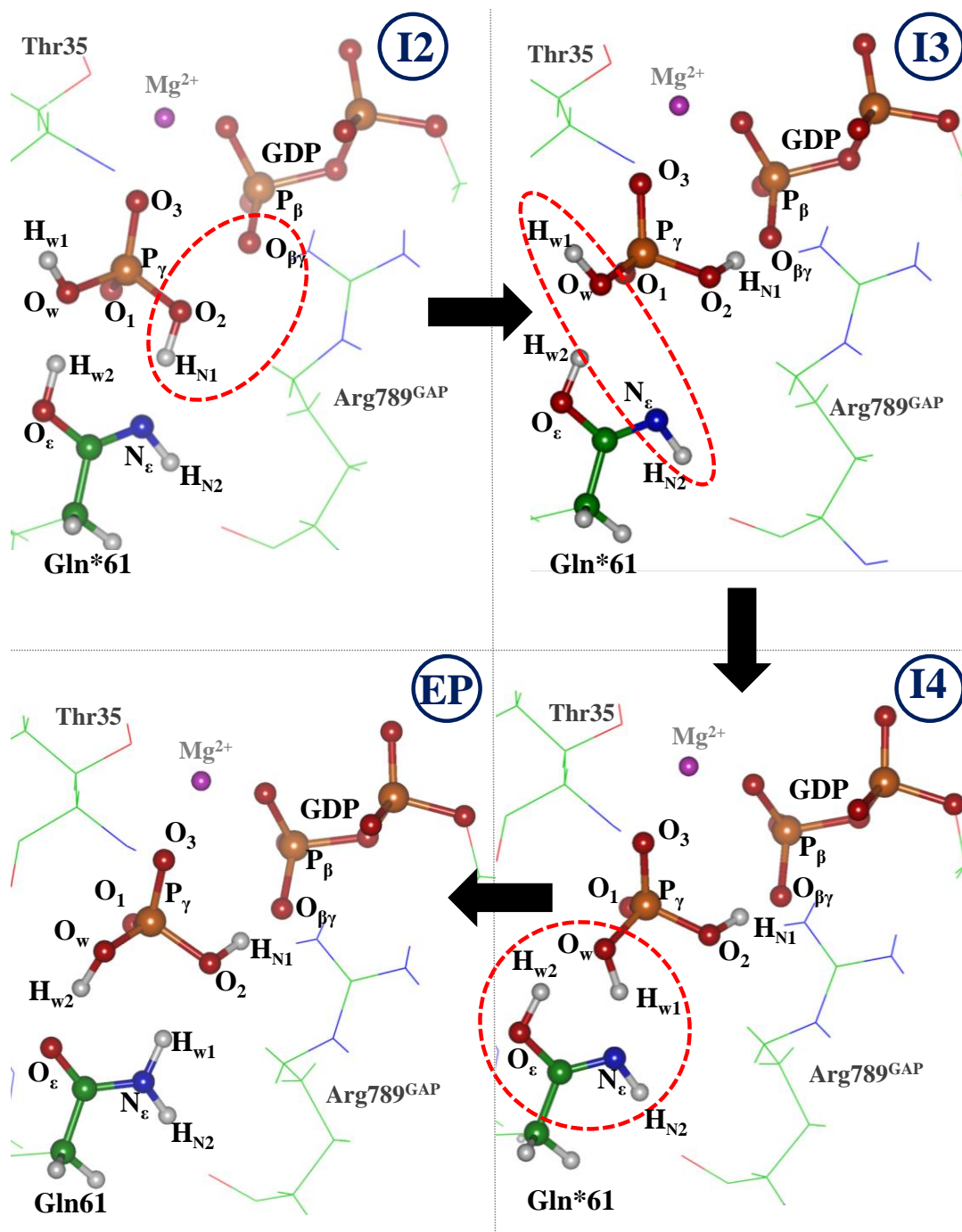


Рис. 3.11. Равновесные геометрические конфигурации интермедиатов стадии регенерации фермента (I2, I3 и I4), а также комплекса фермент-продукты (EP) для реакции гидролиза ГТФ в белковом комплексе Ras-GAP.

3.1.3. Сопоставление механизма реакции с экспериментальными данными

Как правило, для ферментативных реакций в литературе представлены данные о стационарной кинетике Михаэлиса-Ментен, поскольку такие результаты могут быть получены гораздо проще с точки зрения протокола проводимого эксперимента и требований к аппаратной части, а также они гораздо дешевле,

поскольку требуют меньшее количество фермента. Вместе с тем, они дают информацию, характеризующую фермент. Однако для изучения механизма реакции требуются знания предстационарной кинетики, дающие возможность получить константы скоростей если не элементарных стадий, то каких-либо фрагментов процесса.

Кинетическая схема, соответствующая полученному ППЭ образования комплекса фермент-продукты EP из фермент-субстратного комплекса ES, состоит из пяти обратимых стадий (рис. 3.6). Такую схему следует сравнивать со второй стадией процесса, описанного в экспериментальной работе [110].

По теории переходного состояния были рассчитаны константы скоростей всех элементарных стадий, как прямых, так и обратных, k_{+n} и k_{-n} ($n=1-5$). Далее была записана система дифференциальных уравнений для ES, EP и всех интермедиатов, и с помощью программы KINET [116] найдены численные решения и построены кинетические кривые.

На первом этапе были воспроизведены экспериментальные кинетические кривые (рис. 3.5), при этом была полностью рассчитана кинетическая схема, представленная в работе [110], но вместо экспериментальных констант на стадии 2 подставлены соответствующие значения, полученные из рассчитанного в данной работе профиля реакции. На рис. 3.12 представлено наложение экспериментальных и рассчитанных кинетических кривых; хорошее согласие свидетельствует об адекватности предложенной модели. Важно отметить, что при измерении соотношения концентраций ГТФ и ГДФ, формально, к ГДФ относятся интермедиаты I1, I2, I3, I4, а также EP. Но, как видно из кинетической схемы, интермедиаты реакции I1-I4 лежат достаточно высоко по энергии, поэтому их концентрации малы и основной вклад в комплекс GAP·Ras·GDP·Pi дает EP. В рассчитанной кинетической схеме значение константы скорости гидролиза ГТФ составило 15 c^{-1} .

Далее были построены кинетические кривые, основываясь только на рассчитанных константах скоростей для процесса перехода из ES в EP (рис. 3.13). Скорость накопления EP равна скорости расходования ES, и обе описываются в рамках кинетики реакции первого порядка с константой скорости равной 15 c^{-1} .

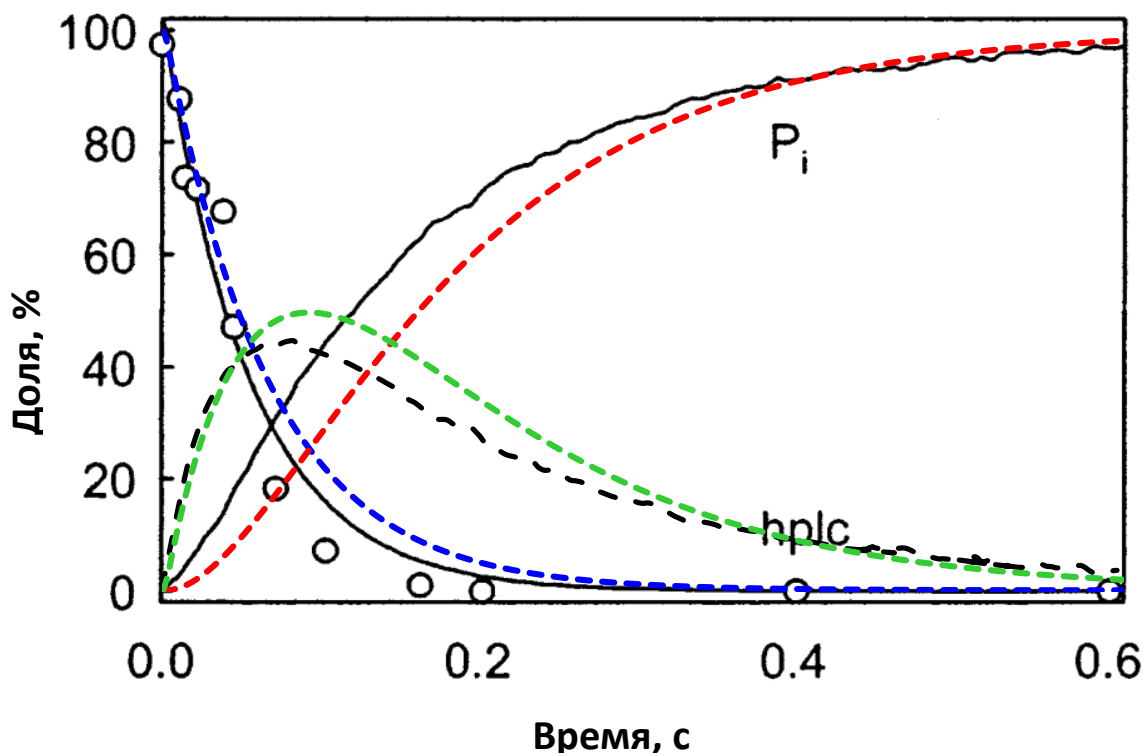


Рис. 3.12. Наложение рассчитанных кинетических кривых (P_i красным, ES синим и EP зеленым) на экспериментальные [110].

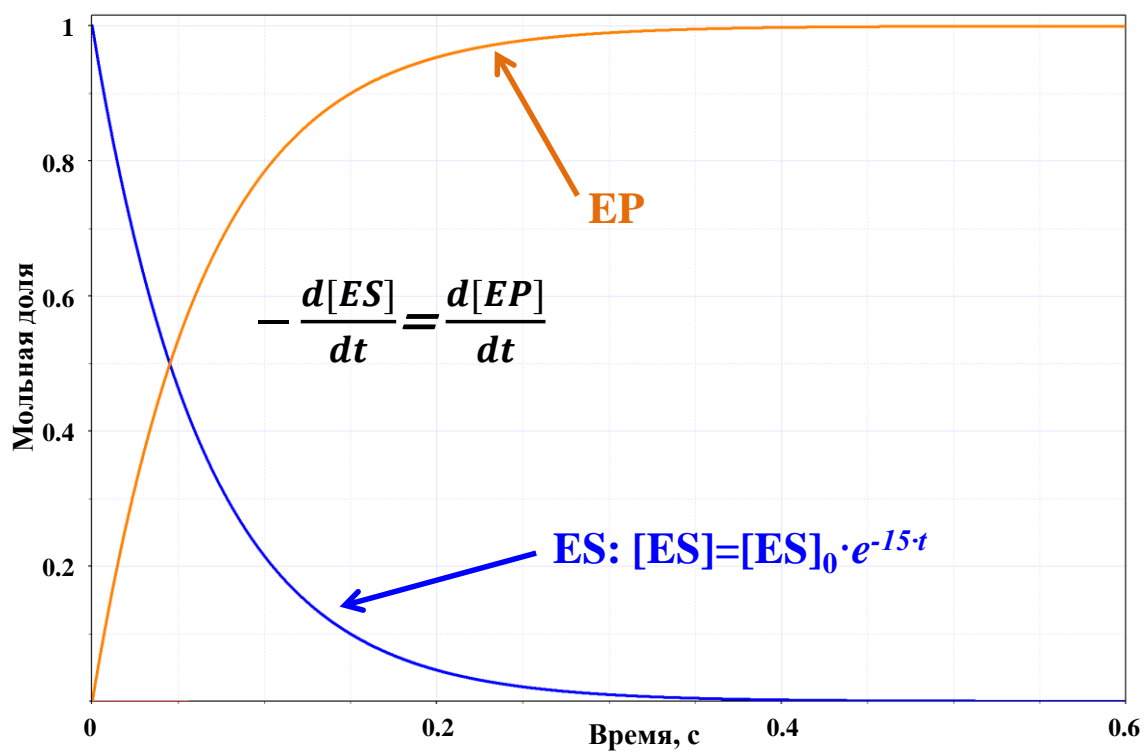


Рис. 3.13. Кинетические кривые для ES и EP, полученные численным решением кинетических уравнений.

Чтобы удостовериться в правильности полученных результатов, система дифференциальных уравнений была решена аналитически с применением ряда приближений. В частности, из анализа полученных численным решением кривых стало понятно, что ES находится в квазиравновесии I1, I2, I3:

$$\frac{[I_1]}{[ES]} = K_1; \frac{[I_2]}{[ES]} = K_2; \frac{[I_3]}{[ES]} = K_3.$$

Концентрация интермедиата I4 очень мала и постоянна во времени согласно кинетическим кривым, поэтому для I4 применимо квазистационарное приближение. Тогда соответствующее кинетическое уравнение примет вид

$$\frac{d[I_4]}{dt} = k_4 \cdot [I_3] - (k_5 + k_{-4}) \cdot [I_4] + k_{-5} \cdot [EP] \approx k_4 \cdot [I_3] - (k_5 + k_{-4}) \cdot [I_4] \approx 0.$$

Аналитическое выражение для EP может быть упрощено, если пренебречь обратной стадией (I4 ← EP)

$$\frac{d[EP]}{dt} = k_5 \cdot [I_4] - k_{-5} \cdot [EP] \approx k_5 \cdot [I_4]$$

Применение приведенных приближений дает аналитическое выражение для скорости образования комплекса EP и расходования ES:

$$-\frac{d[ES]}{dt} = \frac{d[EP]}{dt} = \frac{K_3 \cdot k_4 \cdot k_5}{k_{-4} + k_5} \cdot [ES] \approx K_3 \cdot k_4 \cdot [ES]$$

Если рассчитать значения K_3 и k_4 из энергетической диаграммы (рис. 3.10), значение эффективной константы $k_{eff} = K_3 \cdot k_4 \sim 17 \text{ с}^{-1}$. Это значение практически совпадает с величиной эффективной константы скорости, полученной в результате численного решения системы дифференциальных уравнений.

Расчет эффективной константы скорости при температуре 260 К дает значение 0.16 с^{-1} , что хорошо согласуется с результатами низкотемпературных кинетических экспериментов, дающих значение $0.77 \pm 0.24 \text{ с}^{-1}$ [111].

3.1.4. Замена каталитического глутамина на нитро-аналог

Одним из экспериментальных подходов для определения роли глутамина в гидролизе ГТФ было введение на его место других аминокислот, в том числе неприродных: было показано, что замена каталитического Gln61 на NGln (аминокислоту, содержащую нитро-группу вместо амидной) не приводит к потере каталитической активности [117], что было интерпретировано как невозможность участия глутамина в передаче протона.

Согласно литературным данным в газовой фазе более устойчивой формой нитро группы является нитро форма, однако в конденсированной фазе можно стабилизировать *аци*-нитро форму [118–120] (рис. 3.14).

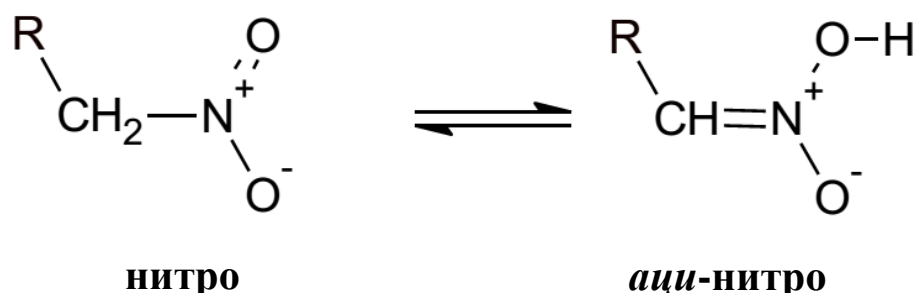


Рис. 3.14. Таутомерные формы NГln.

На рис. 3.15 показаны равновесные геометрические конфигурации, полученные для двух разных таутомерных форм. Согласно расчетам методом PBE0-D3/сс-pVDZ/AMBER с КМ подсистемой аналогичной таковой для нативного фермента, обе формы являются практически изоэнергетичными, и *аци*-нитро форма лежит на 0.5 ккал/моль ниже, чем нитро форма. Причины лучшей стабилизации *аци*-нитро формы понятны, если рассматривать все окружение активного центра [121].

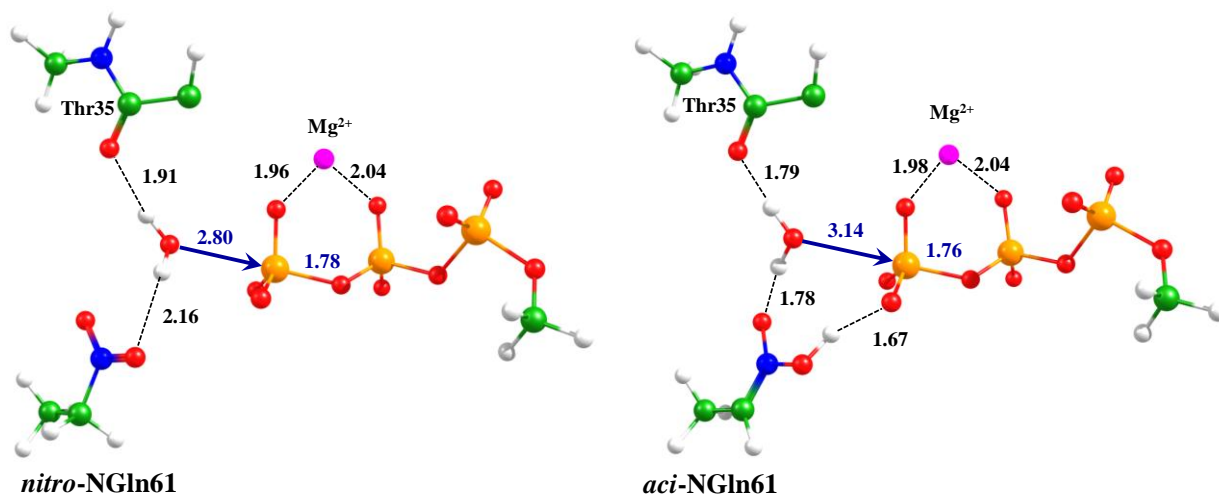


Рис. 3.15. Фермент-субстратные комплексы мутантного фермента Ras-GAP Gln61NGln с нитро (слева) и *аци*-нитро (справа) формой NГln61.

Схема реакции гидролиза представлена на рис. 3.16 и имеет много общего с механизмом реакции гидролиза в нативном ферменте (рис. 3.7).

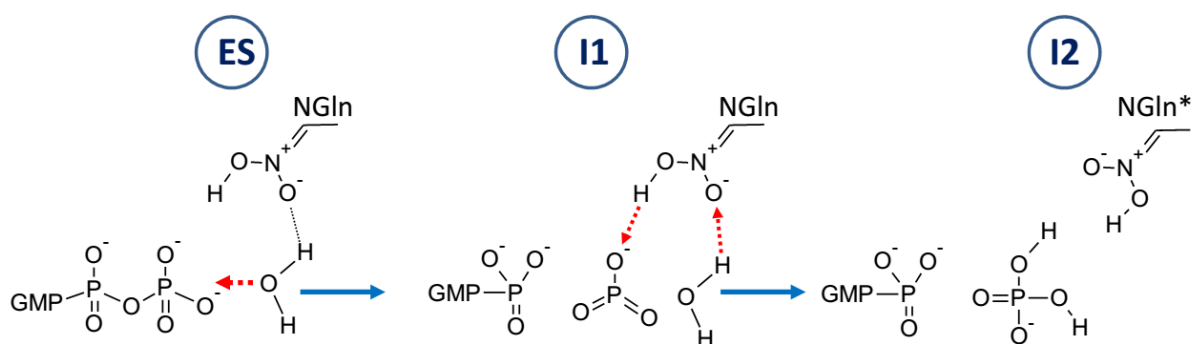


Рис. 3.16. Механизм реакции гидролиза в мутантном ферменте Ras-GAP Gln61NGln.

Стадия регенерации фермента имеет сходный механизм с регенерацией нативного фермента и также включает в себя 2 поворота ОН групп неорганического фосфата и передачу протонов на последней стадии. Значительно отличаются энергетические профили для двух реакций (рис. 3.17). Это, прежде всего, связано с тем, что интермедиат I2 содержит менее выгодную имидную форму Gln61 в нативном ферменте, в то время как в мутантной форме интермедиат I2 находится в *аци*-нитро форме.

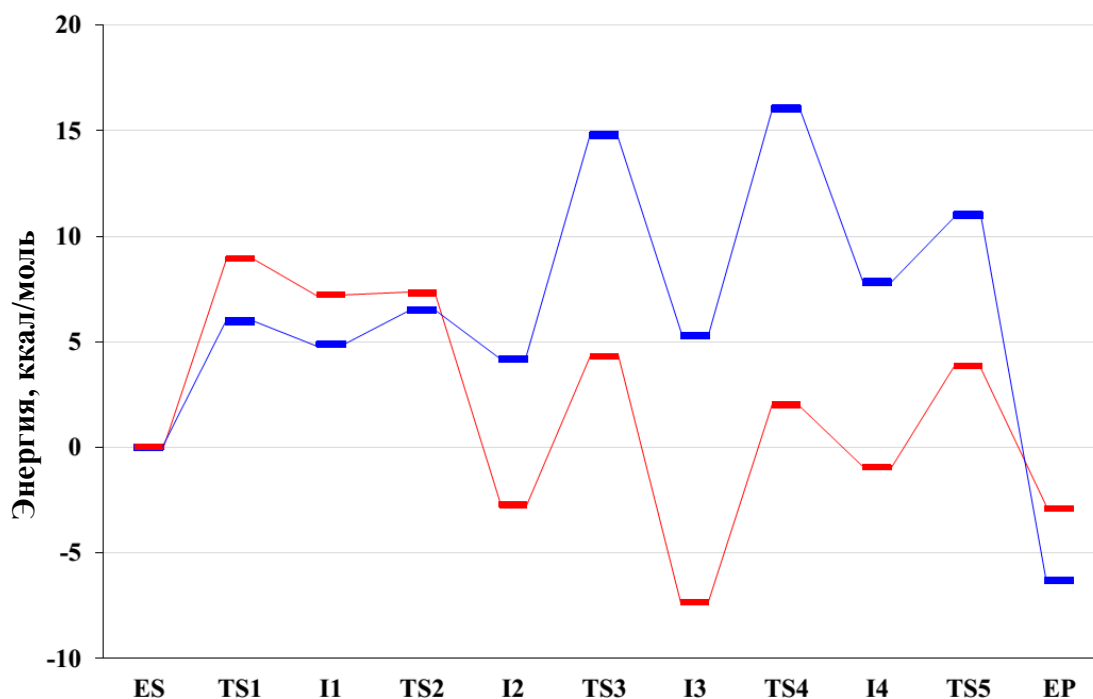


Рис. 3.17. Профили потенциальной энергии для реакции гидролиза ГТФ в Ras-GAP (синим) и его мутантной форме Ras-GAP Gln61NGln (красным).

Полученный механизм реакции гидролиза ГТФ в мутантной форме белкового комплекса Gln61NGln показывает, что нитроглутамин в *аци*-форме

может выполнять функцию переноса протона аналогично амидной группе глутамина.

3.1.5. Влияние точечных мутаций на динамику фермент-субстратного комплекса

Точечные мутации в белке Ras приводят к замедлению скорости реакции гидролиза в белковом комплексе Ras-GAP. Влияние мутаций по 61 позиции очевидно так как Gln61 участвует в реакции. В то же время замедление скорости реакции при возникновении мутаций глицина в позициях 12 и 13 не очевидны. В работе были изучены два мутанта Gly12Val и Gly13Val, в первом из них константа скорости гидролиза уменьшается в 1000 раз, а во втором - в 100 [122].

На основании модели, рассмотренной в предыдущих разделах, основанной на кристаллической структуре PDB ID: 1WQ1 [112] были получены модельные системы с аминокислотными заменами в белке Ras Gly13Val и Gly12Val. Для всех трех структур были проведены расчеты методом молекулярной динамики с КМ/ММ потенциалами, при этом КМ подсистема описывалась в рамках BLYP-D3/GPW-DZVP. Рассчитывались траектории 10-30 пс с шагом интегрирования 1 фс при температуре 300 К. Из МД траекторий анализировались флуктуации ключевых расстояний и в целом динамика активного центра [123].

Ключевым параметром в реакции гидролиза субстрата является расстояние нуклеофильной атаки между атомами P_{γ} и кислородом молекулы воды (рис. 3.18). В случае мутанта G12V это расстояние флуктуирует гораздо сильнее (табл. 3.1), что явно свидетельствует о затруднениях при протекании реакции.

Как видно из таблицы 3.1 и рис. 3.19, в комплексе ^{G13V}Ras-GAP место небольшого остатка глицина занимает большой гидрофобный валин, что приводит к незначительному отклонению боковой цепи аргинина и приобретению большей подвижности γ -фосфатной группы. Протон HNE с функциональной группы Gln61, который непосредственно участвует в реакции, образует водородную связь то с атомом O1, то с O3 γ -фосфатной группы. Это и является причиной замедления реакции.

$R(P_{\gamma}\text{-O(Wat)}), \text{ \AA}$

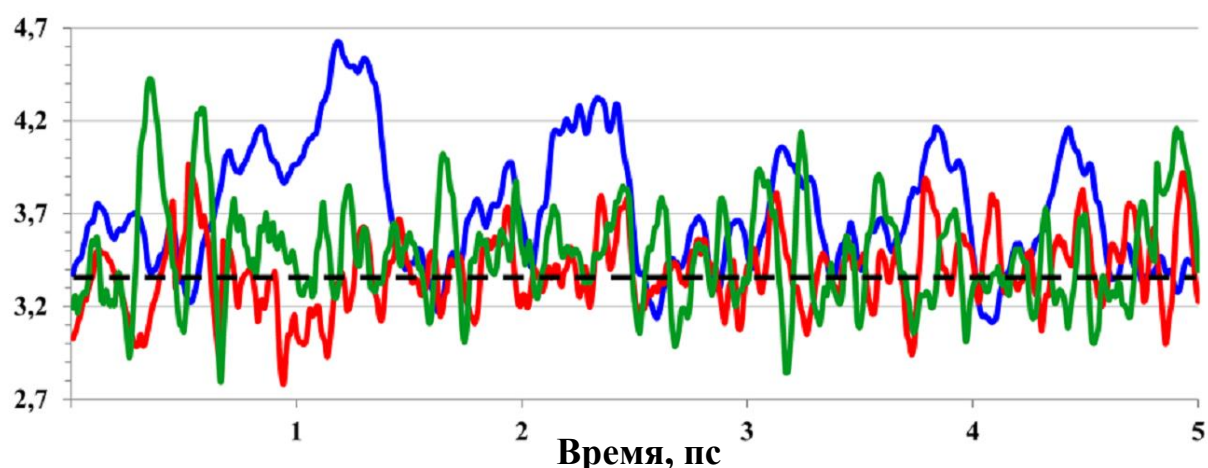


Рис. 3.18. Распределение расстояний $P_{\gamma}\dots O\text{-Wat}$ в фермент-субстратных комплексах Ras-GAP (красным), G^{12V} Ras-GAP (синим) и G^{13V} Ras-GAP (зелёным) вдоль фрагмента МД траектории.

Таблица 3.1. Сравнение ключевых геометрических параметров в динамике фермент-субстратных комплексов нативного Ras-GAP G^{13V} Ras-GAP и G^{12V} Ras-GAP. Критериями наличия водородной связи ($X\text{-H}\dots Y$) являются $r(H\dots Y) < 2.2 \text{ \AA}$ и $\angle(X\text{-H}\dots Y) > 120^\circ$. В строке «%» указана доля конформаций, в которых есть водородная связь или доля продуктивных конформаций с $r(P_{\gamma}\dots O\text{-Wat}) < 3.4 \text{ \AA}$.

Расстояние, \AA	Показатель	Ras-GAP	G^{13V} Ras-GAP	G^{12V} Ras-GAP
$P_{\gamma}(\text{GTP})\dots O(\text{Wat})$	средн. (ст. откл.)	3.38 (0.21)	3.56 (0.39)	3.71 (0.38)
	max / min	3.96 / 2.78	4.77 / 2.79	5.35 / 2.93
	%	53 %	38 %	18 %
Gln61-HNE...O1	средн. (ст. откл.)	2.29 (0.32)	2.43 (0.29)	3.13 (0.31)
	max / min	3.40 / 1.56	3.32 / 1.72	4.23 / 2.24
	%	42 %	24 %	0 %
Gln61-HNE...O3	средн. (ст. откл.)	3.11 (0.39)	2.56 (0.53)	2.43 (0.25)
	max / min	4.09 / 2.12	4.11 / 1.65	3.23 / 1.80
	%	<1 %	32 %	19 %
Thr35-O...H(Wat)	средн. (ст. откл.)	1.91 (0.15)	2.05 (0.18)	1.89 (0.16)
	max / min	2.87 / 1.55	3.66 / 1.52	2.55 / 1.50
	%	97 %	62%	95 %

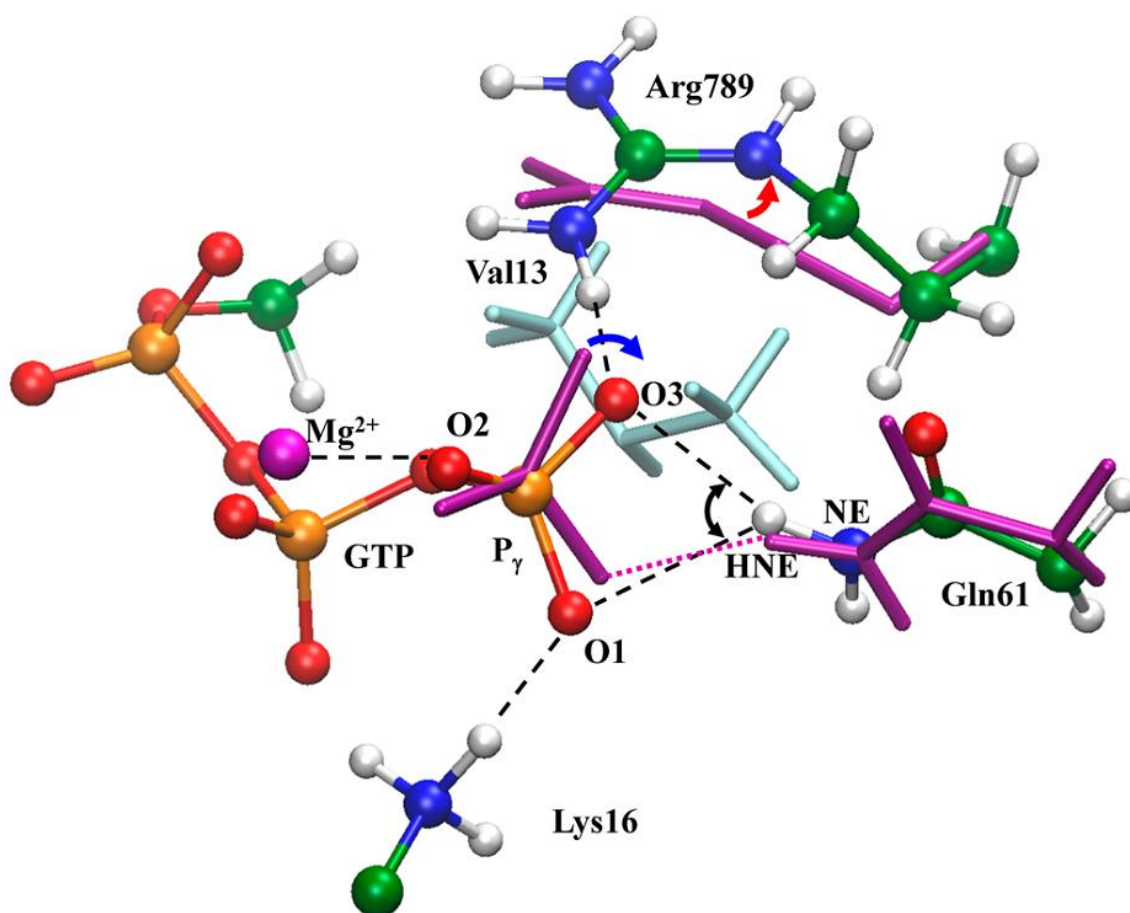


Рис. 3.19. Конформационные изменения, происходящие в активном центре белкового комплекса при введении точечной мутации G13V (шаро-стержневая модель). Малиновым показаны молекулярные фрагменты фермент-субстратного комплекса Ras-GAP.

Динамика структуры фермент-субстратного комплекса с мутантным ферментом G^{12V} Ras-GAP сильно отличается от нативного Ras-GAP. Остаток валина в 12 позиции белка Ras влияет на положение каталитического глутамина (рис. 3.20, табл. 3.1), в результате чего происходят значительные изменения положения каталитической молекулы воды. Расстояние нуклеофильной атаки увеличивается и сильно флуктуирует, что приводит к увеличению барьера реакции. Также практически полностью разрывается водородная связь между функциональной группой глутамина и атомом кислорода фосфатной группы, что делает затруднительным перенос протонов. Все это и приводит к наблюдаемой в эксперименте значительной потере каталитической активности.

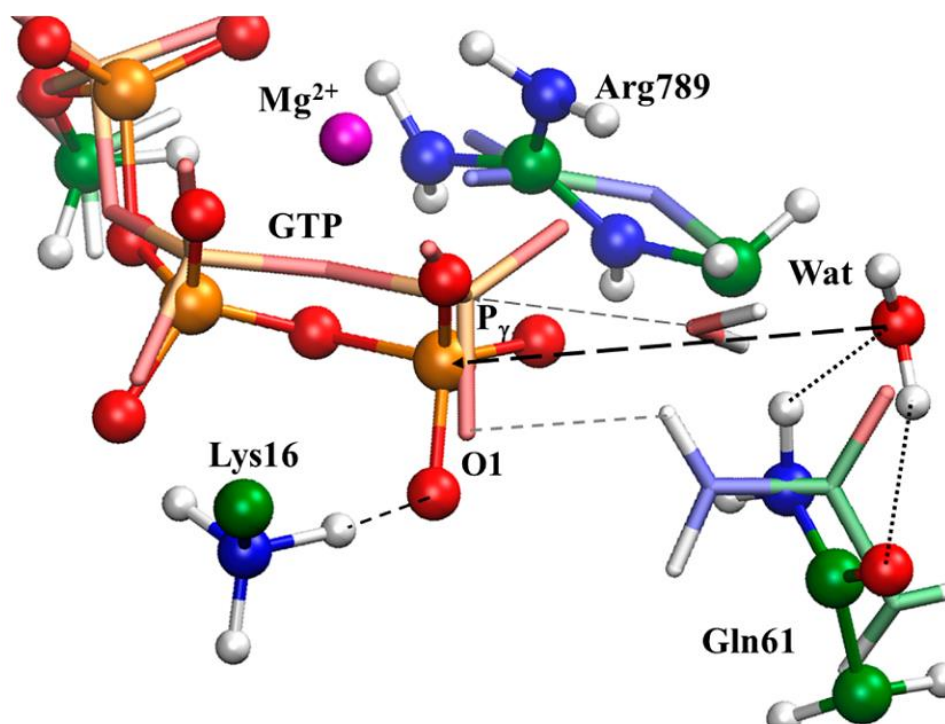


Рис. 3.20. Иллюстрация конформационных изменений, происходящих в активном центре белкового комплекса при введении точечной мутации G12V (шаро-стержневая модель). Стержневой моделью пастельных цветов показан нативный фермент-субстратный комплекс.

3.1.6. Колебательные спектры с временным разрешением

В экспериментальных работах [124–127] приведены колебательные спектры для фермент-субстратного комплекса и интермедиатов, в которых ГДФ и неорганический фосфат находятся в активном центре. На рис. 3.21 показаны фрагмент субстрата и неорганический фосфат, что поясняет механизм изотопного мечения в экспериментальных работах. При анализе колебательных спектров были проведены расчеты Гессианов в КМ/ММ модели с КМ частью, совпадающей с рассмотренной в разделе 3.1.2 (КМ1) и с уменьшенной, в которую включались трифосфат, молекула воды, Gln61 и катион магния (КМ2) [128].

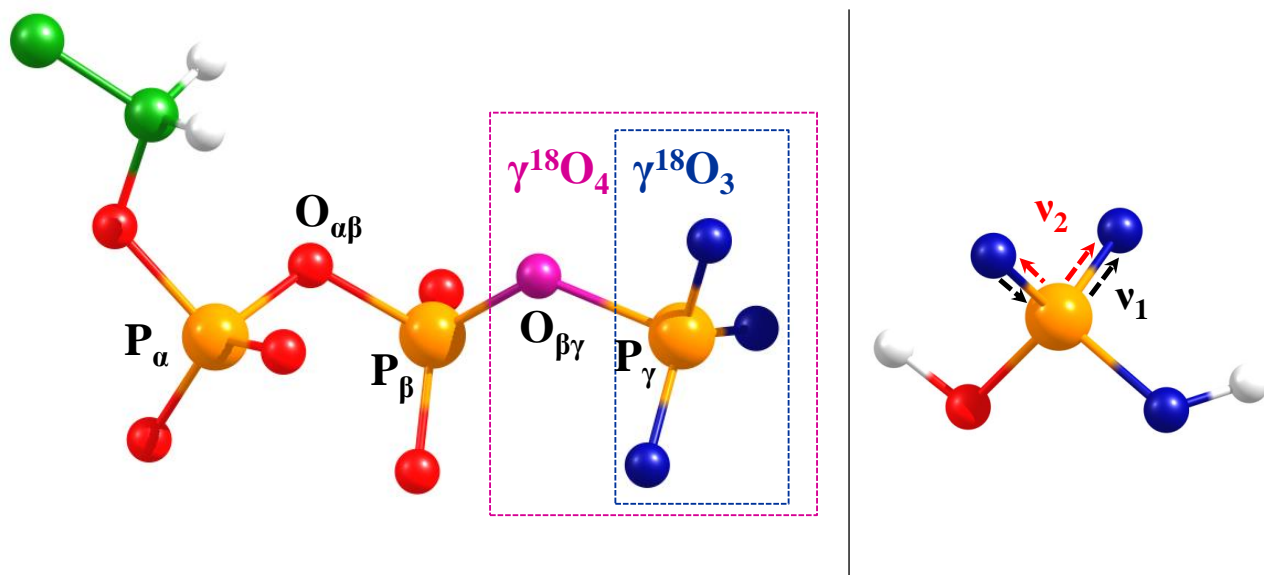


Рис. 3.21. Изотопные метки в ГТФ. Слева показаны замещения ^{16}O на ^{18}O в γ -фосфатной группе и мостиковом кислороде $\text{O}_{\beta\gamma}$. Справа показаны изотопные метки неорганического фосфата.

Таблица 3.2. Колебательные частоты (в см^{-1}), изотопные сдвиги (в скобках в см^{-1}) и интенсивности (в квадратных скобках в км/моль) для фермент-субстратного комплекса. Экспериментальные данные (Экс) соответствуют $\text{Ras}\cdot\text{NF1}\cdot\text{GTP}\cdot\text{H}_2\text{O}$ комплексу [124]. Рассчитанные величины представлены для двух модельных систем КМ1 и КМ2.

	^{16}O			$\gamma^{18}\text{O}_3$			$\gamma^{18}\text{O}_4$		
	Экс	КМ1	КМ2	Экс	КМ1	КМ2	Экс	КМ1	КМ2
$\text{O}_{\alpha\beta}\text{-P}_{\beta}\text{-O}_{\beta\gamma}$	878	873	894	877	866 (-6)	891 (-3)	870	862 (-11)	875 (-19)
		[182]	[489]	(-3)	[157]	[413]	(-10)	[125]	[364]
$\text{O}_{\alpha\beta}\text{-P}_{\beta}\text{-O}_{\beta\gamma}$	895	926	940	894	915 (-9)	933 (-7)	885	902 (-24)	919 (-21)
		[138]	[146]	(-1)	[86]	[159]	(-10)	[212]	[216]
$\gamma+\beta$ фосфат	956	980	1017	947	959 (-21)	976 (-41)	943	944 (-36)	970 (-47)
		[33]	[76]	(-8)	[76]	[65]	(-13)	[110]	[53]
$\gamma+\beta$ фосфат	1143	1166	1182	1120	1144 (-22)	1142 (-40)	1120	1123 (-23)	1142 (-40)
		[157]	[117]	(-23)	[14]	[141]	(-23)	[305]	[130]
β -фосфат	1215	1218	1229	1215	1218 (0)	1230 (+1)	1215	1217 (+1)	1230 (+1)
		[271]	[355]	(0)	[131]	[496]	(0)	[130]	[495]
α -фосфат	1260	1279	1288	1260	1280 (+1)	1288(0)	1260	1280 (0)	1288 (0)
		[470]	[351]	(0)	[461]	[340]	(0)	[460]	[339]

Для интермедиатов реакции, соответствующих комплексам $\text{Ras}\cdot\text{GAP}\cdot\text{GDP}\cdot\text{P}_i$, наблюдаются две характеристические полосы 1207 см^{-1} и 1112 см^{-1} , соответствующие колебаниям связей P-O неорганического фосфата в

активном центре фермента [126]. На рис. 3.22 представлены колебательные частоты, полученные для интермедиатов, имеющих в своей структуре Pi, а именно I2, I3, I4 и EP.

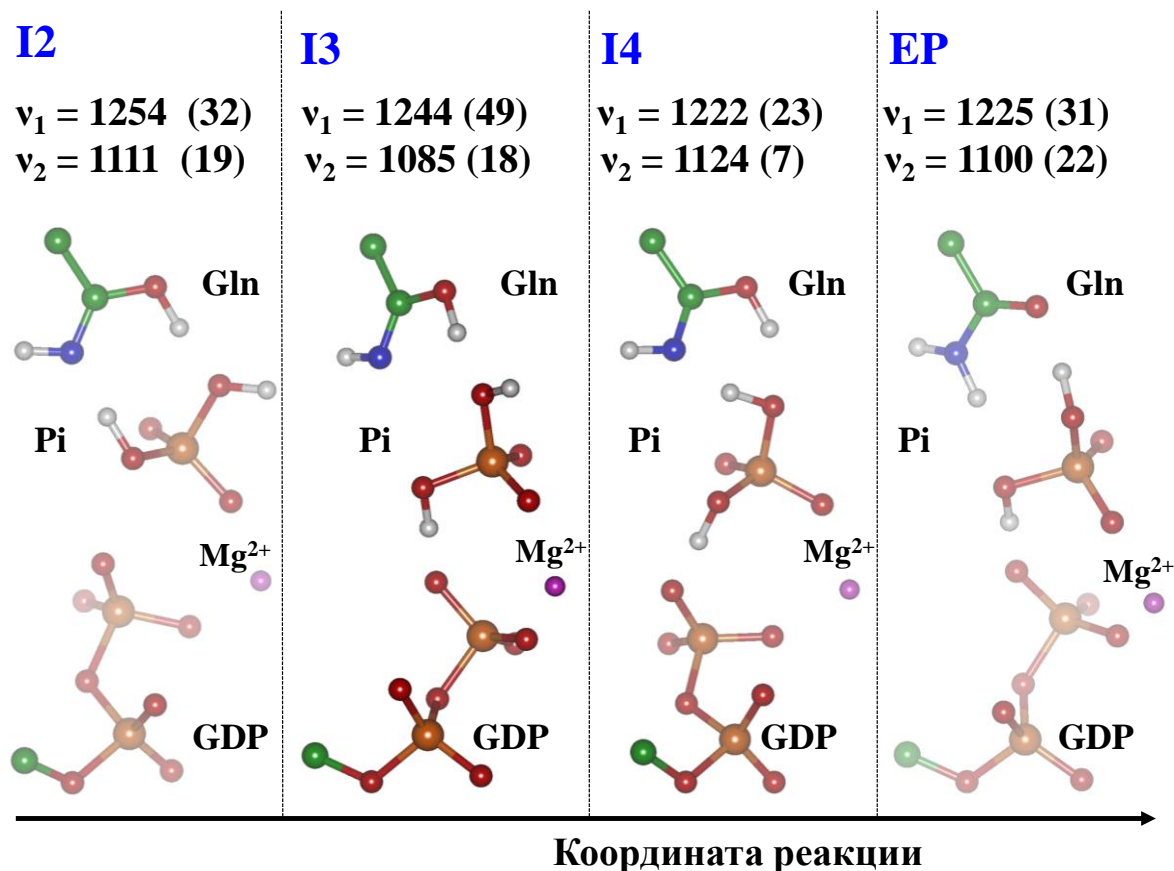


Рис. 3.22. Рассчитанные значения колебательных частот для интермедиатов реакции (в см⁻¹), в скобках показаны значения изотопных сдвигов при замене ¹⁶O-¹⁸O. Соответствующие им экспериментальные частоты [124,126]: $\nu_1=1207$ (32) см⁻¹ и $\nu_2=1112$ (20) см⁻¹.

Все представленные на рис. 3.22 интермедиаты обладают довольно похожими характеристиками в области колебаний P-O связей, однако наилучшим образом эксперименту соответствует комплекс EP. Для экспериментальных колебательных мод характерна кинетика нарастания интенсивности с константой скорости 0.77 ± 0.24 с⁻¹ при T=260 К, что, как уже было показано ранее, соответствует кинетике накопления продукта при данной температуре (рассчитанная константа скорости составляет 0.16 с⁻¹). Также, согласно рассчитанному профилю реакции, интермедиаты I2, I3, I4 достаточно высокоэнергетичны, а значит их концентрации малы в ходе реакции, и вряд ли могут наблюдаться соответствующие им колебательные полосы экспериментально.

Дополнительно проведено соотнесение полученного в результате расчетов профиля реакции комплекса фермент-продукты с предложенным в работе [127] интермедиатом со структурой Ras·GAP·GDP·Pi (рис. 3.23). Расстояние P_{β} - P_{γ} в КМ/ММ расчетах составляет 4.04 Å, а расстояние, полученное из КМ/ММ динамики в работе [127], 4.0 ± 0.1 Å. Колебательные частоты, полученные в данной работе, составляют $\nu_1 = 1225$ (31) cm^{-1} и $\nu_2 = 1100$ (22) cm^{-1} , тогда как в работе [127] им соответствуют значения $\nu_1 = 1202$ (31) cm^{-1} и $\nu_2 = 1093$ (18) cm^{-1} .

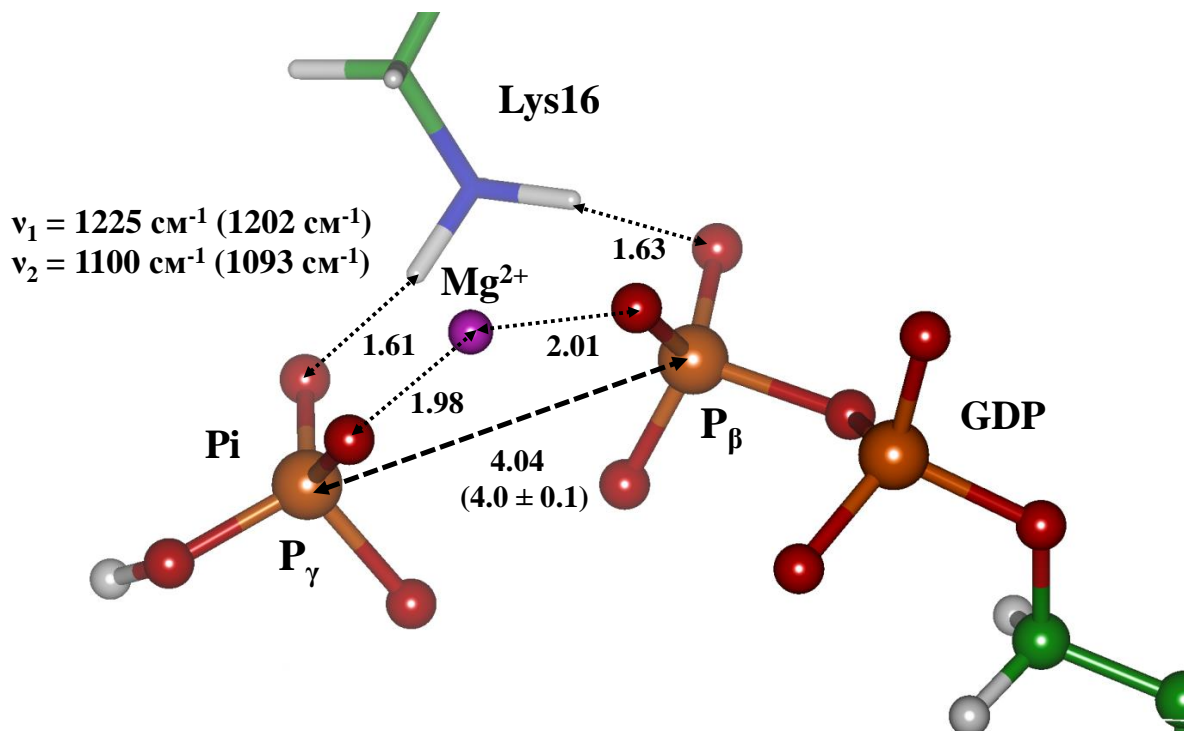


Рис. 3.23. Сравнение структуры комплекса фермент-продукты, полученного в данной работе, с интермедиатом, описанным в [127]. Значения в скобках соответствуют полученным в работе [127].

Для дополнительной верификации полученного механизма стоит проводить эксперименты по ИК-спектроскопии в другом диапазоне частот. На рис. 3.24 показаны характеристические колебания для интермедиатов I2, I3, I4 и комплекса EP. Они затрагивают колебания O-H связей неорганического фосфата, для которых в процессе реакции меняются партнеры по водородным связям. Также, в интермедиатах I2 и I3 интенсивными являются колебания O-H связей в таутомерном глутамине.

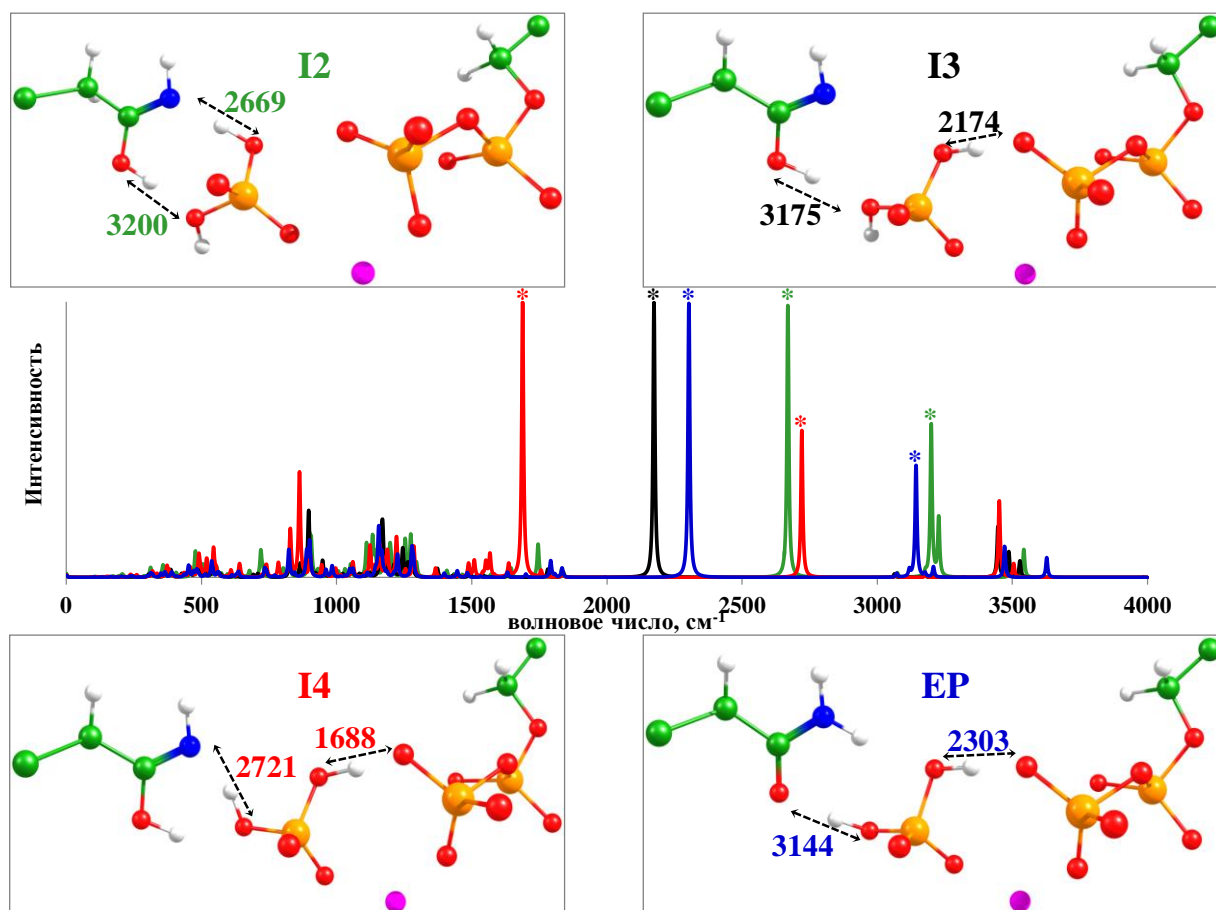


Рис. 3.24. Рассчитанные колебательные спектры интермедиатов I2 (зеленым), I3 (черным), I4 (красным) и EP (синим). Формы колебательных мод, визуализированные во вставках, выделены звездочками. Числа во вставках соответствуют волновым числам в см^{-1} .

Таким образом, в данном разделе проанализированы колебательные спектры фермент-субстратного комплекса и комплексов интермедиатов реакции и проведено сопоставление с экспериментальными данными по низкотемпературной ИК-спектроскопии с временным разрешением. Показано, что все интермедиаты, соответствующие комплексам с неорганическим фосфатом имеют похожие значения колебательных частот в области колебаний P-O связей. Анализ полученных в расчёте колебательных частот совместно с представленной для данной реакции кинетической схемой позволяет утверждать, что наблюдаемые частоты соответствуют структуре EP. Также предложен набор колебательных частот, позволяющий более точно определить структуру интермедиата, основываясь на данных колебательной спектроскопии в области колебаний O-H связей неорганического фосфата.

3.2. Гидролиз ГТФ в белковом комплексе Arl3-RP2

3.2.1. Механизм гидролиза ГТФ в белковом комплексе Arl3-RP2

Ферментативный комплекс Arl3-RP2 состоит из малой ГТФазы Arl3 и белка ускорителя RP2 и изучен гораздо меньше по сравнению с комплексом Ras-GAP, которому был посвящен раздел 3.1. При значительном сходстве этих двух белковых комплексов и сходной функции, анализ кристаллических структур Arl3(Q71L)-GppNHp-RP2 (PDB ID: 3BH6), Arl3-GDP·AlF₄-RP2 (PDB ID: 3BH7) [98] с Ras-GDP·AlF₃-GAP (PDB ID: 1WQ1 [112]) показывает различную ориентацию аргининового пальца белка ускорителя относительно ГТФ и одинаковую ориентацию каталитического глутамина (Gln61 в Ras и Gln71 в Arl3). Такие отличия сохраняются в равновесных геометрических конфигурациях фермент-субстратных комплексов (рис. 3.25) [129].

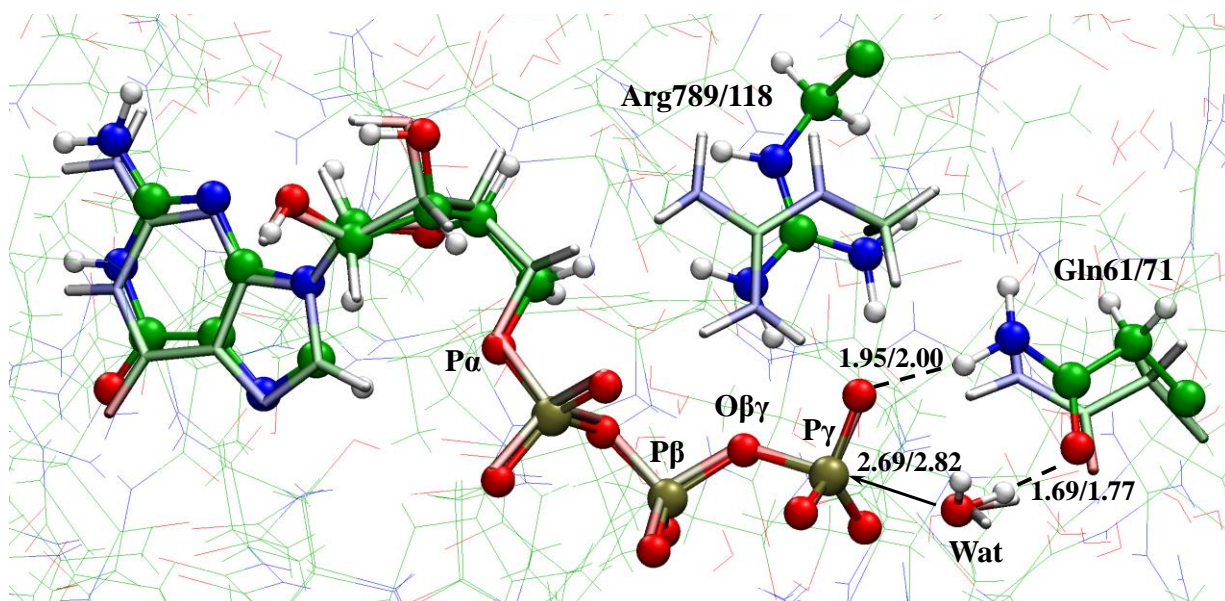


Рис. 3.25. Наложение равновесных геометрических конфигураций фермент-субстратных комплексов Arl3-RP2 (шаро-стержневая модель) и Ras-GAP (стержневая модель). Расстояния перед косой чертой соответствуют Arl3-RP2, после – Ras-GAP.

Окружение аргининового пальца более подробно показано на рис. 3.26. В случае Arl3-RP2 остаток Gln116^{RP2} занимает большое пространство в области α-фосфатной группы, смещая боковую цепь аргинина в сторону γ-фосфатной группы, в то время как в Ras-GAP место глутамина занимает подвижная молекула воды, что и приводит к смещению аргинина в сторону α-фосфатной группы.

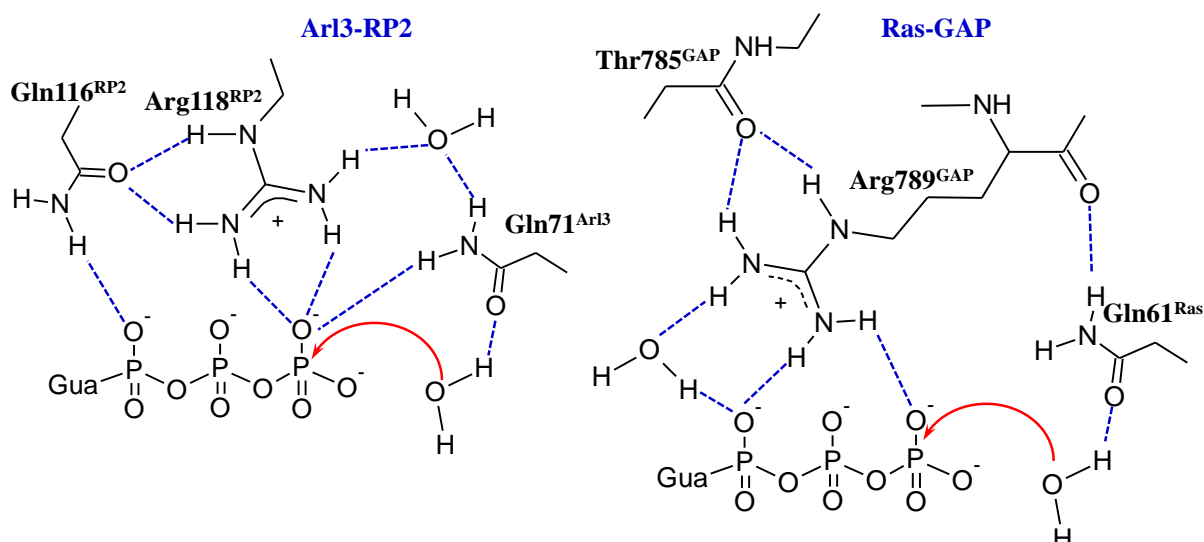


Рис. 3.26. Сетки водородных связей вокруг аргининового пальца в фермент-субстратных комплексах Arl3-RP2 (слева) и Ras-GAP (справа).

Поскольку аминокислотный остаток аргинина является значимым для протекания реакции, то его смещение может привести к изменениям в кинетике процесса. Согласно экспериментальным данным скорость реакции гидролиза белковым комплексом Arl3-RP2 составляет 1.2 с^{-1} , что приблизительно на порядок меньше скорости реакции в Ras-GAP [98].

КМ/ММ расчеты, аналогичные по протоколу расчета с выполненными в разделе 3.1, показали, что изменение структуры фермент-субстратного комплекса приводит к появлению дополнительного интермедиата реакции и, в целом, изменению относительных энергий стационарных точек (рис. 3.27).

Аналогично реакции гидролиза в Ras-GAP, полученный механизм реакции можно разделить на два фрагмента. К первому относится процесс образования неорганического фосфата и таутомерного глутамина из комплекса ES $\text{GTP} \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot \text{Gln} \rightarrow \text{GDP} \cdot \text{Pi} \cdot \text{Gln}^*$ ($\text{ES} \rightarrow \text{TS1} \rightarrow \text{I1}$, $\text{I1} \rightarrow \text{TS2} \rightarrow \text{I2}$, $\text{I2} \rightarrow \text{TS3} \rightarrow \text{I3}$); на этой стадии появляется дополнительный интермедиат по сравнению с Ras-GAP и значительно отличаются относительные энергии минимумов на ППЭ (рис. 3.28). Вторая часть относится к регенерации фермента и обладает большим сходством с реакцией в Ras-GAP (рис. 3.29).

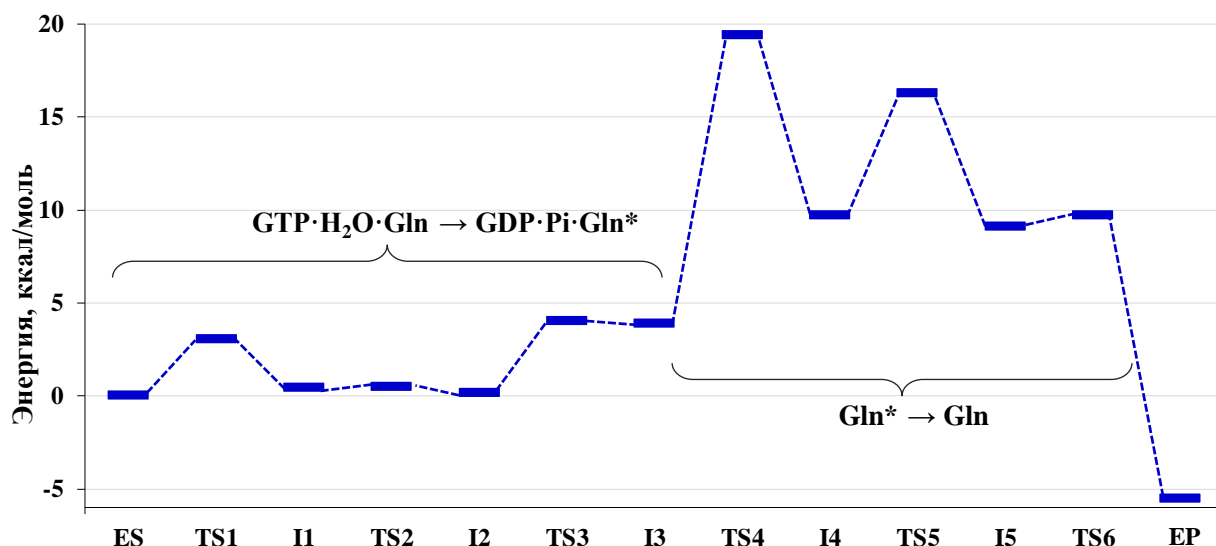


Рис. 3.27. Рассчитанный энергетический профиль реакции гидролиза ГТФ в белковом комплексе Arl3-RP2.

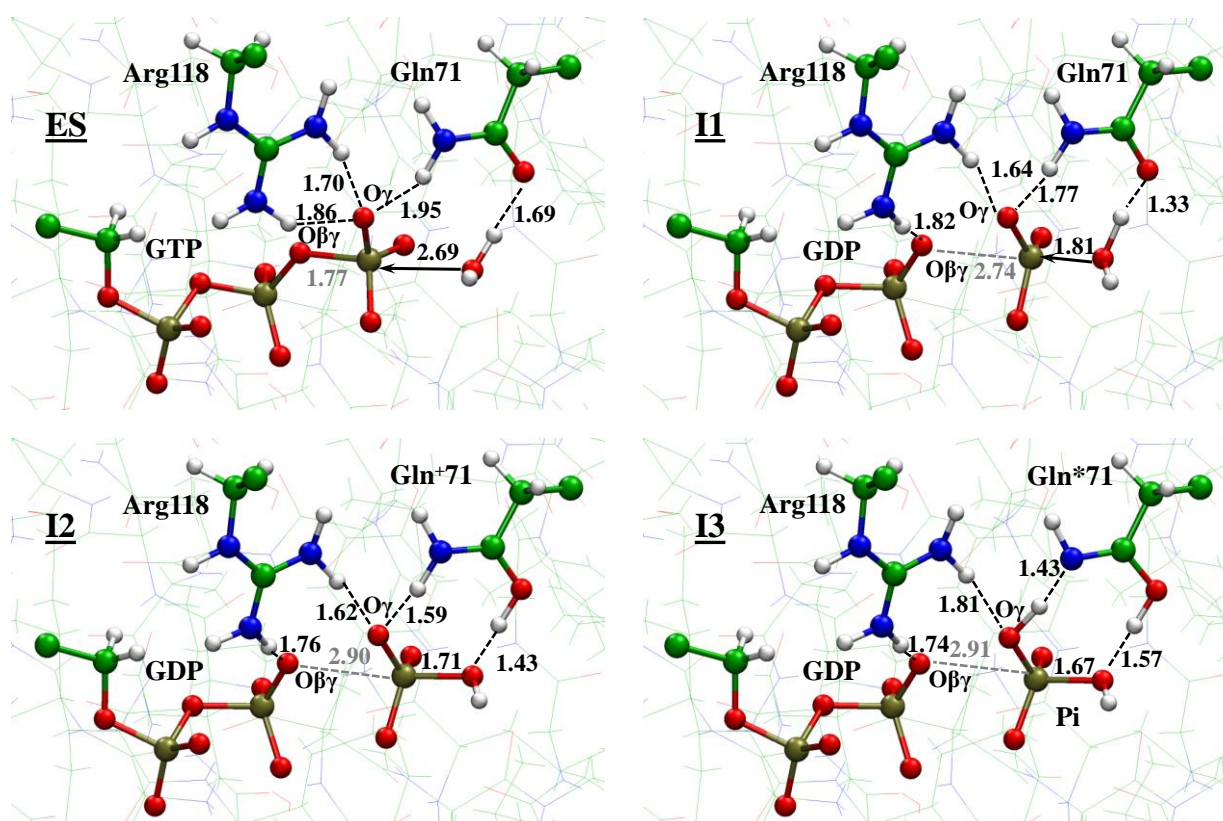


Рис. 3.28. Равновесные геометрические конфигурации интермедиатов на участке процесса $GTP \cdot H_2O \cdot Gln \rightarrow GDP \cdot Pi \cdot Gln^*$ реакции гидролиза ГТФ в белковом комплексе Arl3-RP2.

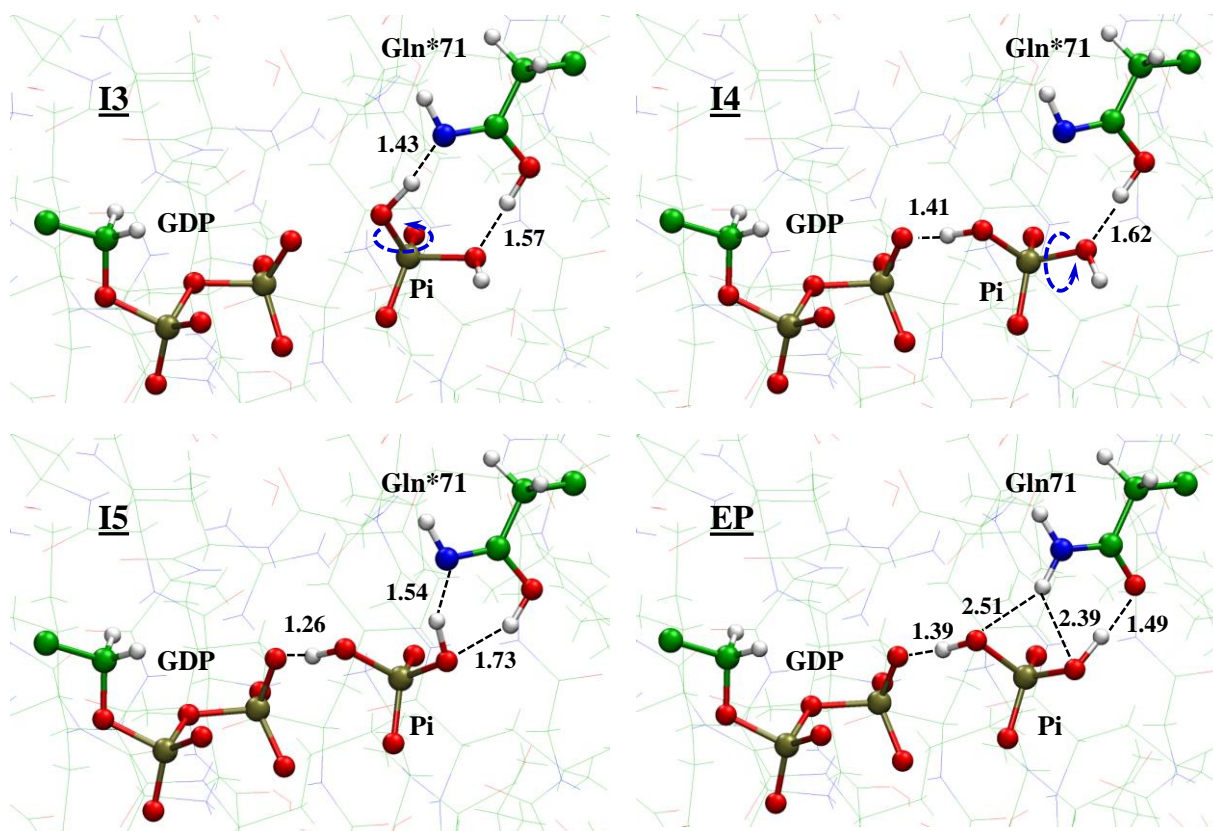


Рис. 3.29. Равновесные геометрические конфигурации интермедиатов в процессе регенерации фермента в реакции гидролиза ГТФ в белковом комплексе Arl3-RP2.

Как видно из рис. 3.28, структура первого интермедиата аналогична таковой в Ras-GAP: происходит разрыв P γ -O связи, сопровождающийся образованием метафосфата, при этом каталитическая молекула воды подходит ближе к атому фосфора. В отличие от дестабилизированного по сравнению с ES интермедиата I1 в Ras-GAP, энергия I1 превышает ES меньше, чем на 1 ккал/моль.

На второй стадии реакции образуется неорганический фосфат в форме HPO_4^{2-} и протонированная форма амидной группы Gln71; такой интермедиат не наблюдается в Ras-GAP. Известно, что в суперкислых средах атом кислорода амидов может быть протонирован с pK_a около -1, что, в целом, говорит о возможности наблюдать его в активном центре фермента. Наличие такого интермедиата в Arl3-RP2 и его отсутствие в Ras-GAP связано с отличиями в локальном окружении каталитического глутамина и наличием более сильных водородных связей в Arl3-RP2, способных стабилизировать положительный заряд.

На третьей стадии происходит перенос протона с протонированного глутамина на неорганический фосфат и образование привычных H_2PO_4^- и имидной формы глутамина.

Чтобы удостовериться в наличии необычного интермедиата I2 были проведены дополнительные расчеты методом КМ/ММ динамики в области I1-I3. КМ подсистема описывалась методом функционала электронной плотности в варианте PBE-D3/GPW-DZVP.

На левой части рис. 3.30 показано, насколько часто различные интермедиаты наблюдаются вдоль траектории. Наиболее заселенным является интермедиат I2 (ему соответствует больше всего точек в распределении). Чуть реже наблюдается интермедиат I1 и совсем редко – I3. Заселенность состояний согласуется с относительными энергиями, полученными на ППЭ для данных интермедиатов. Из распределений длин связей вдоль траектории (рис. 3.30, справа) видно, что протон между атомами кислорода фосфата и глутамина переходит часто, так как перекрытие соответствующих кривых распределения значительное. В случае движения протона между атомом кислорода фосфата и азотом глутамина перекрытия практически не наблюдается, распределения достаточно узкие с одним максимумом, соответствующим ковалентной связи N-H на глутамине (протон в основном находится на глутамине). Таким образом, динамическая картина находится в согласии со статическими данными ППЭ.

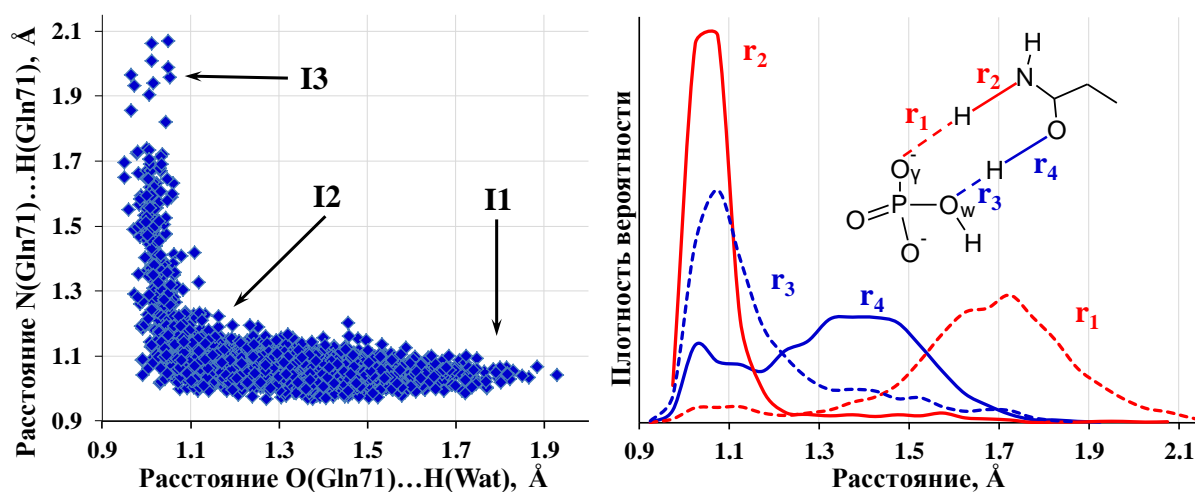
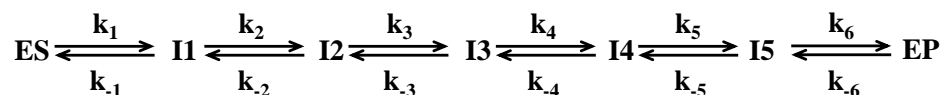


Рис. 3.30. Распределение расстояний вдоль КМ/ММ МД траектории на участке реакции $I1 \rightarrow I2 \rightarrow I3$.

Чтобы рассчитать эффективное значение константы скорости была записана кинетическая схема из шести обратимых стадий, в соответствии с полученным ППЭ (рис. 3.27):



Константы скоростей элементарных стадий k_{+n} and k_{-n} ($n=1-6$), были рассчитаны по теории активированного комплекса при температуре 298 К. Далее проведено численное решение системы дифференциальных уравнений в программе KINET [116] с начальными условиями, в которых только концентрация ES была отлична от нуля. Полученные кинетические кривые представлены на рис. 3.31. Константа скорости реакции составляет 0.015 с^{-1} , что в 100 раз меньше экспериментального значения 1.2 с^{-1} [98].

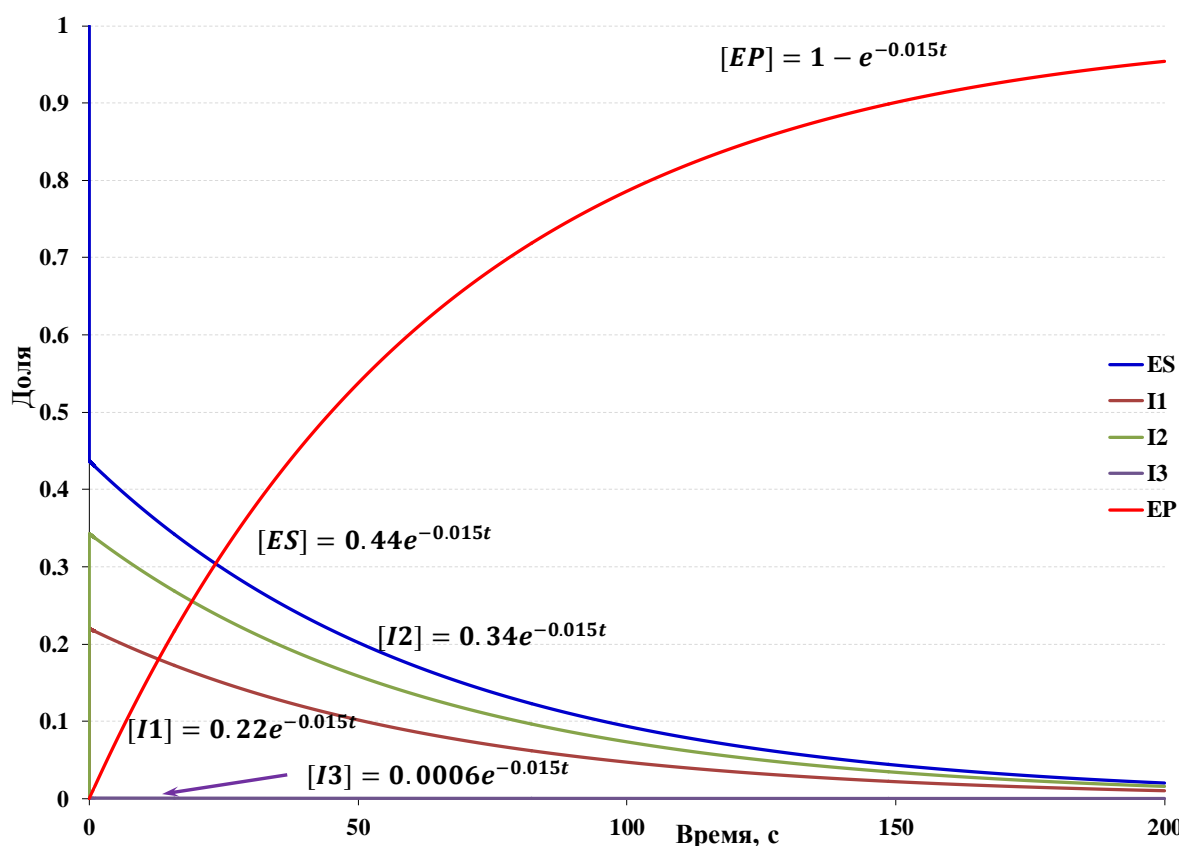


Рис. 3.31. Кинетические кривые, соответствующие реакции гидролиза ГТФ в белковом комплексе Arl3-RP2.

Анализ рассчитанных кинетических кривых предполагает наличие квазиравновесия для ES, I1, I2 и I3. Концентрации I4 и I5 крайне малы и для них применимо квазистационарное приближение. Выражение для скорости образования EP выглядит как :

$$\frac{d[EP]}{dt} = k_6 \cdot [I5] - k_{-6} \cdot [EP]$$

Условия квазиравновесия для ES и I3, а также квазистационарности для I4 и I5:

$$\frac{d[I4]}{dt} = k_4 \cdot [I3] - (k_5 + k_{-4}) \cdot [I4] + k_{-5} \cdot [I5] \approx k_4 \cdot [I3] - k_5 \cdot [I4] + k_{-5} \cdot [I5] \approx 0$$

$$\frac{d[I5]}{dt} = k_5 \cdot [I4] - (k_6 + k_{-5}) \cdot [I5] + k_{-6} \cdot [EP] \approx 0$$

$$\frac{[I3]}{[ES]} = K_3$$

Итоговое выражение для скорости образования EP примет вид:

$$\frac{d[EP]}{dt} = K_3 \cdot k_4 \cdot [ES]$$

$$k_{eff} = K_3 \cdot k_4$$

В таком случае эффективная константа скорости составит 0.035 с^{-1} , что сходно со значением, полученным при численном решении.

3.2.2. Колебательные спектры с временным разрешением

В отличие от ферментативного комплекса Ras-GAP, в котором первые интермедиаты имеют относительную энергию значительно выше реагентов и, следовательно, их концентрации малы в ходе реакции, в комплексе Arl3-RP2 интермедиаты I1 и I2 имеют сравнимую энергию с ES. Из кинетических кривых (рис. 3.31) видно, что в каждый момент времени $[ES]:[I1]:[I2]=1.8:1.4:1$, то есть отношение концентраций меньше 2, а значит, рассматриваемые интермедиаты имеют сопоставимые по интенсивности колебательные спектры.

На рис. 3.32 показаны колебательные спектры для ES, I1, I2, а также разностные колебательные спектры. Из последних видно, что есть колебательные моды, характерные для каждого конкретного интермедиата; формы соответствующих колебаний показаны в верхней части рисунка.

Таким образом, при проведении экспериментов по колебательной спектроскопии возможно обнаружение интермедиатов I1 и I2, что уже наконец-то поставит точку в изучении механизма реакции гидролиза ГТФ в комплексах малых ГТФаз с белками ускорителями.

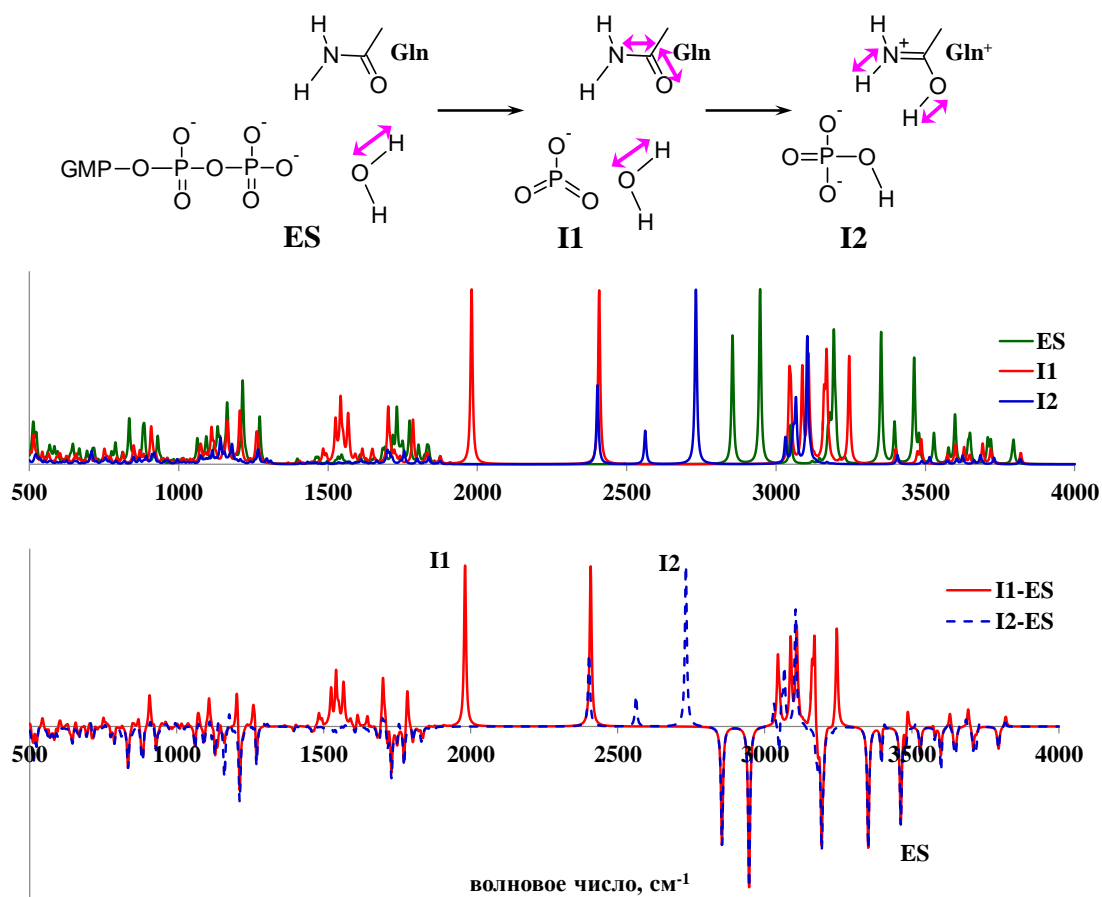


Рис. 3.32. Рассчитанные колебательные спектры (сверху) и разностные колебательные спектры (снизу). В верхней части рисунка показаны характеристические моды (выделены на разностных спектрах), относящиеся к колебаниям каталитической молекулы воды (ES) и функциональной группы Gln71 (I1, I2).

3.3. Результаты главы 3

- Реакция гидролиза ГТФ в активном центре ферментативного комплекса Ras-GAP проходит с образованием имидной формы Gln61; стадия регенерации глутамина характеризуется большим энергетическим барьером.
- Полный анализ полученной кинетической схемы реакции гидролиза ГТФ в Ras-GAP позволяет получить эффективное значение константы скорости 15 с^{-1} , что согласуется с экспериментальным значением 19 с^{-1} .
- Уменьшение скорости реакции в комплексах Ras-GAP с точечными мутациями G12V и G13V связано с нарушением цепочки водородных связей между каталитической молекулой воды, амидной группой глутамина и γ -фосфатной группой.

- В белковом комплексе Arl3-RP2 реакция проходит аналогичным образом с Ras-GAP, однако незначительные отличия в структуре активного центра приводят к появлению дополнительного интермедиата, в котором каталитический глутамин находится в протонированной форме.
- Наличие заселённых интермедиатов реакции гидролиза ГТФ белковым комплексом Arl3-RP2 позволяет дополнительно верифицировать предложенный механизм реакции методами ИК-спектроскопии с временным разрешением.

Глава 4. Флавин-содержащие рецепторы: фотоцикл и новые флуоресцентные белки

Флавины – обобщенное название органических соединений, содержащих изоаллоксазиновое кольцо в своем строении (рис. 4.1). Они играют важную роль во многих процессах в живом организме: могут находиться как в свободном состоянии в клетке, так и быть связанными с различными белками. За счет своих окислительно-восстановительных (Red-Ox) свойств они в паре с никотинамидадениндинуклеотидом поддерживают постоянство Red-Ox потенциала в клетке. В ферментативных реакциях флавин также принимает участие в качестве кофермента из-за своих окислительно-восстановительных свойств. Флавин, являясь сопряженной органической системой, поглощает свет в видимой области и способен к флуоресценции. Эта группа свойств обеспечивает его нахождение в качестве кофактора в фоторецепторных белках.

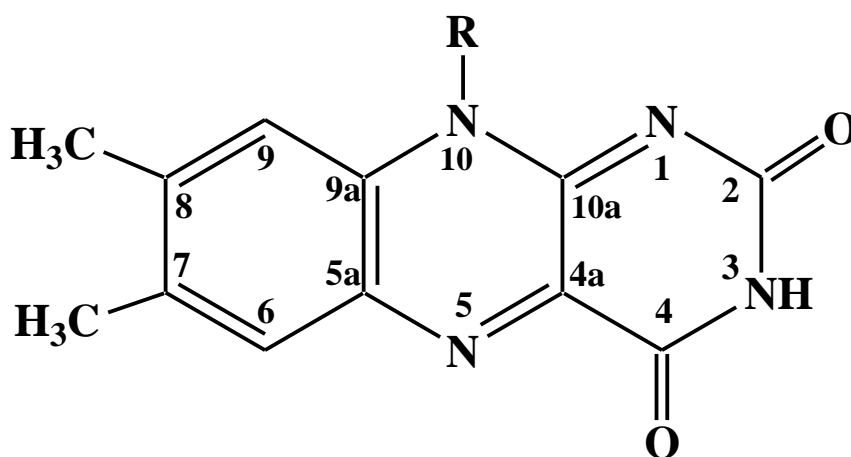


Рис. 4.1. Изоаллоксазиновое кольцо флавина и нумерация атомов.

В данной главе рассматриваются фоторецепторные флавин-содержащие белки, относящиеся к семействам BLUF и LOV, в частности, его флуоресцирующий вариант iLOV. По результатам изученных механизмов фотореакций предложена точечная мутация для изменения фотофизических свойств белка iLOV.

4.1. Фотохимические превращения в BLUF доменах

4.1.1. Литературные данные

BLUF (blue light using flavin) – фоторецепторный домен с хромофорной группой флавином (далее в тексте FAD) или его производными, чувствительный к синему свету. Впервые он был обнаружен в пурпурной бактерии *Rhodobacter sphaeroides*, где выполнял регуляторную функцию при экспрессии генов [130]. Позднее эти домены были обнаружены в других белках, где также выполняли регуляторную функцию.

BLUF домены относятся к семейству фоторецепторных белков, функционирование которых обусловлено незначительными изменениями в области хромофорного кармана в результате фотореакции, то есть при переходе из рецепторного в сигнальное состояние. Такие особенности функционирования белка обуславливают незначительные изменения ряда измеряемых в эксперименте физико-химических параметров и делают сложными их интерпретацию. В результате фотореакции максимум полосы поглощения в УФ-видимой области смещается в область больших длин волн на 10-15 нм [131]. Такие незначительные изменения, скорее всего, могут быть обусловлены реорганизацией сети водородных связей, однако до сих пор нет единого мнения о структуре рецепторного и сигнального состояний, а также о механизме фотореакции [130,132–147].

Одним из наиболее изученных представителей семейства является BLUF домен белка AppA (или коротко AppA), для него характерны сходные с остальными представителями свойства и наибольшее время восстановления рецепторного состояния. Максимум полосы поглощения смещается от 443 нм (2.80 эВ) в рецепторном состоянии до 456 нм (2.72 эВ) в сигнальном, то есть на ~ 15 нм (0.08 эВ) [135]. Также в результате фотореакции изменяется положение полосы в колебательном спектре, соответствующей валентному колебанию C4=O группы флавина на 20-23 см⁻¹ [135,148]. Такие незначительные изменения в электронных и колебательных спектрах указывают на реорганизацию сети водородных связей вблизи хромофора в результате реакции, однако не дают точного описания структуры хромофорного кармана в рецепторном и сигнальном состояниях.

Данные, полученные из PCA, противоречивы и не дают однозначной интерпретации спектральных данных [138,149]. На рис. 4.2 показан фрагмент хромофорного кармана AppA BLUF и обозначены спорные области. Так как существующие данные PCA по BLUF доменам имеют разрешение порядка 2 Å, невозможно различить атом кислорода от атома азота, а также не видны атомы водорода, поэтому невозможно определить какая из изомерных (амидная и имидная) и поворотных форм функциональной группы Gln63 реализуется в структуре (рис. 4.3). Также, в двух представленных кристаллических структурах различается положение аминокислотных остатков Trp104 и Met106: в структуре PDB ID: 2IYG боковая цепь Met106 обращена внутрь хромофорного кармана (Met_{in}) [149], а Trp104 находится на поверхности белка. В структуре PDB ID: 1YRX – наоборот, боковая цепь Trp104 обращена внутрь хромофорного кармана (Trp_{in}), а Met106 – на поверхность белка [138]. Объединение этих данных с результатами ЯМР спектроскопии также не приводит к однозначной интерпретации, лишь позволяет установить, что в структуре рецепторного состояния присутствует пик, соответствующий амидной форме Gln63, в то время как в сигнальном состоянии этот пик отсутствует; также по данным ЯМР формирование сигнального состояния приводит к образованию сильной водородной связи между C4=O группой флавина и функциональной группой Gln63 [139]. Положение и таутомерную форму глутамина достаточно сложно определить даже исходя из данных колебательной спектроскопии. Несмотря на принципиальную возможность определения конформации на основании характеристических колебательных мод, сильное перекрытие с колебаниями флавина не позволяет прийти к окончательным выводам. Идея таутомеризации была предложена в работе [150] на основании полученных колебательных спектров, однако приведенные в работе доводы только косвенно указывали на такую возможность. Альтернативный механизм, предложенный на основании экспериментальных данных, связан с возможными вращениями боковой цепи глутамина.

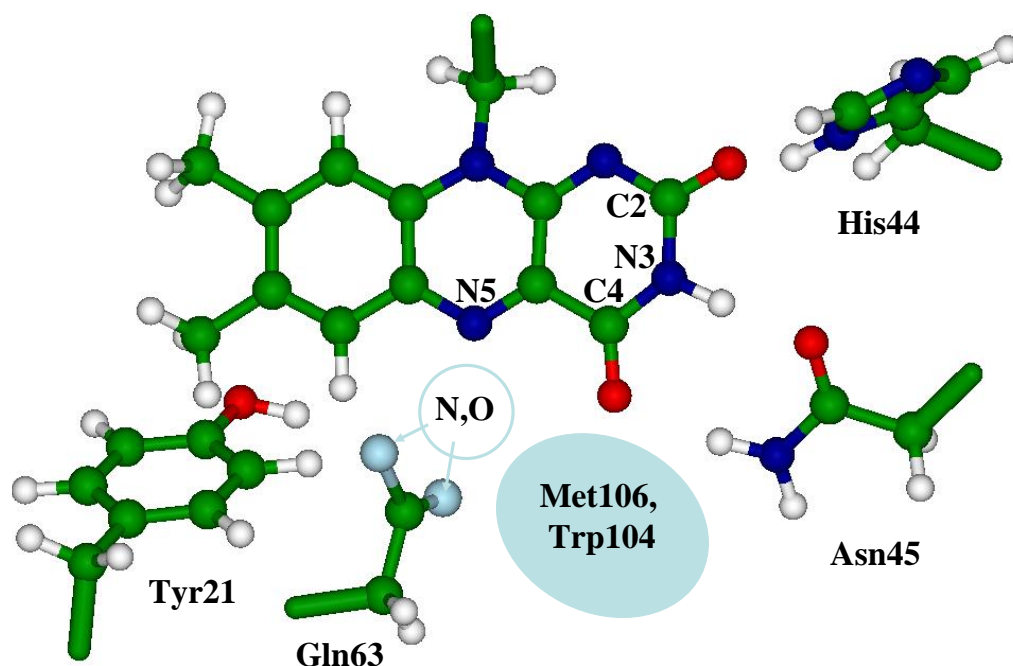


Рис. 4.2. Фрагмент хромофорного кармана BLUF домена белка AppA. Функциональная группа Gln63, а также положения Met106 и Trp104 показаны схематично.

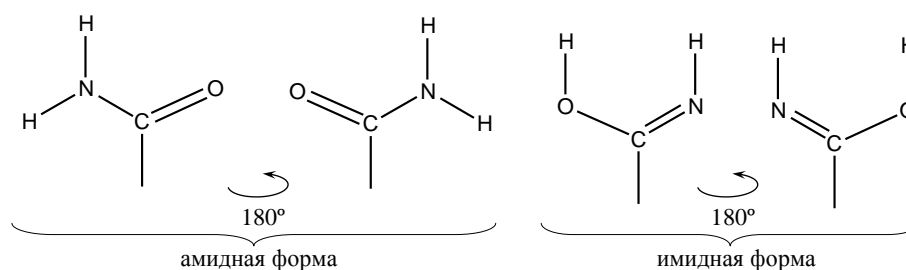


Рис. 4.3. Возможные формы функциональной группы Gln63.

Механизм реакции изучался на основании данных электронных, колебательных и ЭПР спектров. Динамика возбужденного состояния несколько отличается у разных представителей семейства: время жизни возбужденного состояния составляет от нескольких пикосекунд до наносекунд, при этом для всех характерен многоэкспоненциальный распад. Это связывают с наличием микрогетерогенностей, в частности, с разной ориентацией тирозина (Tyr21 в AppA) и флавина [146,151–157]. Для двух белков SyPixD и PapV обнаружены интермедиаты процесса, характеризующиеся образованием нейтрального полухинона флавина и тирозин-радикала [151,158,159]. Направленный мутагенез по аминокислотному остатку глутамина приводит к увеличению времени жизни первичной радикальной пары, что говорит о важности глутамина для переноса протона с тирозина на флаavin [160].

Вопросы, связанные с возвращением в рецепторное состояние, изучены гораздо меньше. Известно, что время восстановления рецепторной формы сильно меняется в зависимости от конкретного представителя BLUF от 2 с для VlrB до 1000 с для AppA [131]. Кинетика распада была измерена для VlrB при pH 8 и различных температурах (13.9°C, 20.6°C и 26.4°C) и полученная опытная энергия активации такого процесса составила 12.4 ккал/моль [131]. Также было показано, что при замене тирозина на его монофторированный аналог происходит замедление реакции, что говорит об участии тирозина в процессе [155]. Авторы связывают это с понижением pK_a тирозина на 1, то есть повышением кислотности, до величины порядка 8.4.

Теоретические работы по изучению BLUF доменов можно разделить на две группы – те, в которых изучается механизм реакции и свойства структур, соответствующих доступным рентгеноструктурным данным. В теоретической работе [143] было проведено отнесение двух кристаллических структур AppA, показано, что структура Met_{in} относится к рецепторному состоянию, а Trp_{in} – к сигнальному. При этом в рецепторном состоянии глутамин находится в амидной форме, а в сигнальном – в имидной с повернутой функциональной группой [143].

В работах по молекулярной динамике изучалась стабильность водородных связей, однако результаты сравнивать достаточно сложно так как они сильно различаются между собой. Возможно, это связано с отличиями в протоколах расчета. Так, видны заметные различия при расчетах МД с полноатомным силовым полем, или тем, в котором некоторые группы атомов заменены на объединенные атомы [137,161,162]. Также множество исследований посвящено изучению электронных спектров рецепторного и сигнального состояния, причем проводились как статические расчеты для одной структуры, так и для набора кадров, полученных из МД расчетов с КМ/ММ потенциалами [137,162–165].

Изучению механизма реакции посвящено гораздо меньше работ. Общим является то, что авторы считают, что Trp_{in} соответствует сигнальному состоянию, а Met_{in} – рецепторному [141,166,167]. В работе [167] проведено моделирование процесса фотовозбуждения флавина и эволюции системы по возбужденным электронным состояниям. Последней стационарной точкой, найденной в это работе, является первый минимум на поверхности основного электронного

состояния, имеющий электронную структуру синглетного бирадикала: один неспаренный электрон локализован на молекуле флавина, а другой на тирозине (рис. 4.4).

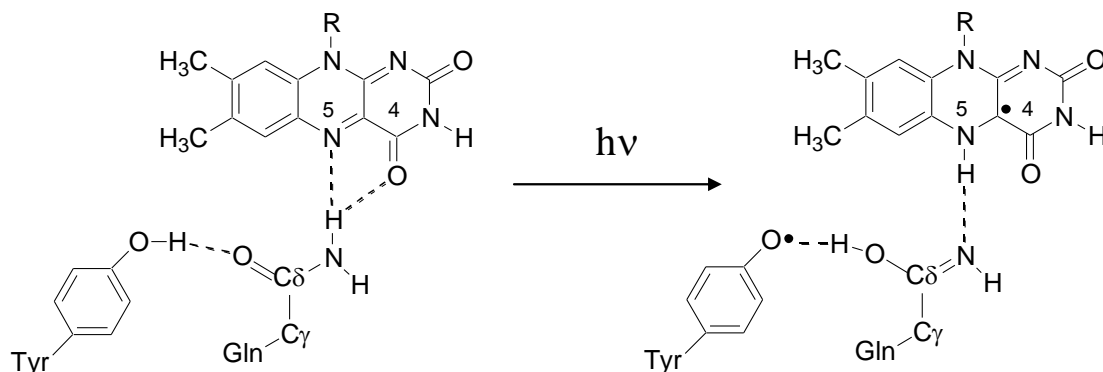


Рис. 4.4. Переход из рецепторного состояния в синглетное бирадикальное состояние в результате фотовозбуждения.

4.1.2. Рецепторное и сигнальное состояния в фотоцикле ArrA

На предварительном этапе был проведен расчет методом классической молекулярной динамики с использованием имеющихся кристаллических структур в качестве начального приближения. Белок помещался в прямоугольный параллелепипед, состоящий из молекул воды размером $61 \times 61 \times 66 \text{ \AA}^3$ и $62 \times 65 \times 74 \text{ \AA}^3$ для моделей, основанных на кристаллических структурах PDB ID: 2IYG [149] и 1YRX [138], соответственно; полученная система нейтрализовалась добавлением ионов натрия. Молекулярно-динамический расчет проводился в каноническом ансамбле (NVT) при температуре 300 К с термостатированием методом ланжевеновской динамики, с длиной траектории 10 нс и шагом интегрирования 1 фс. Целью такого расчета было выявление различных возможных конформаций активного сайта. Далее, для выбранных структур проводилась оптимизация геометрических параметров методом КМ/ММ в варианте электронного внедрения. Белковая матрица описывалась с помощью силового поля Amber; квантовая часть описывалась методом DFT с гибридным функционалом B3LYP и базисом cc-pvdz и состояла из флавина, боковых цепей аминокислотных остатков Tyr21, His44, Asn45, Gln63 и Trp104 или Met106 для сигнального и рецепторного состояний соответственно. На рисунках 4.5 и 4.6 показаны равновесные геометрические

параметры квантовой подсистемы моделей рецепторного и сигнального состояний [168].

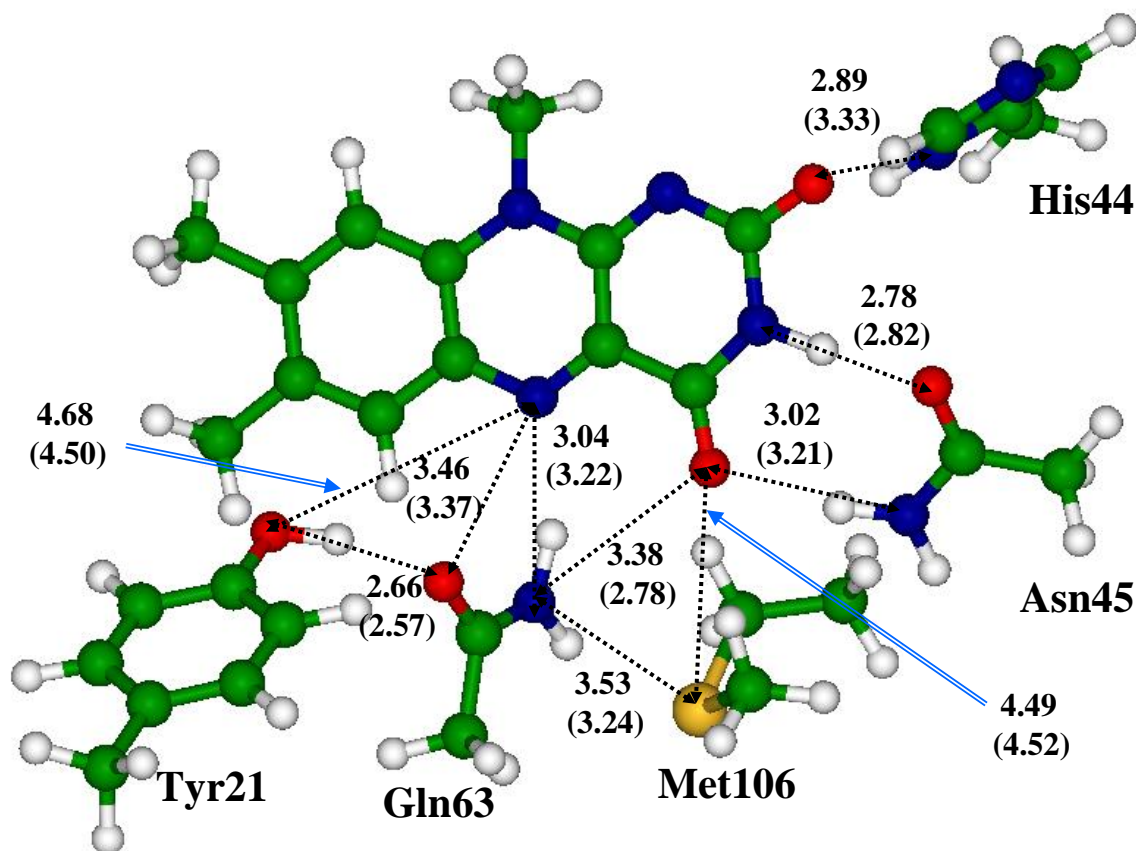


Рис. 4.5. Равновесные геометрические параметры рецепторного состояния BLUF домена белка ArrA. Здесь и далее расстояния указаны в ангстремах. В скобках приведены расстояния, взятые из кристаллической структуры PDB ID: 2IYG [149]. Здесь и далее в главе 4 расстояния приведены в Å.

Полученные структуры сравнивались с ранее предложенными моделями [141], полученными для BLUF домен белка BlrB. Отличием в механизмах является поворот боковой цепи глутамина в данной работе и его отсутствие в работе [141]. Обе структуры достаточно похожи, однако существенно различается расстояние между кислородом тирозина и атомом N5 флавина: в данной работе получено значение 4.68 Å, что хорошо согласуется с данными PCA (4.50 и 4.78 Å), тогда как в модели, предложенной в работе [141] это расстояние составляет 5.09 Å (рис. 4.7).

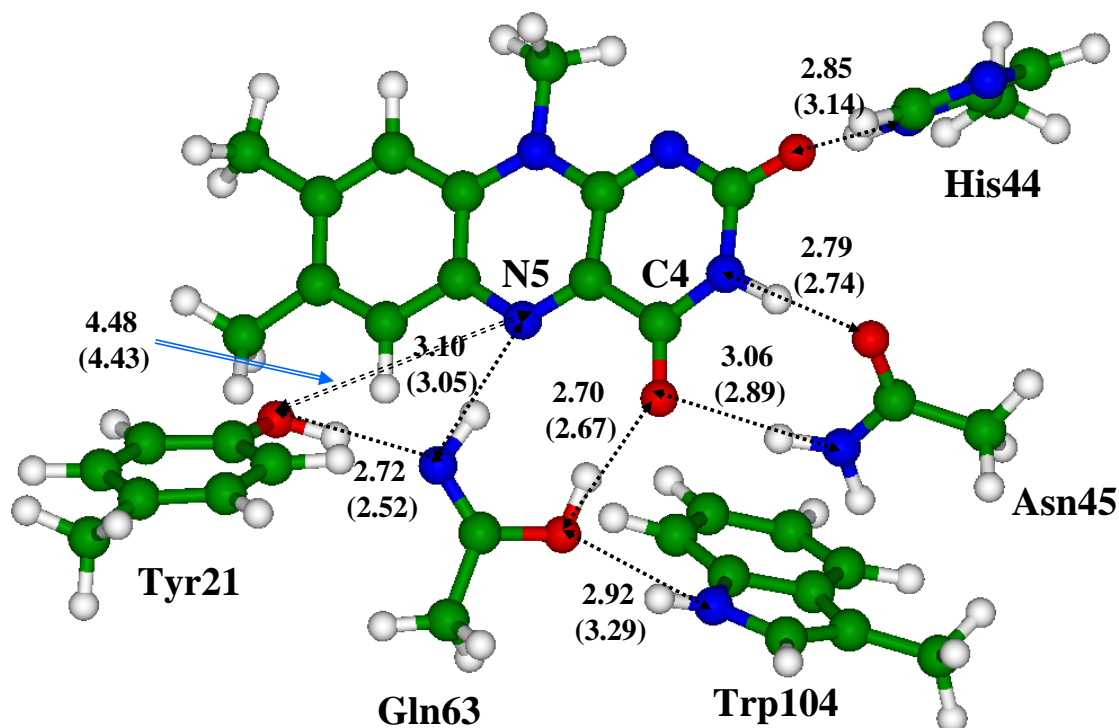


Рис. 4.6. Равновесные геометрические параметры сигнального состояния BLUF домена белка AppA. В скобках приведены расстояния, взятые из кристаллической структуры PDB ID: 1YRX [138].

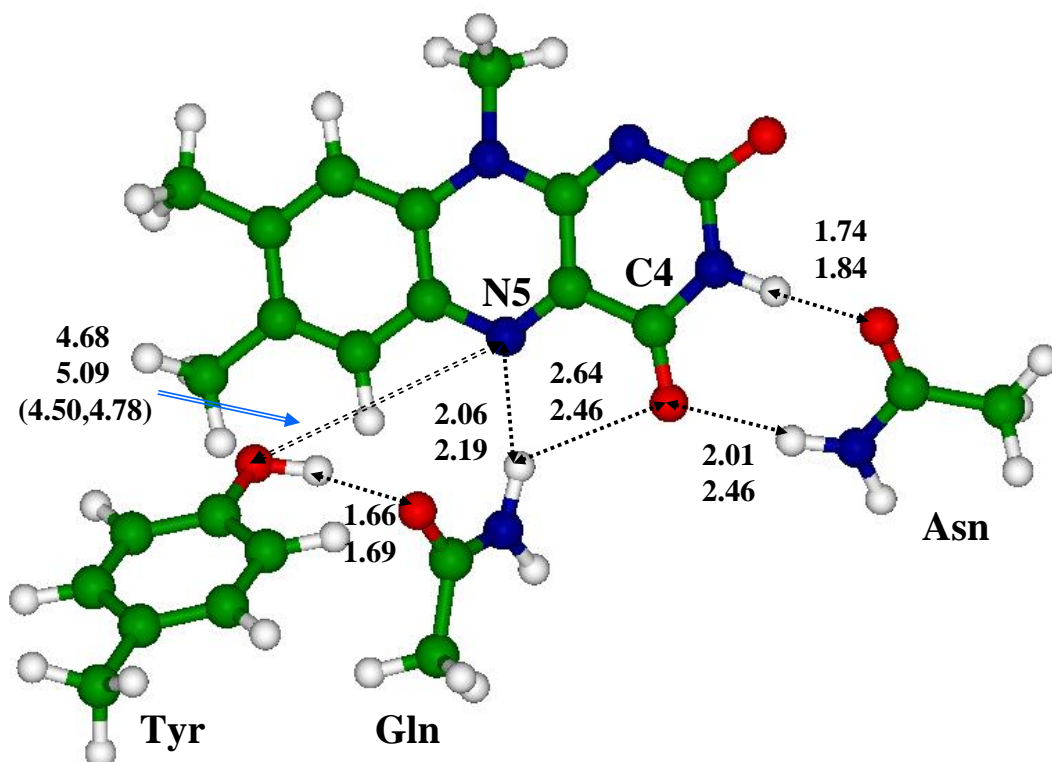


Рис. 4.7. Сравнение равновесных геометрических параметров рецепторного состояния BLUF домена, полученного в данной работе (верхнее значение) и работе [141] (нижнее значение). В скобках приведены расстояния, взятые из кристаллических структур PDB ID: 2IYG (AppA) [149] и 2BYC (BlrB) [136].

На рис. 4.8 проводится сравнение моделей сигнального состояния. Основное отличие заключается в том, что в данной работе азот глутамина образует водородную связь с атомом N5 флавина, а кислород глутамина с кислородом флавина. В модели, представленной в работе [141], функциональная группа ориентирована иначе, и кислород глутамина образует водородную связь с атомом N5 флавина, а азот глутамина с кислородом флавина (рис. 4.8).

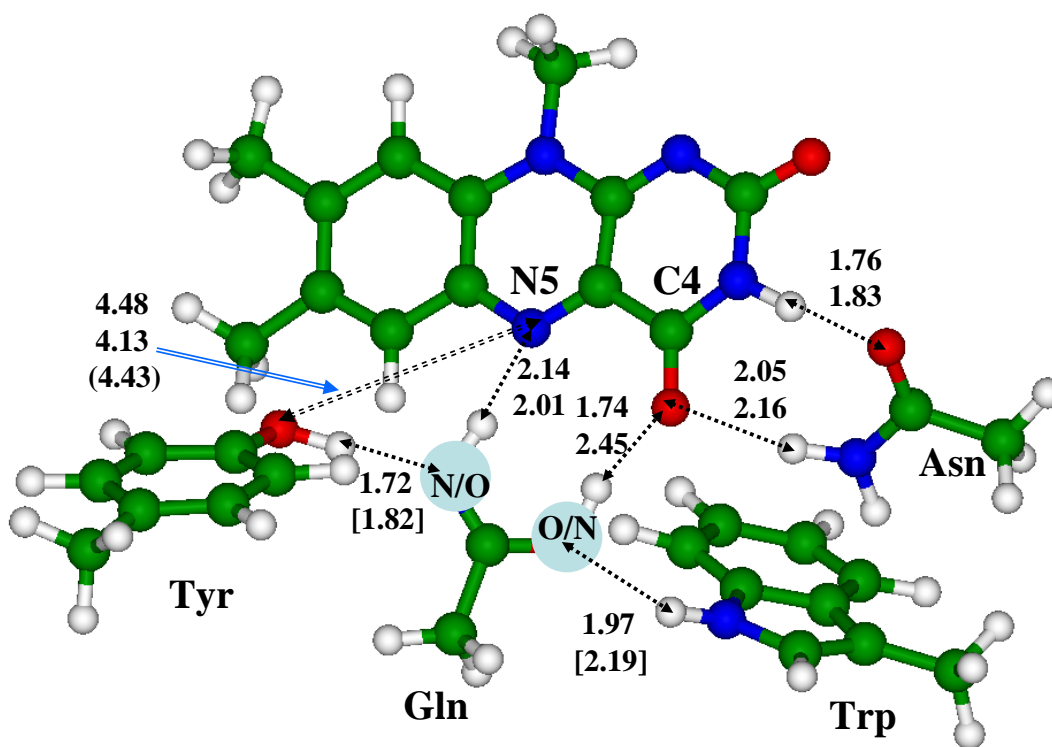


Рис. 4.8. Сравнение равновесных геометрических параметров сигнального состояния BLUF домена, полученного в данной работе (верхнее значение) и работе [141] (нижнее значение). В круглых скобках приведены расстояния, взятые из кристаллической структуры PDB ID: 1YRX [138].

Аналогично рецепторному состоянию, в модели из работы [141] расстояние между тирозином и флавином сильно отличается от полученного в данной работе и по данным PCA. Другим важным критерием является образованная водородная связь с кислородом O4 флавина. Так как при переходе из рецепторного состояния геометрия хромофора не меняется, то изменения в спектре поглощения могут произойти за счет образования новых водородных связей; причем сдвиг в 10-15 нм свидетельствует об образовании сильной водородной связи. В то же время в работе [141] длина водородной связи (между атомом водорода функциональной группы Gln и O4 флавина) составляет 2.45 Å. Такое расстояние едва ли можно

охарактеризовать как водородную связь, и такие взаимодействия не могут отвечать за столь значительный сдвиг в положении максимума полосы поглощения. В данной работе это расстояние составляет 1.74 Å, что по означенным выше причинам является более разумным.

Для КМ частей полученных структур были рассчитаны энергии вертикальных электронных переходов в рамках метода SOS-CIS(D). Полученные значения близки к наблюдаемым в спектроскопии в видимой области и хорошо описывают спектральный сдвиг. Для рецепторного состояния получено значение 429 нм (2.92 эВ); для сигнального – 443 нм (2.80 эВ); в эксперименте наблюдаются максимумы полос поглощения для рецепторного состояния – 443 нм (2.80 эВ), для сигнального – 456 нм (2.72 эВ). Таким образом, рассчитанный сдвиг полосы в 14 нм хорошо согласуется с экспериментальным значением в 13 нм [131].

Для структур сигнального и рецепторного состояний проводился расчет колебательных спектров. Для характеристической моды колебания C4=O связи были получены значения 1700 см⁻¹ и 1675 см⁻¹ для рецепторного и сигнального состояний соответственно; что хорошо согласуется с экспериментальными значениями 1709 см⁻¹ и 1685 см⁻¹ для этих состояний. Так как рассчитанный колебательный спектр дает систематическое завышение результатов, то масштабирующий множитель был выбран, исходя из наилучшего соответствия рассчитанных и наблюдаемых колебательных частот рецепторного состояния и составил 0.97. Для рецепторного состояния также было проведено изотопное замещение с целью сравнения с экспериментальными данными колебательных спектров изотопомеченных соединений. В таблице 4.1 представлены колебательные частоты, полученные в эксперименте и в данной работе для рецепторного состояния BLUF домена, а также для BLUF домена с изотопами ¹³C, ¹⁵N и дейтерированным флавином в позиции N3-D.

На основании соотнесения данных УФ-видимой и ИК спектроскопии и рассчитанных энергий вертикальных S₀–S₁ переходов, а также колебательных спектров было показано, что рецепторному состоянию отвечает структура Trp_{out}/Met_{in}, а сигнальному Trp_{in}/Met_{out}.

Таблица 4.1. Наблюдаемые [148] и рассчитанные величины колебательных частот и изотопные сдвиги. В скобках указаны изотопные сдвиги для изотопомеченных систем N3-D, ¹⁵N и ¹³C соответственно.

Экспериментальные значения, см ⁻¹	Рассчитанные значения, см ⁻¹
1706 (-4, -2, -38)	1700 (-4, -5, -31)
1628 (+2, -1, -55)	1639 (-1,-2,-58)
1581 (0, -7, -47)	1581 (0,-7,-47)
1547 (-1, -9, -45)	1546 (0,-9,-41)
1500 (0, -4, -50)	1496 (0,-5,-34)
~1452	1455 (0,-1,-1)
1405 (0, -5, -24~-34)	1399 (0,-4,-36)

В результате анализа МД траекторий, полученных для рецепторного и сигнального состояний BLUF домена было выявлено, что динамика активных сайтов заметно различается. В рецепторном состоянии Gln63 образует одну водородную связь с флавином, причем она может быть образована как с атомом N5, так и с кислородом карбонильной группы C4=O; в сигнальном состоянии положение Gln63 жестко фиксировано благодаря двум водородным связям с флавином (рис. 4.6). В рецепторном состоянии Gln63 образует водородную связь с атомом серы боковой цепи аминокислотного остатка Met106; так как сера является плохим акцептором водородной связи (находится в 3 периоде таблицы Д.И. Менделеева), то и образованная водородная связь непрочная, что приводит к высокой подвижности боковой цепи Met106. В сигнальном состоянии его положение занимает Trp104, N-H группа которого образует прочную связь с атомом кислорода функциональной группы Gln63 [169].

На рисунке 4.9 показаны величины двугранного угла C_β-C_γ-S-C_ε (χ) боковой цепи Met106 и расстояния между функциональной группой Gln63 и флавином (N_ε(Gln63) – O4(FAD), H_ε(Gln63) – O4(FAD), N_ε(Gln63) – N5(FAD), H_ε(Gln63) – N5(FAD)), наблюдаемые вдоль МД траектории для рецепторного состояния. Других корреляций между расстояниями от флавина до ближайших аминокислотных остатков (Tyr21, His44, and Asn45) и конформациями Met106

выявлено не было. Из рисунка 4.9 видно, что наибольшей популяции соответствует набор структур с двугранным углом χ около 60° , однако в ансамбле белковых молекул также есть меньшая популяция с большими значениями величины двугранного угла. Начиная с двух различных стартовых приближений, соответствующих большим и меньшим значениям двугранного угла, методом КМ/ММ были получены две равновесные геометрические конфигурации (рис. 4.10). Первая структура (верхняя часть рис. 4.10) была получена путем минимизации геометрических параметров структуры, в которой Met106 находился в конформации с углом $\chi < 85^\circ$, что сходно с ориентацией в кристаллической структуре PDB ID: 2IYG. Равновесное значение двугранного угла χ составило 54° , что хорошо согласуется с данными PCA ($61^\circ/62^\circ$, здесь и далее два значения соответствуют мономерам А и В). Атом серы боковой цепи образует водородную связь с Gln63 ($N_\epsilon(\text{Gln63}) - S(\text{Met106})$), составляющую 3.55 \AA в модельной системе, что несколько больше значений, полученных методом PCA ($3.2 \text{ \AA}/3.4 \text{ \AA}$) [149]. Ориентация Met106 влияет на положение Gln63, поэтому расстояние $N_\epsilon(\text{Gln63}) - N5(\text{FAD})$ (3.04 \AA) меньше расстояния ($N_\epsilon(\text{Gln63}) - O4(\text{FAD})$) (3.38 \AA), что находится в некотором несоответствии с данными PCA: в обоих мономерах расстояние $N_\epsilon(\text{Gln63}) - O4(\text{FAD})$ ($2.8 \text{ \AA}/2.9 \text{ \AA}$) меньше расстояния ($N_\epsilon(\text{Gln63}) - N5(\text{FAD})$) ($3.0 \text{ \AA}/3.2 \text{ \AA}$).

Вторая структура была получена минимизацией модели с двугранным углом в Met106 $\chi > 110^\circ$, ее равновесной геометрической конфигурации соответствует большее значение двугранного угла ($\chi = 114^\circ$), и большее расстояние $N_\epsilon(\text{Gln63}) - S(\text{Met106}) - 3.79 \text{ \AA}$ (нижняя часть рис. 4.10). Изменение конформации Met106 приводит к изменению ориентации Gln63, расстояние $N_\epsilon(\text{Gln63}) - O4(\text{FAD})$ (3.08 \AA) становится меньше расстояния ($N_\epsilon(\text{Gln63}) - N5(\text{FAD})$) (3.39 \AA). Таким образом, становится понятно, что изменения двугранного угла χ (и соответственно конформации боковой цепи Met106) приводит к изменению положения Gln63 относительно флавина. В таблице 4.2 объединены результаты, полученные методом КМ/ММ (рис. 4.10) и в результате анализа МД траекторий (рис. 4.9).

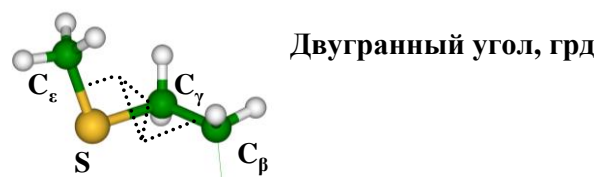
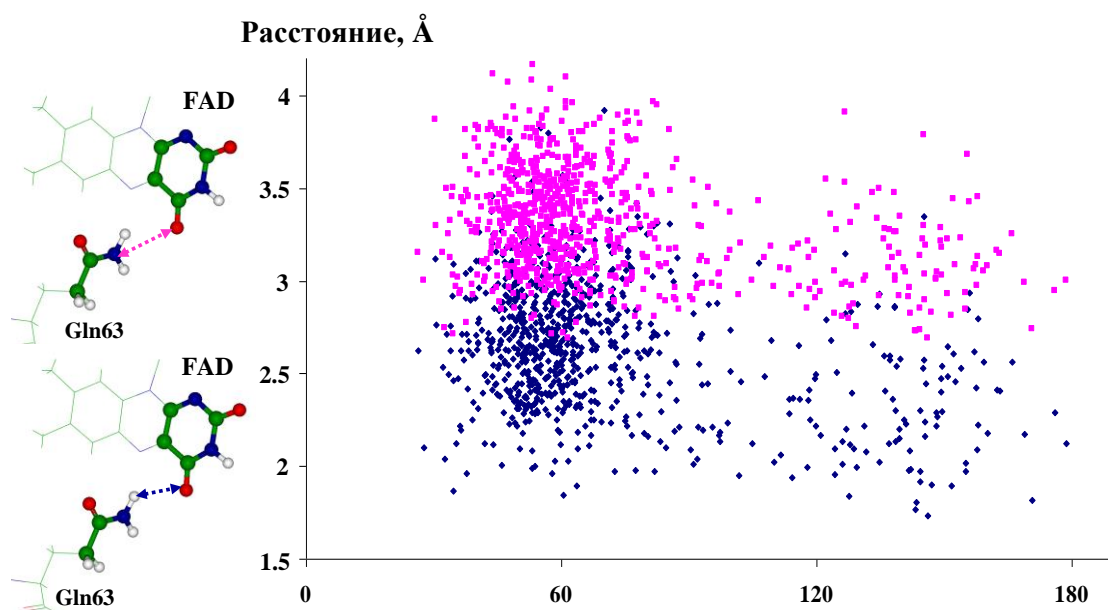
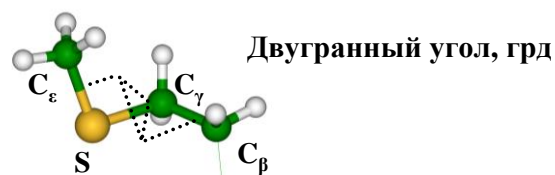
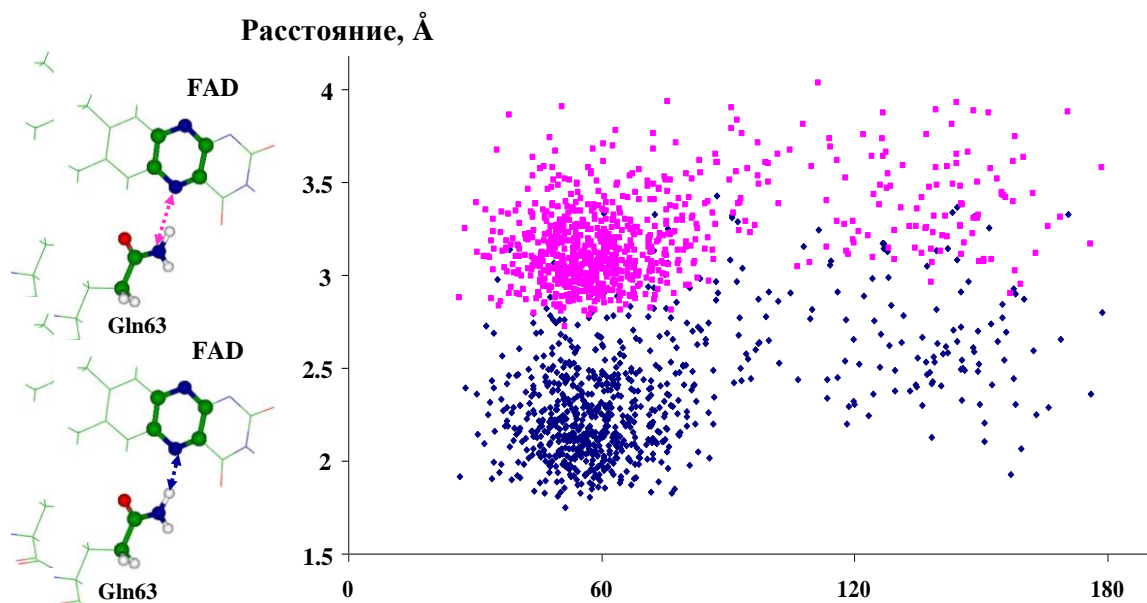


Рис. 4.9. Точками показаны параметры кадров вдоль МД траектории. На верхнем графике показаны зависимости расстояний $N_\epsilon(\text{Gln63}) - N5(\text{FAD})$ – розовым и $H_\epsilon(\text{Gln63}) - N5(\text{FAD})$ – синим, на нижнем показаны расстояния $N_\epsilon(\text{Gln63}) - O4(\text{FAD})$ – розовым и $H_\epsilon(\text{Gln63}) - O4(\text{FAD})$ – синим от двугранного угла $C_\beta - C_\gamma - S - C_\epsilon$ (χ) боковой цепи Met106.

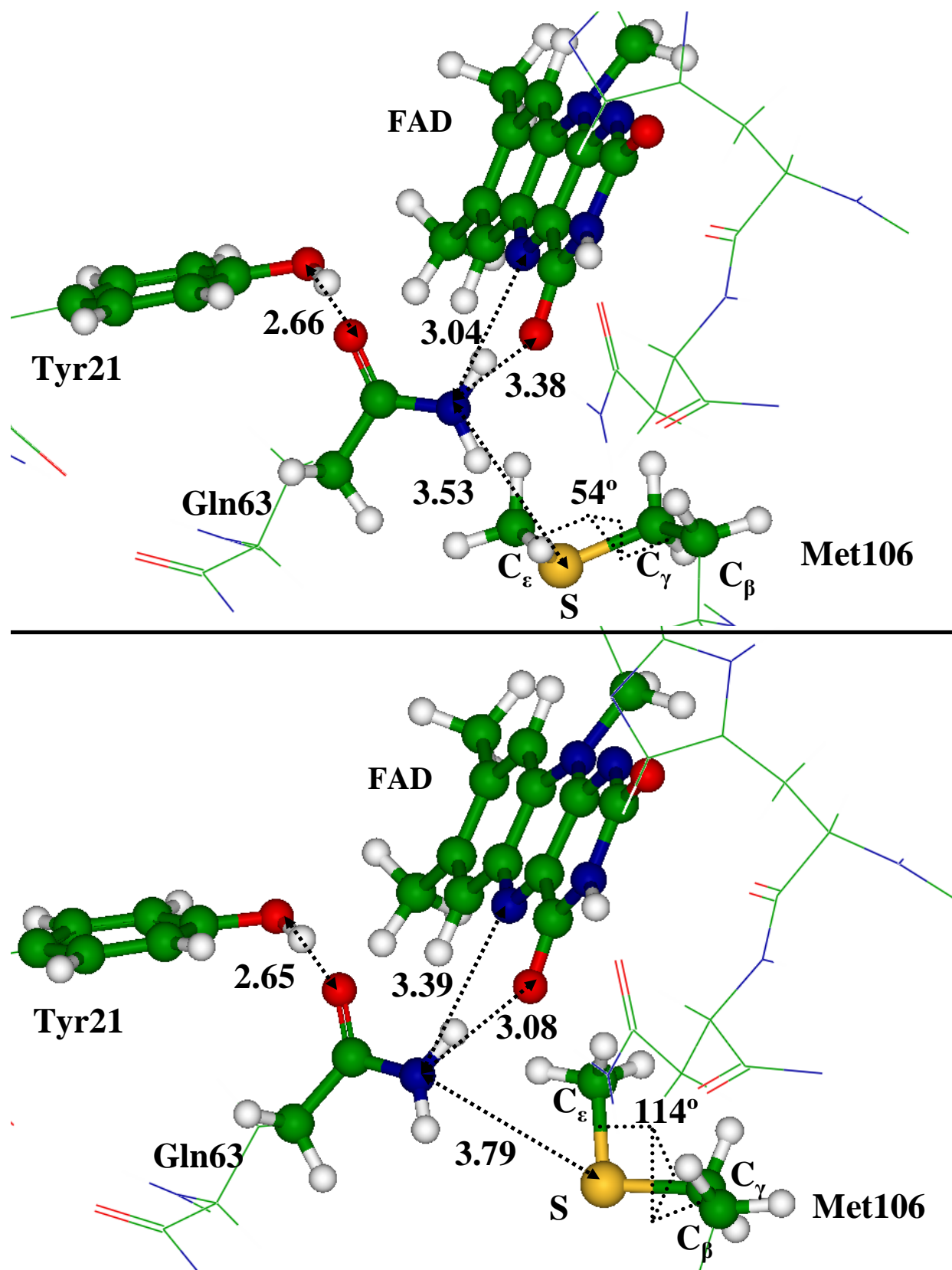


Рис. 4.10. Равновесные геометрические параметры рецепторного состояния BLUF домена белка AppA с боковой цепью Met106 в двух различных конформациях, полученные методом КМ/ММ.

Таблица 4.2. Расстояния между тирозином и флавином, полученные для систем с различными конформациями Met106, отличающимися значениями двугранного угла $C_{\beta}-C_{\gamma}-S-C_{\epsilon}$ (χ), полученные усреднением вдоль МД траектории и по расчетам равновесных геометрических конфигураций методом КМ/ММ, а также по данным РСА.

Конформация Met106	Расстояние $N_{\epsilon}(\text{Gln63})\dots N5$, Å		Расстояние $N_{\epsilon}(\text{Gln63})\dots O4$, Å	
	среднее по МД траектории	КМ/ММ	среднее по МД траектории	КМ/ММ
$\chi < 85^{\circ}$; есть водородная связь между Gln63 и Met106	3.14	3.03	3.36	3.32
$\chi > 110^{\circ}$; нет водородной связи между Gln63 и Met106	3.39	3.39	3.10	3.08
Конформация Met106	Кристаллическая структура 2IYG			
	Расстояние $N_{\epsilon}(\text{Gln63})\dots N5$, Å		Расстояние $N_{\epsilon}(\text{Gln63})\dots O4$, Å	
$\chi = 61^{\circ}$, мономер А; есть водородная связь между Gln63 и Met106	3.0		2.8	
$\chi = 62^{\circ}$, мономер В; есть водородная связь между Gln63 и Met106	3.2		2.9	

Для стационарных точек, соответствующих различным популяциям рецепторного состояния, наблюдается схожая величина энергии вертикального S_0-S_1 перехода 429 нм (2.92 эВ), что свидетельствует об отсутствии влияния конформации боковой цепи Met106 на оптический спектр; то есть полученные данные описывают особенности структурной динамики рецепторного состояния. Полученные в КМ/ММ расчетах структуры описывают минимумы на поверхности потенциальной энергии; структура, характеризующаяся $\chi = 54^{\circ}$, лежит на 8 ккал/моль ниже по энергии, чем структура с $\chi = 114^{\circ}$. Этот результат объясняет то, что в МД расчете наблюдается значительно большая популяция белков с небольшими значениями χ , чем с большими.

В рамках предполагаемого механизма на начальных стадиях фотореакции происходит процесс переноса протона и электрона с Tyr21 на флавин через Gln63 (рис. 4.4). Это также объясняет необходимость образовать более прочную водородную связь между Gln63 с атомом N5 флавина нежели с атомом O4, так как перенос протонов осуществляется вдоль водородных связей тем проще (с меньшим

энергетическим барьером), чем сильнее водородная связь. Так и в МД траектории наблюдается гораздо большее число конформаций с выгодным расположением Gln63 для переноса протона в случае фотореакции.

4.1.3. Механизм перехода в сигнальное состояние

Основываясь на совокупности литературных данных можно сделать однозначный вывод о том, что в ходе реакции образуется радикальная пара и эволюция на ППЭ основного состояния начинается со структуры, показанной на рис. 4.4 (правая структура). Переход из этой формы в сигнальное состояние может осуществляться по двум направлениям (рис. 4.11): конформационные изменения боковой цепи Gln63 в бирадикальном состоянии и последующая рекомбинация радикалов (путь А); рекомбинация радикалов с последующими конформационными изменениями, преимущественно с боковой цепью Gln63 (путь В) [170,171]. Для описания стадий, проходящих в бирадикальной форме, применялся неограниченный метод функционала электронной плотности (UDFT) с гибридным функционалом PBE0 и базисом cc-pvdz. Все стадии реакции описывались в молекулярном кластере, состоящем из флавина и боковых цепей аминокислотных остатков Asn45, Leu54, Gln63, Leu65, Ile79 и Met106. По результатам расчётов оказалось, что более предпочтительным является путь А, поэтому он будет рассмотрен более подробно.

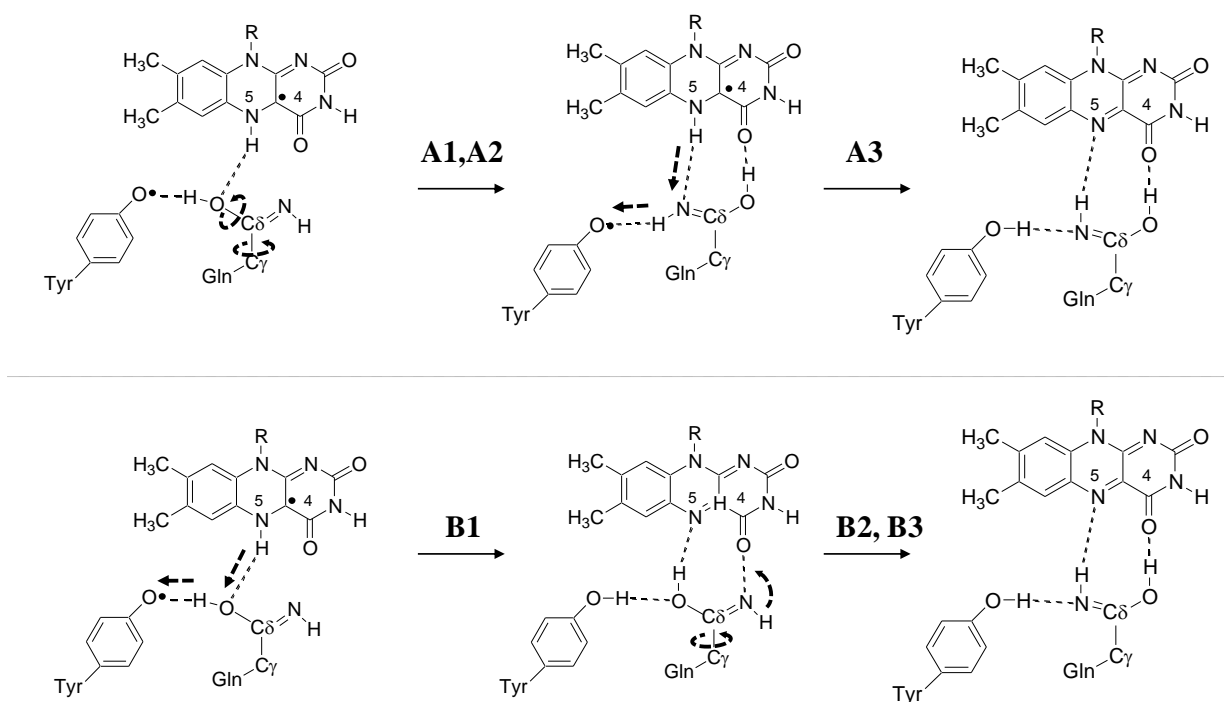


Рис. 4.11. Возможные пути протекания реакции: конформационные изменения боковой цепи Gln63 в бирадикальном состоянии и последующая рекомбинация радикалов (путь А, сверху); рекомбинация радикалов с последующими конформационными изменениями, преимущественно с боковой цепью Gln63 (путь В, снизу).

Путь А состоит из трех элементарных стадий: вращение вокруг одинарной связи C γ -C δ в Gln63 (A1); вращение OH группы вокруг одинарной связи C δ -O ϵ в Gln63 (A2); рекомбинация бирадикала, сопряженная с переносом протона с флавина на Tyr21 через Gln63 (A3).

На первых двух элементарных стадиях реакции система находится в синглетном бирадикальном состоянии, т.е. один неспаренный электрон локализован на молекуле флавина, а другой на Tyr21 (рис. 4.12).

Для описания стадии А1 было проведено сканирование сечения ППЭ вдоль координаты реакции, соответствующей двугранному углу C β -C γ -C δ -N ϵ Gln63. Так как вращение вокруг одинарной связи возможно в двух направлениях, то были найдены два переходных состояния А1-TS $_1$ и А1-TS $_2$ с барьерами 8.5 ккал/моль и 8.1 ккал/моль, соответственно (рис. 4.13).

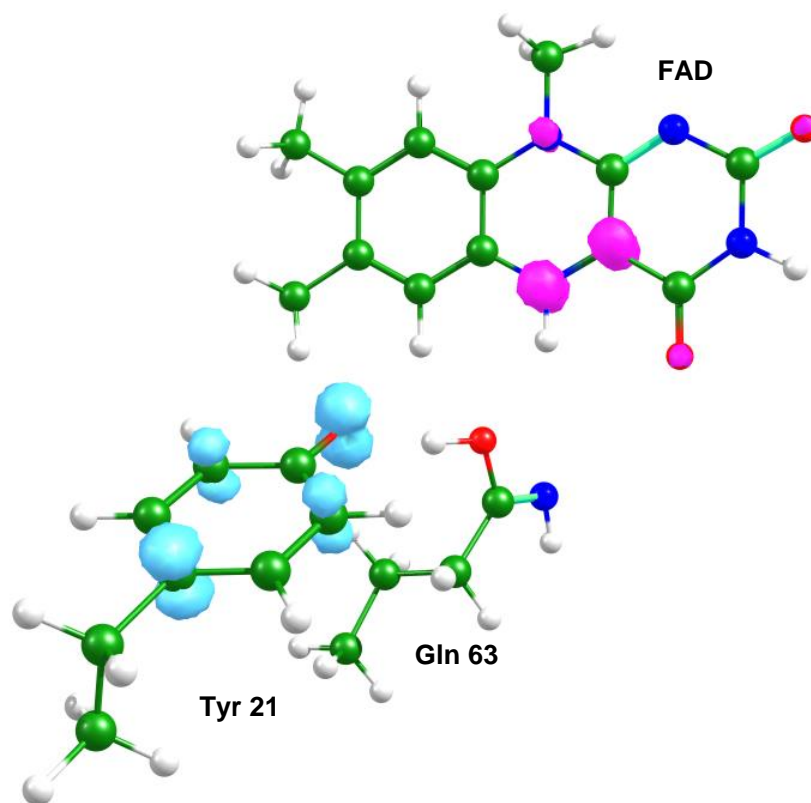


Рис. 4.12. Бирадикальная структура реагентов A-I₀. Голубым и розовым показана α и β спиновая плотность.

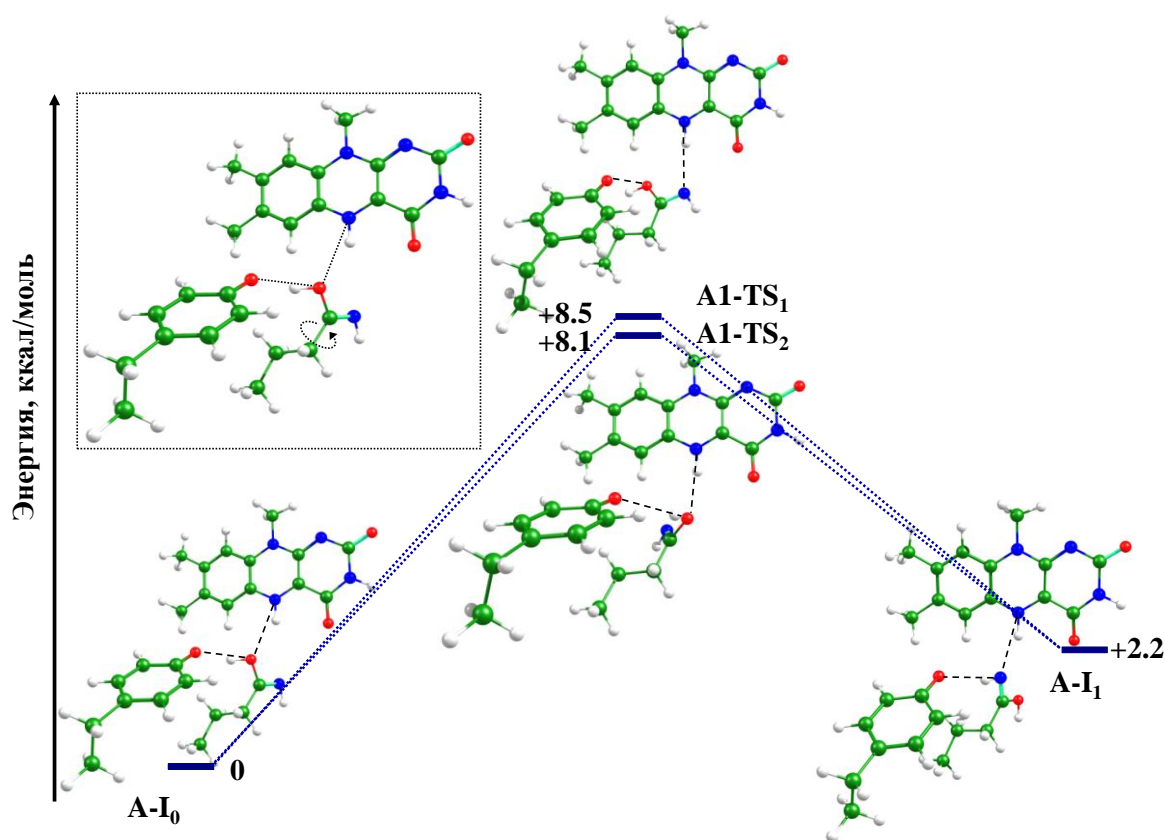


Рис. 4.13. Энергетический профиль стадии A1. Угол, отвечающий координате реакции, показан на вставке.

На стадии A2 происходит вращение OH группы вокруг одинарной связи Cδ–Oε Gln63, что необходимо для образования водородной связи Gln63 Oε—H...O=C4 FAD. Аналогично стадии A1, вращение вокруг Cδ–Oε связи возможно в двух направлениях (рис. 4.14). Переходное состояние A2-TS₁ лежит на 2 ккал/моль выше, чем A2-TS₂; это объясняется тем, что в структуре A2-TS₂ более сильные водородные связи, чем в A2-TS₁. Длина водородной связи между флавином и Gln63 $d(N5 \dots N\epsilon)$ в структуре A2-TS₁ равна 3.2 Å, а в структуре A2-TS₂ равна 3.0 Å; водородная связь, образованная Gln63 и Tyr21 $d(O \dots N\epsilon)$ также прочнее в A2-TS₂, где ее длина составляет 3.0 Å, в то время как в A2-TS₁ она равна 3.3 Å. Продукты этой стадии лежат на 10 ккал/моль ниже, чем реагенты из-за образования дополнительной водородной связи между Gln61 и FAD O4 ...H—Oε.

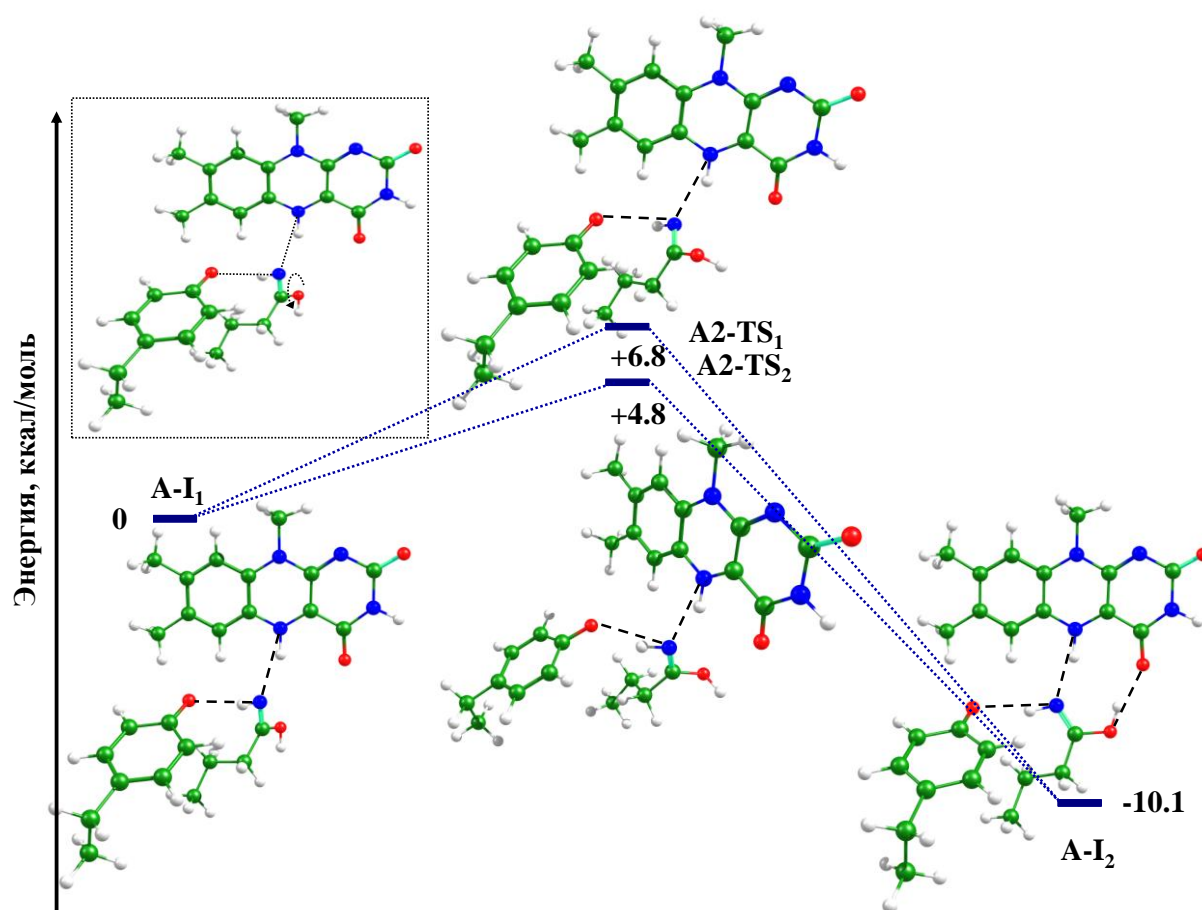


Рис. 4.14. Энергетический профиль стадии A2. Угол, отвечающий координате реакции, показан на вставке.

На последней стадии A3 проходит рекомбинация радикалов, сопряженная с процессом переноса протонов между флавином и Gln63, а также Gln63 и Tyr21. На всех предыдущих стадиях система находилась в синглетном бирадикальном

состоянии. Так как на стадии A3 происходит рекомбинация бирадикала, то электронная конфигурация продуктов (A-I₃) будет иметь электронное решение в рамках замкнутых оболочек. Для проверки корректного описания электронного решения в рамках UDFT для всех стационарных точек строилось решение в рамках CASSCF, которое указывало преимущественно на одноконфигурационный состав волновой функции. Для стадии A3 был проведен колебательный анализ в переходном состоянии (A3-TS), который показал наличие ровно одной мнимой моды, соответствующей движению атома водорода между атомами N5 фламина и N_ε Gln63 (рис. 4.15). Барьер такой реакции небольшой, что обусловлено движением протонов вдоль водородных связей, и составляет 5 ккал/моль.

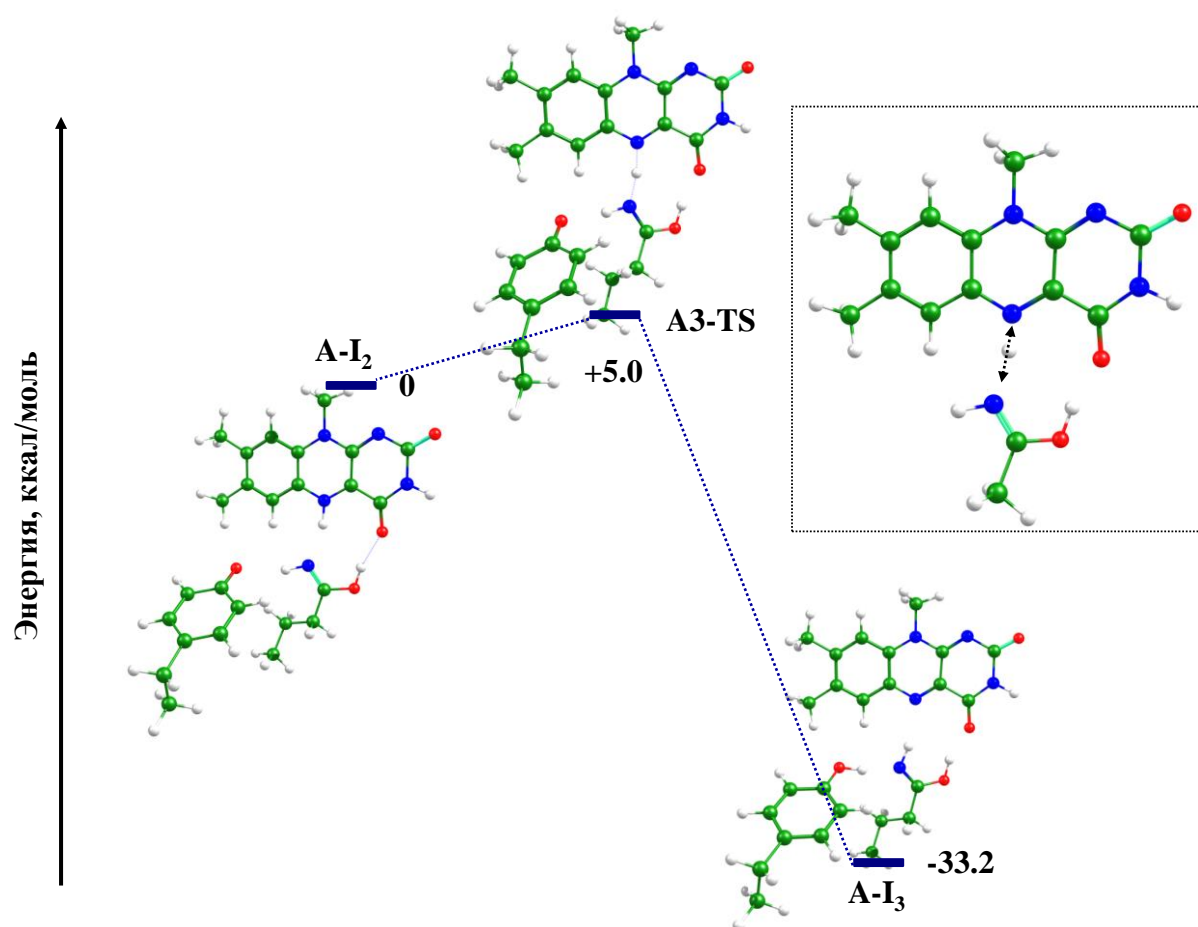


Рис. 4.15. Энергетический профиль стадии A3. Во вставке показана форма колебания, соответствующая мнимой колебательной моде в структуре переходного состояния стадии A3.

С образованием продуктов заканчиваются процессы, проходящие в хромофор-содержащей области белка. Как видно из расчетов в кластерной модели, на стадии A3 в активном сайте выделяется значительная энергия (33.2 ккал/моль).

Возможно, эта энергия распределяется дальше в белковую матрицу, что уже приводит к конформационным изменениям белка и замене Met106 на Trp104 в хромофорной области. Общая энергетическая диаграмма для всех стадий реакций, посчитанных в молекулярных кластерах показана на рисунке 4.16.

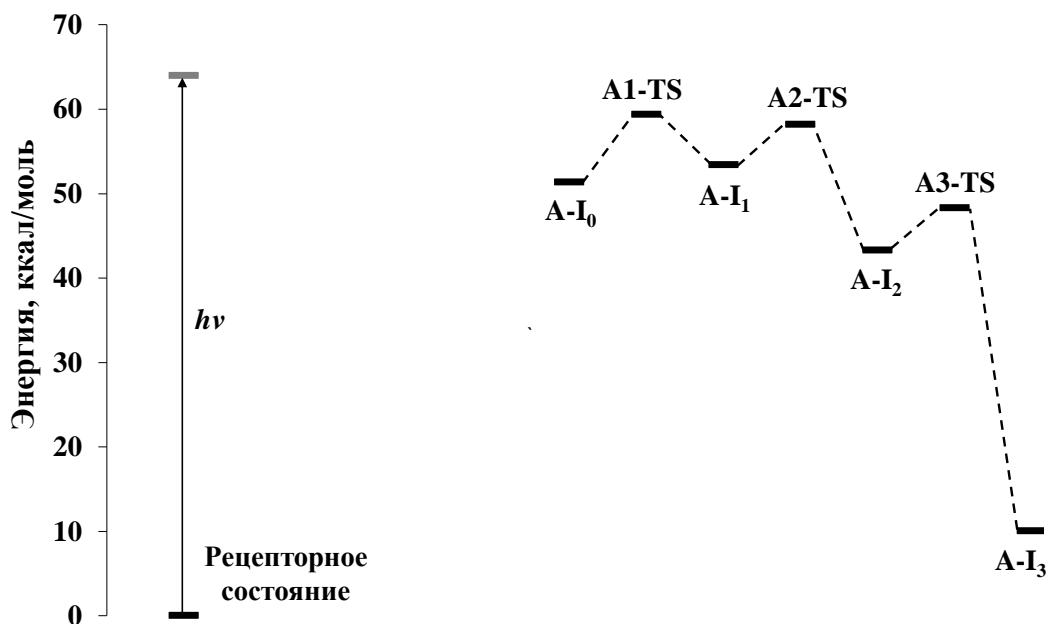


Рис. 4.16. Энергетическая диаграмма, полученная при расчете в молекулярных кластерах.

Путь В также состоит из трех элементарных стадий: рекомбинация бирадикала, сопряженная с переносом протона с флавина на Tyr21 через Gln63 (B1); вращение вокруг одинарной связи C γ -C δ в Gln63 (B2); *транс-цис* изомеризация группы C δ =N ϵ -H в Gln63 (B3).

В работе не проводились расчеты барьера стадии B1, так как анализируя путь А, можно утверждать, что рекомбинация бирадикала и перенос протонов вдоль водородных связей проходит с очень низким барьером.

На стадии B2 происходит вращение вокруг одинарной связи C γ -C δ в Gln63, и барьеры вращения в различных направлениях составляют 6.5 ккал/моль и 5.1 ккал/моль. Скорость-лимитирующей является стадия B3 изомеризации C δ =N ϵ -H фрагмента Gln63, барьер которой составляет 28.7 ккал/моль, при этом в структуре переходного состояния фрагмент C δ =N ϵ -H практически линейный (рис. 4.17). Большой барьер на этой стадии говорит о невыгодности протекания процесса по такому механизму.

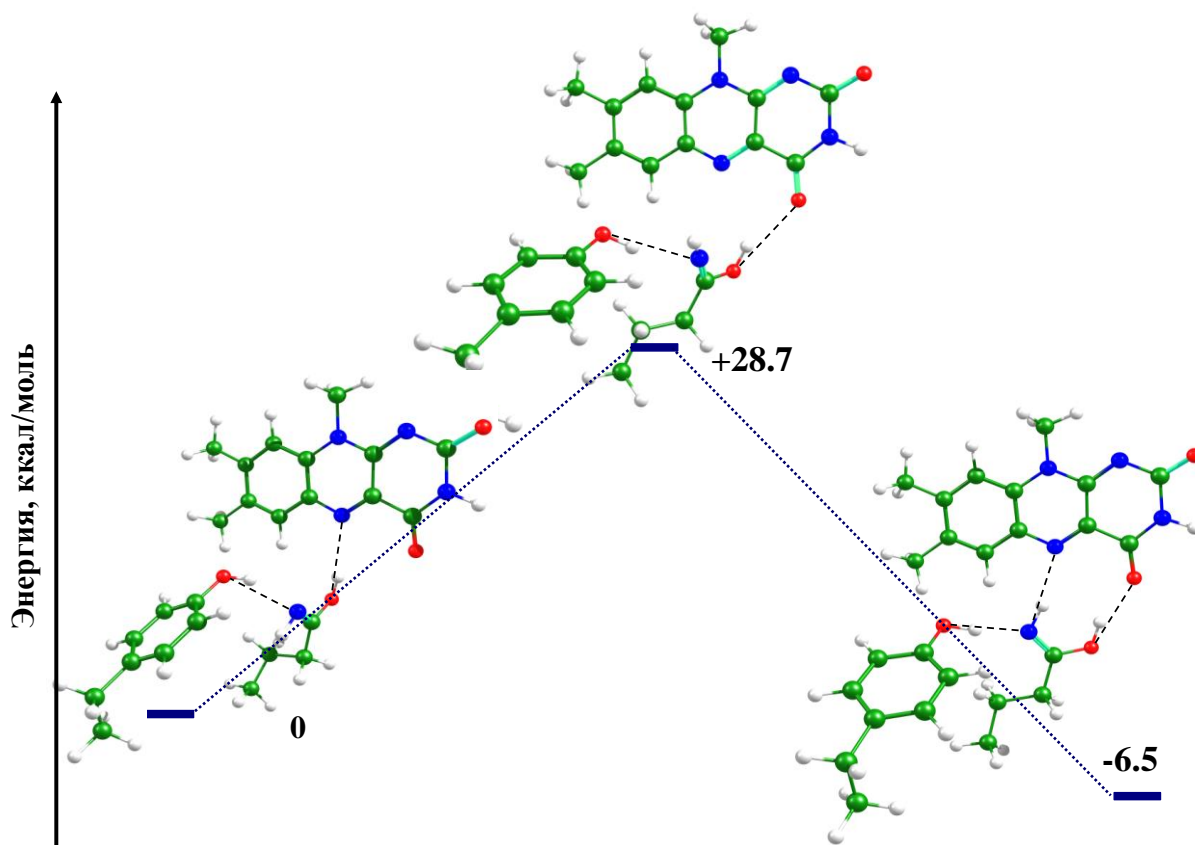


Рис. 4.17. Энергетический профиль стадии В3.

Известна кристаллическая структура интермедиата фотоцикла BLUF домена, которую удалось зафиксировать при низких температурах (PDB ID: 2IYI) [149]. Для неё характерна величина максимума полосы поглощения примерно посередине между рецепторным и сигнальным состояниями, то есть около 450 нм. Структура продуктов стадии А3 является хорошим кандидатом для описания этого интермедиата. Основываясь на данных, полученных в кластерных моделях, была получена структура, соответствующая продукту стадии А3 в полной КМ/ММ модели. Из рисунка 4.18 видно, что такая структура находится в согласии с данными РСА.

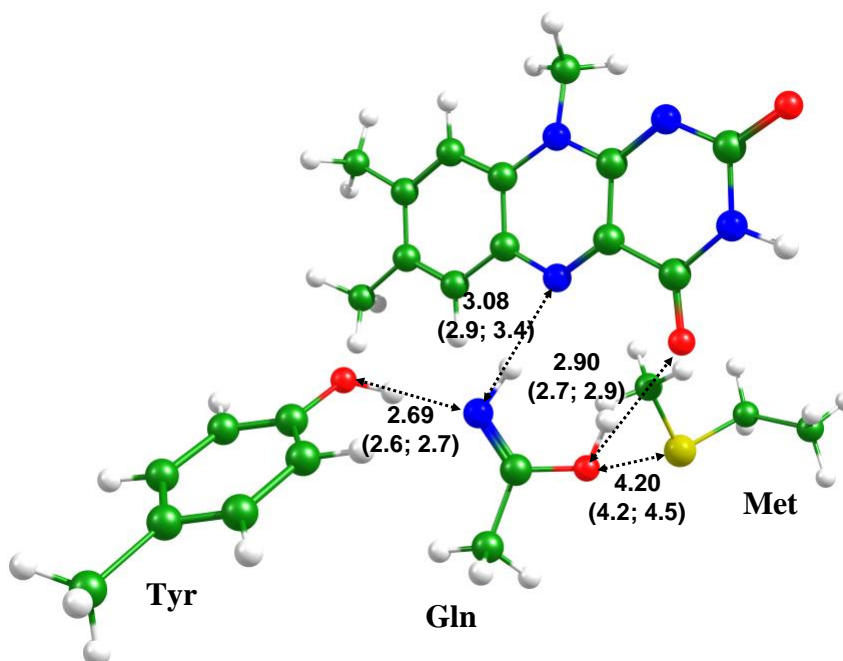


Рис. 4.18. Равновесные геометрические параметры стационарной точки продуктов стадии A3, полученные в КМ/ММ модели. В скобках показаны расстояния из мономеров A и B кристаллической структуры PDB ID: 2IYI [149].

Для этой структуры была рассчитана энергия вертикального перехода S_0-S_1 , которая составила 440 нм (2.82 эВ), что попадает в промежуток между рассчитанными энергиями S_0-S_1 переходов для рецепторного 429 нм (2.92 эВ) и сигнального 443 нм (2.80 эВ) состояний.

4.1.4. Механизм восстановления рецепторного состояния

Анализ структур BLUF доменов указывает на то, остаток гистидина (His73 в VlrB) рядом с тирозином является консервативным, а его локальное окружение не противоречит образованию разных протонированных форм. Поскольку эксперименты по кинетике распада сигнального состояния проводились при pH 8, а pK_a гистидина по боковой цепи в растворе составляет приблизительно 7, то обе формы могут быть представлены в белке. На рис. 4.19 показана структура сигнального состояния, использованная в качестве модели для последующих расчетов, полученная из кристаллической структуры PDB ID: 2BYC [136]. Для моделирования был выбран именно белок VlrB, так как для него характерно наименьшее время восстановления рецепторного состояния, что может свидетельствовать о меньших глобальных конформационных перестройках белка.

Выбранная структура соответствует кристаллической структуре рецепторного состояния, поэтому был проведен предварительный расчет методом молекулярной динамики с КМ/ММ потенциалами, который показал, что, ввиду отсутствия водородной связи с глутамином, боковая цепь метионина уходит за плоскость хромофора. Такая структура соответствует состоянию, представленному на рис. 4.19.

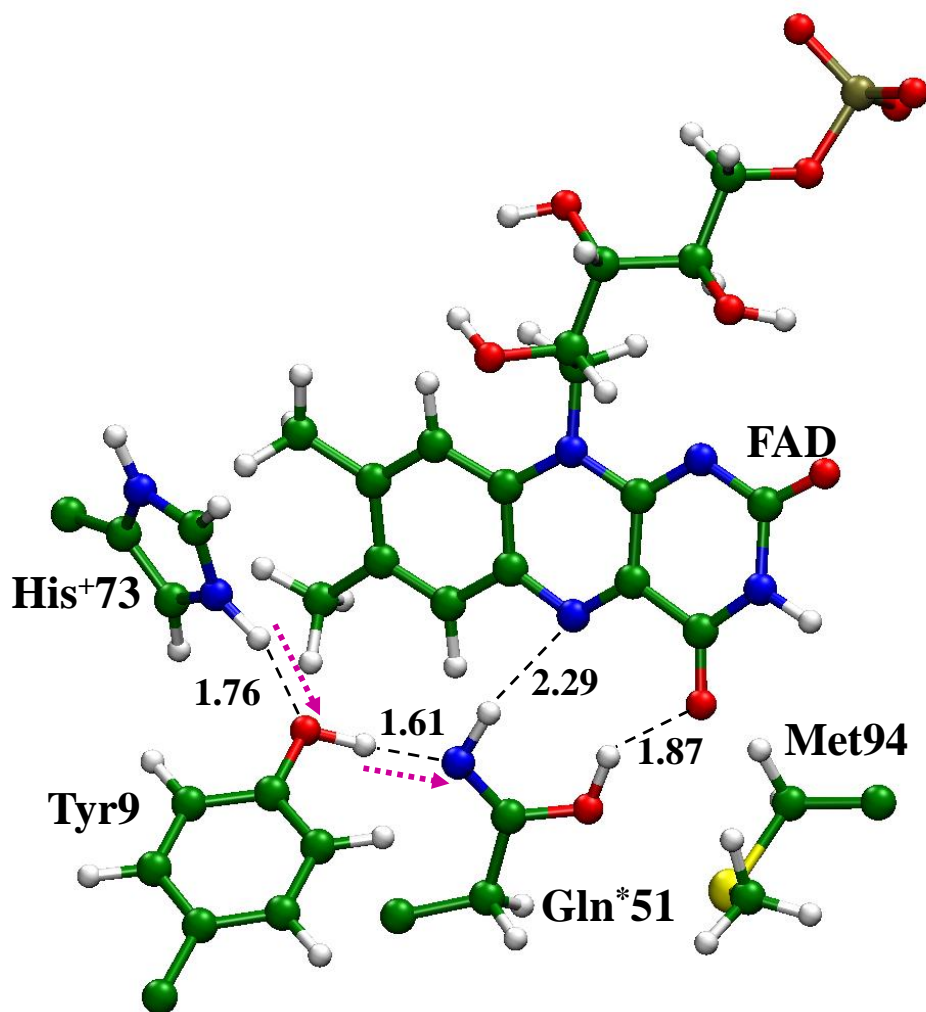


Рис. 4.19. Модель сигнального состояния, использованная в КМ/ММ расчетах. Стрелками показаны направления переноса протонов на первой стадии реакции.

Реакция восстановления рецепторного состояния начинается с переноса протона с гистидина на тирозин и с тирозина на глутамин (рис. 4.19-4.21). Далее в образовавшемся протонированном глутамине происходит поворот О-Н группы вокруг одинарной С δ -О ϵ связи, что приводит к образованию водородной связи глутамина с метионином. На третьей стадии происходит поворот вокруг одинарной С γ -С δ связи глутамина, при этом образуется водородная связь между О-Н группой глутамина и тирозином, а также, характерная для рецепторного

состояния, связь NH_2 фрагмента с метионином. На заключительной стадии происходит обратный перенос протонов с глутамина на тирозин и с тирозина на гистидин. В результате полностью восстанавливается рецепторное состояние. Общий энергетический профиль показан на рис. 4.21.

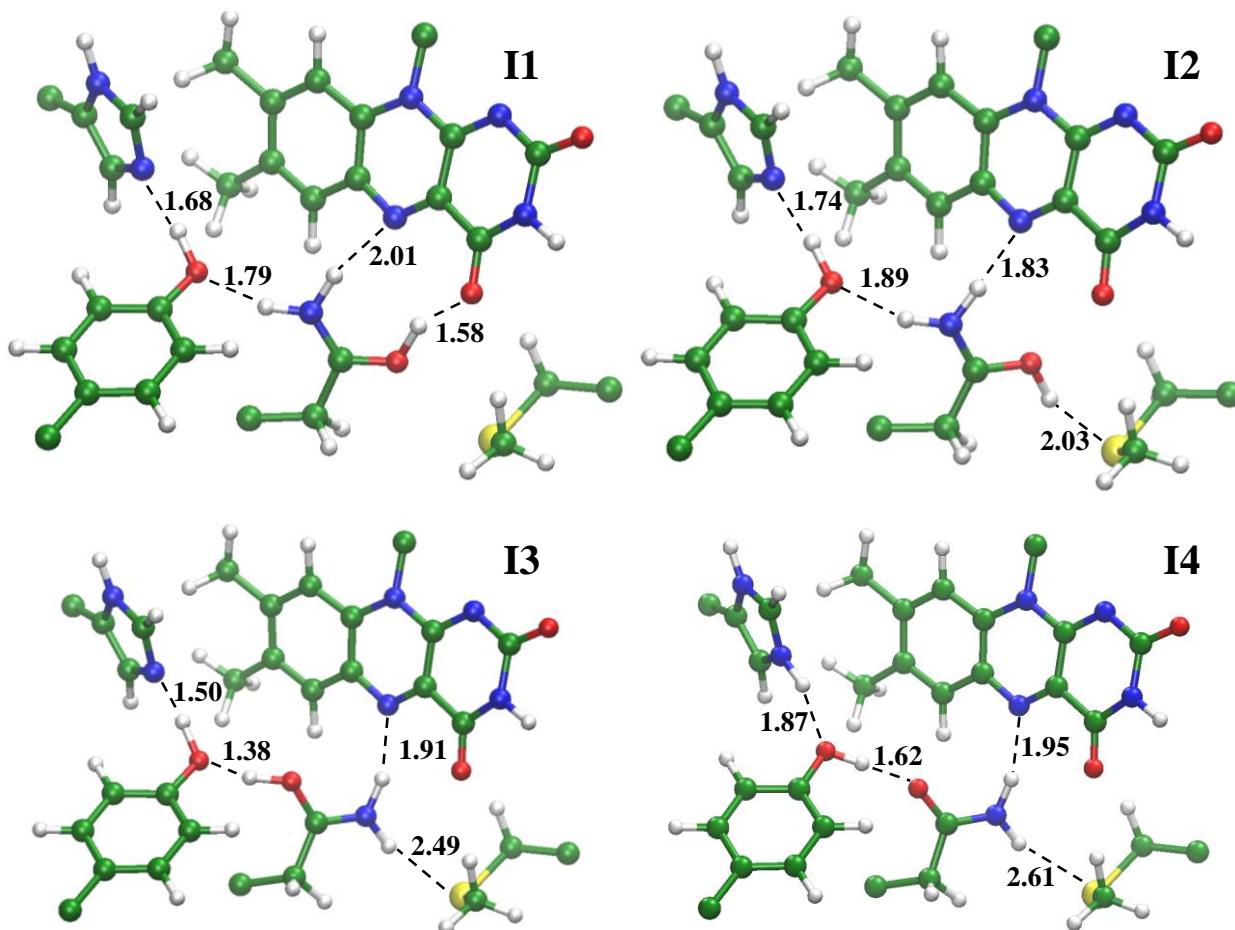


Рис. 4.20. Интермедиаты реакции восстановления рецепторного состояния; водородные связи показаны пунктирными линиями.

Из экспериментальных данных известно, что замена тирозина на его производное с замещенным атомом водорода фенильного кольца на атом фтора (рис. 4.21) приводит к замедлению реакции в 4 раза [155]. Построенный для реакции в такой системе профиль восстановления рецепторного состояния из сигнального показал согласие с экспериментом, о чем можно судить по повышению энергетических барьеров.

В литературе нет экспериментальных данных по рН зависимости, что несколько осложняет верификацию предложенного механизма. В пользу предложенной схемы говорят несколько факторов. Тирозин участвует в процессе реакции, так как его замена на фторированный аналог замедляет реакцию, что

подтверждено рассчитанными профилями. Эксперименты проводились при рН 8, что говорит о возможности существования протонированной формы гистидина. При переходе от структуры, показанной на рисунке 4.19, к рецепторному состоянию без дополнительного протона потребуется прямой перенос атома водорода с кислорода на азот и, возможно, изомеризация NH группы глутамина; оба этих процесса являются энергетически затратными.

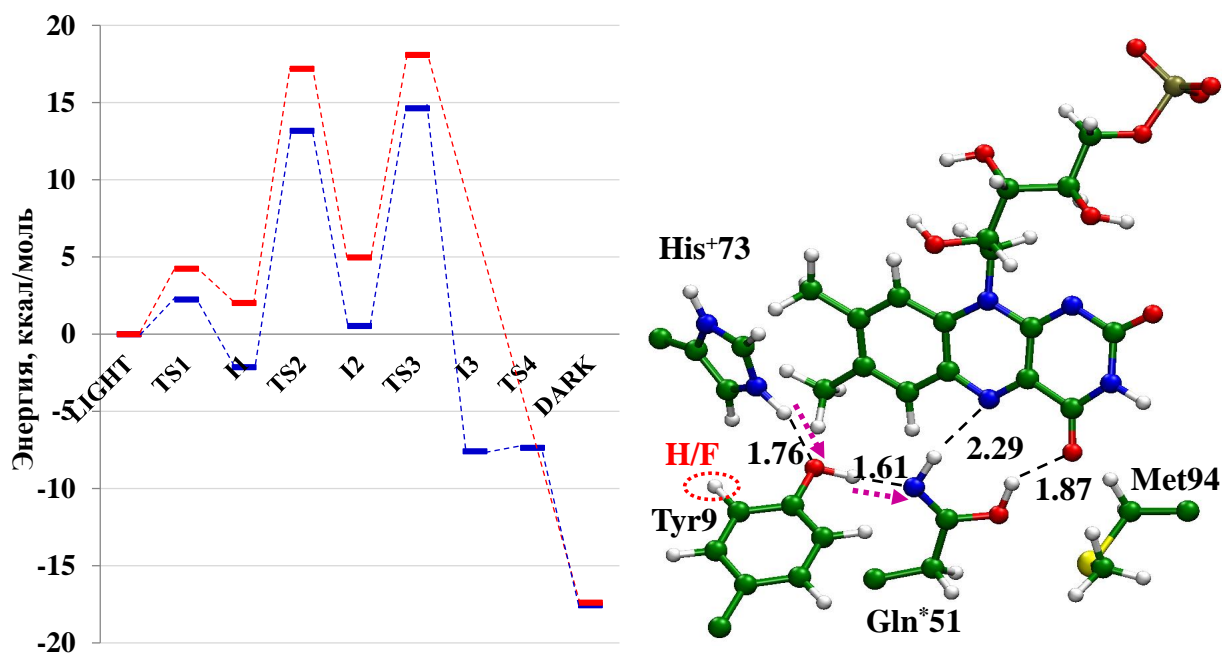


Рис. 4.21. Слева показаны энергетические профили реакции восстановления рецепторного (DARK) состояния из сигнального (LIGHT): синим показано сечение ППЭ для нативного белка, красным для мутантной формы, содержащей фторированный тирозин. Справа красным выделен атом водорода тирозина, по которому проходит замещение на фтор.

4.1.5. Влияние мутации Q63E

На сегодняшний день известно множество точечных мутаций BLUF домена. В рамках работы было проведено изучение мутации Q63E, экспериментальные данные по которой опубликованы в работе [172]. Интерес к ней вызван отсутствием изменения положения максимума полосы поглощения (450 нм) в результате фотореакции. Так как функциональной в глутаминовой кислоте является карбоксильная группа, то как в рецепторном, так и в сигнальном состояниях возможны лишь два типа структур; на рис. 4.22 показаны равновесные геометрические конфигурации активного сайта, полученные в рамках метода КМ/ММ. Для структуры, изображенной в правой части рис. 4.22 энергия

вертикального S_0-S_1 перехода составила 434 нм (2.86 эВ), для структуры в левой части – 435 нм (2.85 эВ). Таким образом, обе имеющиеся конформации имеют одинаковую величину энергии вертикального S_0-S_1 перехода и неотличимы при изучении спектров поглощения. Тем не менее, это не исключает возможности фотоцикла и может изучаться в дальнейшем.

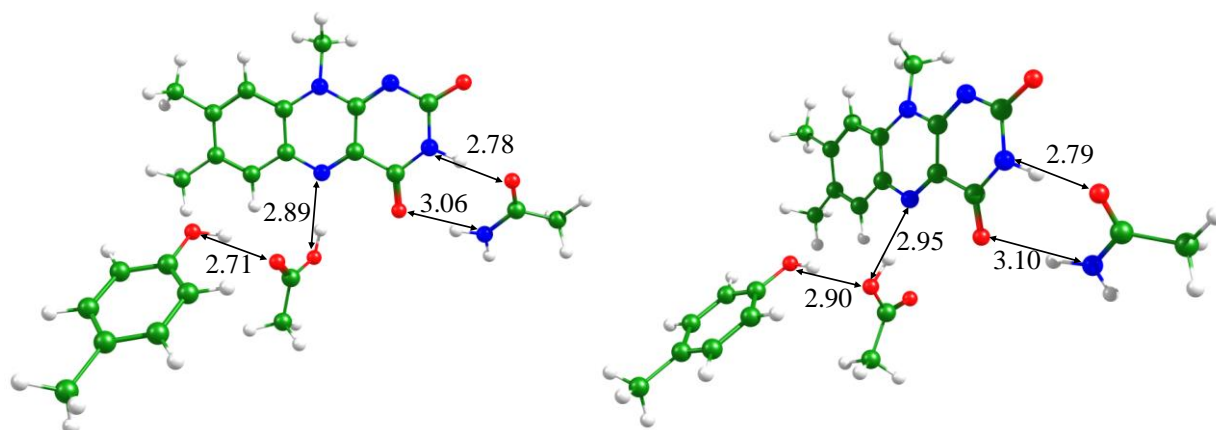


Рис. 4.22. Конформации хромофорной области мутанта Q63E. Расстояния показаны для водородных связей.

С методической точки зрения можно сделать вывод о том, что выбранная методика расчета энергий вертикальных S_0-S_1 переходов способна количественно и с высокой точностью оценивать малейшие изменения окружения для исследуемой системы. В частности, в работе были количественно охарактеризованы спектры рецепторного и сигнального состояний BLUF домена белка AppA и его мутанта Q63E (рис 4.23).

Рецепторное состояние	Мутант Q63E	Сигнальное состояние
443 нм	450 нм	456 нм
<i>429 нм</i>	<i>435 нм</i>	<i>443 нм</i>

Рис. 4.23. Сравнение экспериментальных (синим) [172] и рассчитанных в работе (красным курсивом) значений максимумов полос поглощения и вертикальных энергий возбуждения, соответственно.

4.2. Механизм передачи сигнала от фоторецепторного BLUF домена к каталитическому EAL домену

4.2.1. Обзор литературы

В предыдущем разделе обсуждался механизм фотореакции в фоторецепторном BLUF домене белка AppA. Этот домен широко распространен и во многих других бактериальных белках и выполняет регуляторную функцию. Так, в белке BlrP1, обнаруженном в бактерии *Klebsiella pneumoniae*, фоторецепторный домен регулирует скорость химической реакции в каталитическом домене EAL, с которым он связан. Облучение этого белка синим светом приводит к конформационным изменениям в BLUF домене, которые затем передаются в EAL домен и приводят к изменению скорости реакции гидролиза специфического субстрата циклического димера гуанозинмонофосфата в 4 раза [173]. Этот субстрат является вторичным мессенджером, и его концентрация в клетке регулирует подвижность бактерии: при низких концентрациях бактерия очень подвижна, а с увеличением концентрации ее подвижность уменьшается, а после некоторого порогового значения бактерии начинают собираться в колонии и образовывать биопленки [174–184].

В 2008 году была получена кристаллическая структура белка BlrP1, в которой белок находится в форме димера [173]. Было показано, что в растворе этот белок также находится в виде димера. Анализ структуры показывает, что внутри одного мономера BLUF и EAL домены связаны гибкой петлей, через которую едва ли может передаваться сигнал. В то же время фоторецепторный и каталитический домены разных субъединиц прочнее связаны между собой, что может приводить к передаче сигнала по этому каналу. При изучении BLUF домена белка BlrP1 методом ЯМР авторы работы [144] обнаружили, что в результате фотореакции значительные конформационные изменения происходят в области $\alpha_3\alpha_4$ спиралей, находящихся на периферии, в особенности в области остатков Val117 и Thr118. В соответствии со своими наблюдениями авторы предложили три возможных области передачи сигнала: петля $\beta_4\beta_5$, петля $\alpha_3\alpha_4$ и α_4 спираль (рис. 4.24).

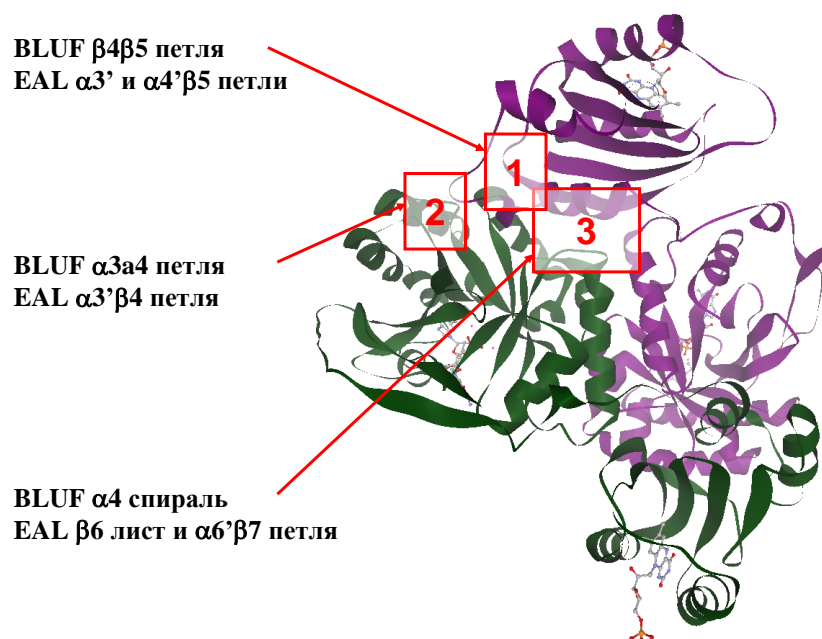


Рис. 4.24. Три возможные области передачи сигнала от BLUF к EAL домену. Здесь и далее фиолетовым цветом показан мономер A, а зеленым – B.

4.2.2. Нативная форма белка *BlrP1*

Изучение путей передачи сигнала осуществлялось на основании МД расчетов, проведенных для димерной структуры *BlrP1*. В качестве начального приближения использовалась кристаллическая структура (PDB ID: 3GG0) белка *BlrP1 Klebsiella pneumoniae* [173]. Белок помещался в прямоугольный ящик из молекул воды размером $103 \times 106 \times 100 \text{ \AA}^3$ и заряд нейтрализовывался добавлением 18 ионов натрия. МД расчет был проведен в каноническом ансамбле NVT при температуре 300 К, при этом анализировалась стабильность водородных связей вдоль МД траектории. Так как представленные результаты могут зависеть от критериев оценки водородной связи [185–188], была проведена предварительная оценка чувствительности результатов к выбору таких критериев. Основными параметрами водородной связи является R – расстояние между тяжелыми атомами донора и акцептора водородной связи (D...A) и угол Φ , образованный тремя атомами (D-H...A). В общем случае наличие водородной связи предполагает диапазон угла Φ от 150° до 180° , однако для белковых систем возможен выбор более мягких критериев $90^\circ < \Phi < 180^\circ$. В качестве критерия R было выбрано расстояние 3.2 \AA в соответствии с [185]. В таблице 4.3 показана чувствительность результатов к выбранным критериям [189].

Таблица 4.3. Стабильность водородных связей между аминокислотными остатками BLUF и EAL доменов вдоль траекторий 5 нс и 20 нс. Чувствительность результата к выбранному критерию длины связи R и угла Φ .

Водородные связи между bBLUF и aEAL доменами	Стабильность водородных связей (%)					
	Траектория 5 нс			Траектория 20 нс		
	$R < 3.2 \text{ \AA}$	$R < 3.2 \text{ \AA},$ $90^\circ < \Phi$ $\Phi < 180^\circ$	$R < 3.2 \text{ \AA},$ $150^\circ < \Phi$ $\Phi < 180^\circ$	$R < 3.2 \text{ \AA}$	$R < 3.2 \text{ \AA},$ $90^\circ < \Phi$ $\Phi < 180^\circ$	$R < 3.2 \text{ \AA},$ $150^\circ < \Phi$ $\Phi < 180^\circ$
Val117N–Asp267O δ 1	19.5	19.5	17.5	9.7	9.7	8.6
Val117N–Asp267O δ 2	53.7	53.7	6.4	33.0	32.9	4.9
Thr118N–Asp267O δ 2	93.2	93.2	84.9	59.8	59.8	55.1
Thr118O γ –Asp267O δ 2	99.8	99.8	94.8	64.4	64.2	59.9
Asn122O δ 1–Lys321N ζ	68.1	68.1	4.8	68.1	68.1	9.6
Arg127N η 2–Asp320O δ 1	99.2	99.2	92.8	96.6	96.6	73.6
Arg127N η 2–Gly353O	85.3	85.3	18.3	93.5	93.6	49.3
Arg127N ϵ –Gly353O	98.0	98.0	67.3	70.6	70.6	36.2
Arg124N ϵ –Leu352O	99.6	99.6	72.1	99.5	99.5	71.0
Arg124N η 2–Leu352O	75.7	75.7	25.1	70.7	70.7	17.5
Arg138N η 2–Asp351O δ 1	92.0	92.0	86.9	63.2	63.2	55.6
Arg138N η 2–Asp351O δ 2	11.6	11.6	3.6	43.4	43.4	33.6
Arg138N η 1–Glu350O ϵ 1	60.6	60.6	44.6	49.2	49.2	35.7
Arg138N η 1–Glu350O ϵ 2	39.4	39.4	27.1	47.9	47.9	30.8

Из таблицы 4.3 видно, что для анализа стабильности водородных связей достаточно изучать более короткие траектории (5 нс). Влияние выбора более строгих критериев водородной связи также оказалось незначительным, что позволяет использовать для дальнейшего анализа только критерий расстояния $R < 3.2 \text{ \AA}$.

Далее будут рассмотрены области взаимодействия BLUF и EAL доменов (рис. 4.25, таблица 4.4): (1) Область $\alpha 3\alpha 4$ петли: взаимодействия между $\alpha 3\alpha 4$ петлей BLUF домена (аминокислотные остатки 114–123) и $\alpha 3'\beta 4$ петлей EAL домена (аминокислотные остатки 262–268); (2) область $\alpha 4$ спирали: взаимодействия между $\alpha 4$ спиралью BLUF домена (аминокислотные остатки 122–138) и $\beta 6$ листом (аминокислотные остатки 320–324), а также так называемой «соединительной» $\alpha 6'\beta 7$ петлей (аминокислотные остатки 350–354) EAL домена; (3) область $\beta 4\beta 5$ петли: взаимодействия между $\beta 4\beta 5$ петлей BLUF домена (аминокислотные остатки 83–92) и $\alpha 3'\beta 4$ петлей (аминокислотные остатки 262–268), $\alpha 4'\beta 5$ петлей (аминокислотные остатки 295–297) EAL домена.

На рис. 4.25 и в таблице 4.4 показаны области взаимодействия петли $\alpha 3\alpha 4$ BLUF и петли $\alpha 3'\beta 4$ EAL доменов. В частности, карбоксильная группа Asp267 EAL домена образует стабильные водородные связи с пептидными группами Val117 и Thr118, а также гидроксильной группой Thr118 BLUF домена при взаимодействии пары aBLUF-bEAL. В EAL домене конформационные изменения петли $\alpha 3'\beta 4$ могут быть переданы через лист $\beta 4$ в спираль $\alpha 4$, которая является важной для каталитической активности [173]. Лист $\beta 4$ содержит аминокислотный остаток Glu272, координирующий ион металла в активном сайте, также остаток Glu275, участвующий в аллостерической регуляции каталитической активности фермента [182,184]. Предполагая, что в результате фотовозбуждения и активации флавина сигнал переходит на петлю $\alpha 3\alpha 4$, можно допустить, что это приводит к дальнейшей передаче сигнала в EAL домен.

Результаты, представленные в таблице 4.4, несколько отличаются для пар aBLUF-bEAL и bBLUF-aEAL. Это связано с тем, что в кристаллической структуре отсутствуют аминокислотные остатки 115-119 в bBLUF домене, что приводит к необходимости их конструировать на начальных этапах моделирования.

Таблица 4.4. Стабильность водородных связей между аминокислотными остатками BLUF и EAL доменов. Результаты независимых МД траекторий длиной 5 нс показаны в колонках 1, 2 и 3. Пустые ячейки указывают на стабильность меньше 5 %.

Область	Взаимодействия между aBLUF и bEAL	Стабильность (%)			Взаимодействия между bBLUF и aEAL	Стабильность (%)		
		1	2	3		1	2	3
петля $\alpha 3\alpha 4$	Val117N–Asp267O $\delta 1$		10.0		Val117N–Asp267O $\delta 1$	15.6	11.4	24.8
	Val117N–Asp267O $\delta 2$	11.2	84.2	6.2	Val117N–Asp267O $\delta 2$	86.4	75.4	56.5
	Thr118N–Asp267O $\delta 2$	13.4	95.4	9.2	Thr118N–Asp267O $\delta 2$	94.2	89.0	93.9
	Thr118O γ –Asp267O $\delta 1$	55.8			Thr118O γ –Asp267O $\delta 1$			
	Thr118O γ –Asp267O $\delta 2$	16.2	99.2	22.2	Thr118O γ –Asp267O $\delta 2$	99.4	94.0	99.7
спираль $\alpha 4$	Asn122O $\delta 1$ –Lys321N δ	95.4	95.0	90.3	Asn122O $\delta 1$ –Lys321NZ	92.4	94.4	70.2
	Arg127N $\eta 2$ –Asp320O $\delta 1$				Arg127N $\eta 2$ –Asp320O $\delta 1$	98.4	87.6	99.2
	Arg127N $\eta 2$ –Gly353O				Arg127N $\eta 2$ –Gly353O	92.2	81.0	85.0
	Arg127N $\eta 1$ –Gly353O				Arg127N ϵ –Gly353O	98.0	97.4	96.3
	Arg127N $\eta 1$ –Thr355O γ				Arg127N $\delta 1$ –Thr355O γ			70.0
	Arg127N ϵ –Thr355O γ	58.4			Arg127N ϵ –Thr355O γ			
	Arg124N ϵ –Leu352O	94.2	97.6	96.8	Arg124N ϵ –Leu352O	94.4	85.6	99.2
	Arg124N $\eta 2$ –Leu352O	79.4	78.8	85.9	Arg124N $\eta 2$ –Leu352O	79.4	92.0	79.3
	Arg138N $\delta 1$ –Asp351O $\delta 1$		90.0	8.3	Arg138N $\eta 2$ –Asp351O $\delta 1$	99.8	86.4	99.8
	Arg138N $\delta 1$ –Asp351O $\delta 2$		37.2		Arg138N ϵ –Asp351O $\delta 2$			
	Arg138N ϵ –Asp351O $\delta 1$	17.2	60.8	5.8	Arg138N ϵ –Asp351O $\delta 1$			
	Arg138N ϵ –Asp351O $\delta 2$	62.2	15.2	8.1	Arg138N ϵ –Asp351O $\delta 2$			
	Arg138N $\eta 1$ –Glu350O $\epsilon 1$	25.0			Arg138N $\eta 1$ –Glu350O $\epsilon 1$	59.6	73.8	52.1
Arg138N $\eta 1$ –Glu350O $\epsilon 2$	68.0	32.0		Arg138N $\eta 1$ –Glu350O $\epsilon 2$	8.2	31.0	39.8	
петля $\beta 4\beta 5$	Tyr84OH–Gly296O				Tyr84OH–Gly296O	25.8	21.8	60.4
	Tyr84OH–Lys298N ζ	8.0		32.0	Tyr84OH–Lys298N ζ	38.0	25.8	8.4

$\alpha 3\alpha 4$ петля

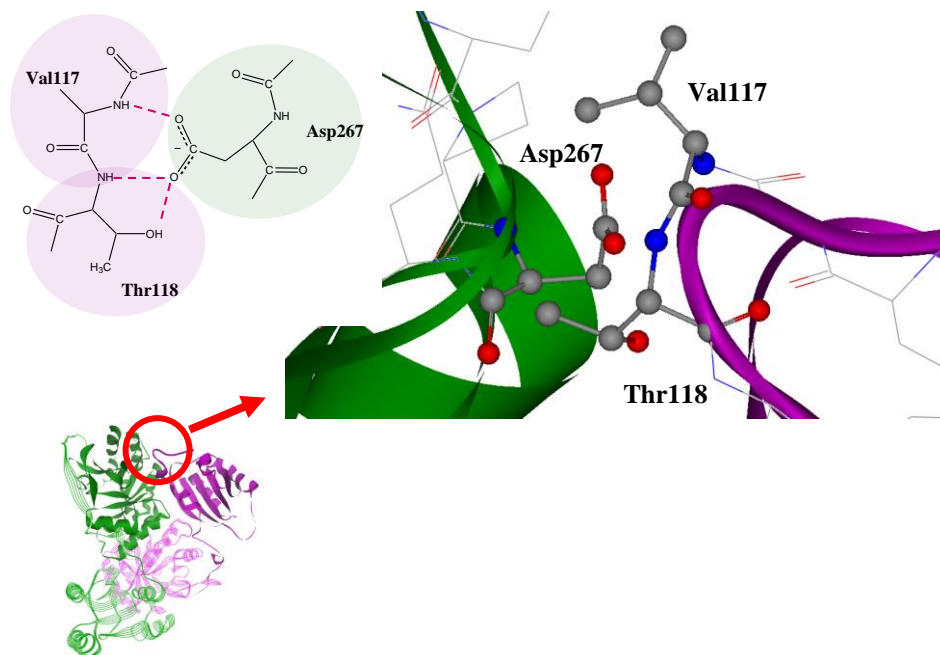


Рис. 4.25. Область связывания петли $\alpha 3\alpha 4$ BLUF домена с EAL доменом. Здесь и далее в разделе 4.2.2 серым показаны атомы углерода, красным — кислорода, синим — азота.

На рисунках 4.24, 4.26 и в таблице 4.4 показаны области связывания спирали $\alpha 4$ BLUF домена с EAL доменом. В этой области со стороны BLUF домена есть два положительно заряженных остатка Arg124 и Arg127, являющихся донорами водородных связей для пептидных фрагментов остатков Leu352 и Leu353. Водородные связи между Arg124 и Leu352 стабильны в обеих парах aBLUF-bEAL и bBLUF-aEAL. Arg127, напротив, по-разному ориентирован в мономерах. Боковая цепь Arg127 в aBLUF домене жестко фиксирована между $\beta 6$ и $\beta 7$ листами и образует водородные связи с Asp320 и Gly353. Боковая цепь Arg127 в мономере bBLUF образует водородную связь с Thr355 только в начале моделируемой траектории, а потом обращается заряженной группой в раствор. На рисунке 4.26 показаны другие контакты, образующиеся в рассматриваемой области. Asp123 образует стабильные водородные связи с Lys298 в обеих парах aBLUF-bEAL и bBLUF-aEAL (не показано в таблице). Остальные водородные связи показаны на рисунке 4.26 и охарактеризованы в таблице 4.4. В обоих мономерах боковая цепь Lys321 значительно меняет ориентацию во время МД расчета (наибольшие изменения происходят за первые 200 пс расчета). Это единственный остаток, который значительно изменил свою конформацию по сравнению с

кристаллической структурой. Во время МД расчета Lys321 после конформационных изменений образует водородную связь с Asn122, которая остается неизменной до конца траектории. Также стабильные водородные связи образует Arg138, находящийся на конце спирали $\alpha 4$ с остатками Glu350 и Asp351. Эти водородные связи дополнительно фиксируют домены относительно друг друга. Таким образом, область спирали $\alpha 4$ BLUF домена образует множество водородных связей с EAL доменом и отвечает за взаимную ориентацию доменов. Большое количество контактов свидетельствует о прочности структуры в этой области.

Предположение о том, что петля $\beta 4\beta 5$ может отвечать за процесс передачи сигнала, связано с ее фотоиндуцированными конформационными изменениями в другом BLUF домене – белке AppA [138,143,149]. Эти изменения приводят к укорачиванию петли на несколько остатков за счет смещения $\beta 5$ листа, связанного с заменой в активном сайте аминокислотного остатка Met106 на Trp104. Хотя в BLUF домене на месте Trp104 находится треонин, можно предположить, что механизм конформационных изменений в этой области тот же, и такие изменения могут приводить к передаче сигнала. Однако в МД расчетах было показано, что в этой области не образуется стабильных водородных связей. Единственный кандидат для образования водородных связей – аминокислотный остаток Tyr84, который образует водородные связи с аминокислотными остатками того же BLUF домена Phe115 и Asp123. Так как в рецепторном состоянии отсутствуют контакты между BLUF и EAL доменами, то петля $\beta 4\beta 5$ не может участвовать в передаче сигнала.

α4 спираль

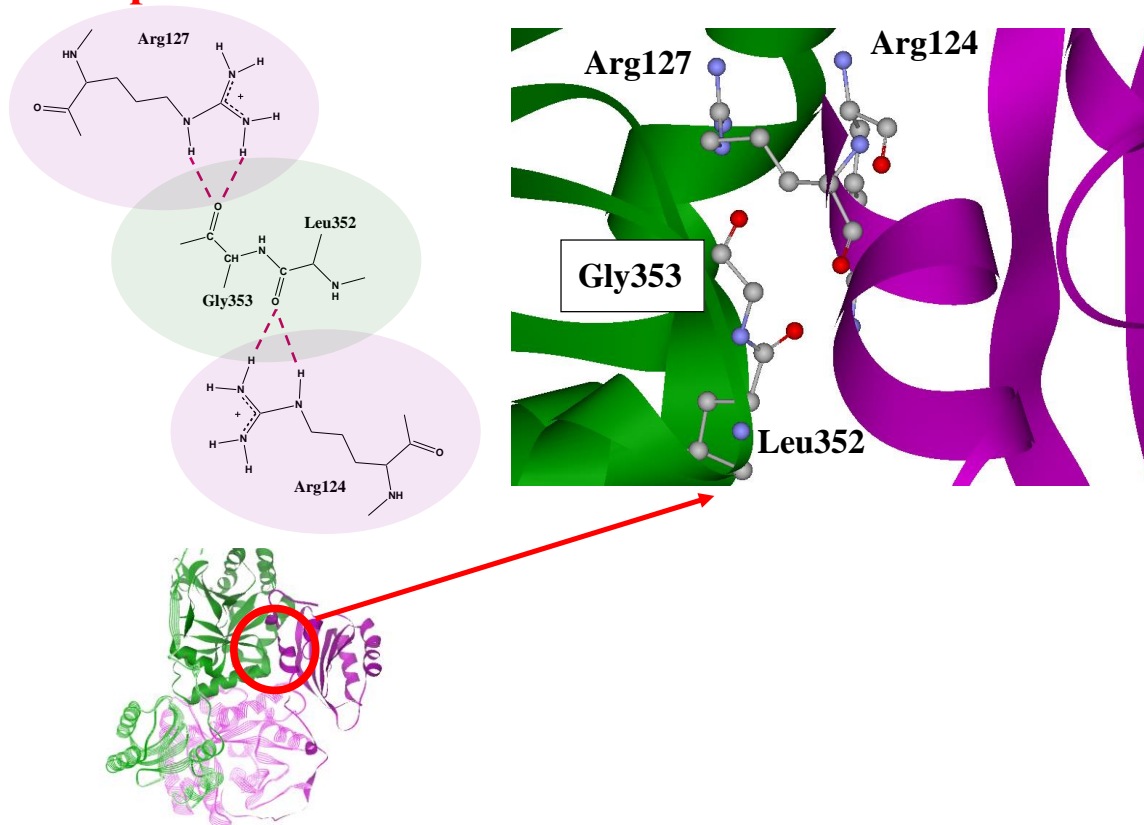


Рис. 4.26. Область связывания α4 спирали BLUF домена с EAL доменом.

α4 спираль

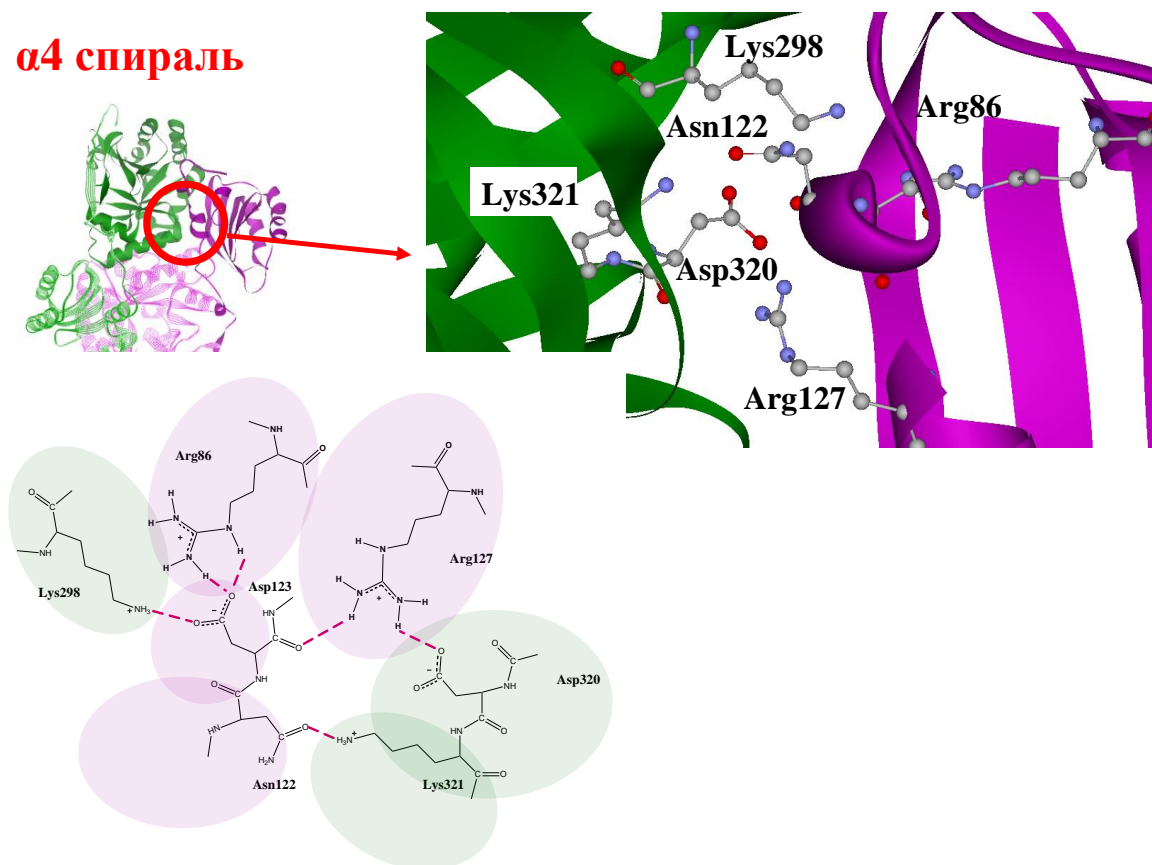


Рис. 4.27. Область связывания α4 спирали BLUF домена с EAL доменом.

4.2.3. Мутанты белка *BlrP1*

В работе [173] были получены двойные мутанты Leu128Cys—Gly353Cys и Ser309Cys—Ser312Cys. Они были подобраны таким образом, чтобы обеспечить образование дисульфидных мостиков между остатками цистеинов.

В случае двойного мутанта Leu128Cys—Gly353Cys образуются дисульфидные мостики aBLUF-Cys128—bEAL-Cys353 и bBLUF-Cys128—aEAL-Cys353, что соответствует рассмотренной области (2) спирали $\alpha 4$. Для такого мутанта были рассчитаны МД траектории, которые оказались схожими с таковыми для нативного фермента. Этот результат вполне ожидаем так как мутированный таким образом белок также проявляет каталитическую активность, причем большую, чем нативный фермент. Это может объясняться тем, что в случае мутанта происходит дополнительная взаимная фиксация доменов, более жесткая, чем в случае образования только водородных связей. К тому же, в мутанте Leu128Cys—Gly353Cys не пропадает светочувствительность каталитической активности, что также свидетельствует в пользу того, что спираль $\alpha 4$ отвечает за правильное связывание и ориентацию доменов.

Для двойного мутанта Ser309Cys-Ser312Cys возможны различные сценарии образования дисульфидных мостиков (рис. 4.28).

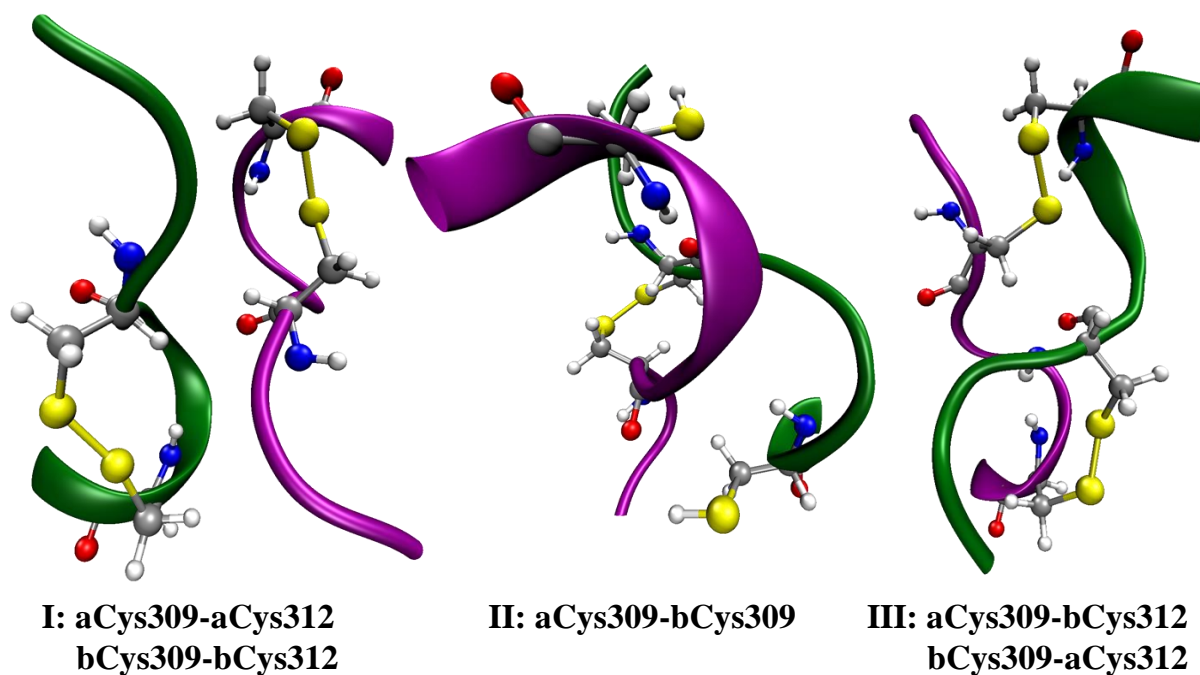


Рис. 4.28. Возможные варианты образования дисульфидных мостиков для мутанта Ser309Cys—Ser312Cys белка *BlrP1*.

Для мутанта типа I МД траектория была схожей с траекторией нативного белка. Это обусловлено тем, что дисульфидные мостики образуются внутри субъединицы и не вносят возмущений в димерную систему. Для случаев II и III образованные дисульфидные мостики приводят к значительным изменениям в конформации петли $\beta 5\alpha 5$. Хотя петля $\beta 5\alpha 5$ находится на удалении от активного сайта и ее роль пока до конца не изучена, известно, что мутации в ней приводят к полной потере каталитической активности фермента [182]. Для мутанта Ser309Cys-Ser312Cys белка Blrp1 также была обнаружена полная потеря каталитической активности [173].

Таким образом, изучая стабильность водородных связей, были сделаны заключения о роли частей BLUF домена в передаче сигнала в белке BlrP1. Петля $\alpha 3\alpha 4$ отвечает за процесс передачи сигнала; спираль $\alpha 4$ отвечает за взаимную ориентацию доменов, петля $\beta 4\beta 5$ не взаимодействует с EAL доменом. Потеря каталитической активности в двойном мутанте Ser309Cys-Ser312Cys связана с образованием дисульфидных мостиков между доменами, что приводит к нарушению нативной конформации петли $\beta 5\alpha 5$ в EAL домене.

4.3. Спектры поглощения и флуоресценции флавина в газовой фазе и растворе

В данном разделе приведены результаты расчетов спектров поглощения и флуоресценции флавина в газовой фазе и с учетом микросольватации. Такие расчеты были проведены в рамках многоконфигурационного метода самосогласованного поля в полном пространстве активных орбиталей CASSCF с последующим расчетом поправок по теории возмущений в варианте XMCQDPT2. Расчеты были выполнены для валидации выбранного протокола и правильного выбора активного пространства для процедуры CASSCF. Для расчета вертикальных энергий переходов был выбран вариант sa-CASSCF(12/11) с усреднением по двум нижним синглетным электронным состояниям и включал 6 занятых и 7 вакантных π орбиталей хромофора.

Полученные значения для вертикальных энергий возбуждения и флуоресценции флавина в газовой фазе составили 408 нм и 523 нм соответственно (таблица 4.5). В условиях микросольватации энергия вертикального $S_{0,\min} \rightarrow S_1$ перехода составляет 445 нм, что хорошо согласуется с экспериментальным

значением 450 нм. Рассчитанное значение, полученное для перехода $S_{1,\min} \rightarrow S_0$, составляет 537 нм, что практически совпадает с экспериментальным значением для максимума полосы флуоресценции 540 нм [190]. В обеих системах $S_0 \rightarrow S_1$ переход сопровождается увеличением электронной плотности на атоме азота N5 (рис. 4.29, обозначения атомов указаны на рис. 4.1). Этим объясняется смещение в сторону больших длин волн полос поглощения и испускания при добавлении молекул воды, образующих водородные связи с N5.

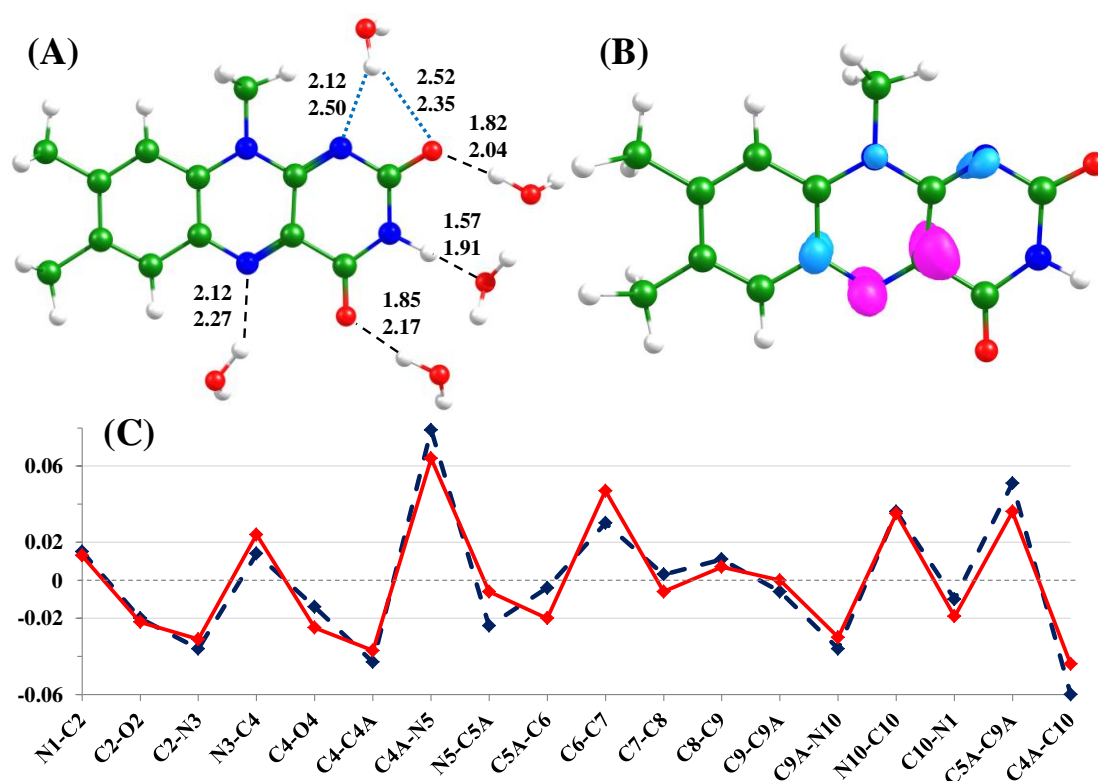


Рис. 4.29. (A) Равновесная геометрическая конфигурация флавина с 5 молекулами воды в основном электронном состоянии S_0 (верхние значения) и возбужденном S_1 (нижние значения), полученные методами $DFT/PBE0/cc-pvdz$ и $CASSCF(8/7)/cc-pvdz$ соответственно. (B) Разность электронной плотности S_1-S_0 рассчитанная в минимуме на поверхности S_0 ($S_{0,\min}$) методом $XMCQDPT2/CASSCF(12/11)/cc-pvdz$. Розовый и голубой цвета относятся к положительному и отрицательному значениям разностной электронной плотности, соответственно. (C) Альтернирование связей $S_{1,\min}-S_{0,\min}$. Положительные значения соответствуют удлинению связей в $S_{1,\min}$ по сравнению с $S_{0,\min}$. Красные сплошные линии и синие пунктирные соответствуют данным для комплекса флавина с водой и флавина в вакууме.

Таблица 4.5. Длины волн (нм) и соответствующие им энергии вертикальных переходов (в скобках в эВ), а также соответствующие им дипольные моменты переходов (в квадратных скобках в ае). Верхний ряд значений в колонке для iLOV соответствует конформации Gln_{out} , а нижний – Gln_{in} .

	Флавин	Флавин + 5 молекул воды	iLOV	iLOV-Q489K
$S_{0,min} \rightarrow S_1$	408 (3.04) [0.26]	445 (2.78) [0.30]	448 (2.77) [0.20] 461 (2.69) [0.21]	500 (2.47) [0.28]
$S_{1,min} \rightarrow S_0$	523 (2.37)[0.30]	537(2.30) [0.29]	486 (2.55) [0.14] 492 (2.52) [0.15]	583 (2.12) [0.15]
τ_{rad} , нс	13.6	15.1	25.4 ($Gln_{in}+Gln_{out}$) 26.3 (Gln_{out})	33.5
Стоксов сдвиг, эВ	0.67	0.48	0.22 0.17	0.35

4.4. Флуоресцентный белок iLOV и его мутантная форма

4.4.1. Литературные данные

Флуоресцентные белки на основе флавина (FbFP) являются перспективными для исследований *in vivo* в клетках и тканях и произошли от светочувствительного белка LOV (light, oxxygen and voltage sensor). Яркая флуоресценция, не зависящая от присутствия кислорода, небольшой размер белка, а также мономерная форма являются основными достоинствами представителей этого семейства. Недавние исследования показали, что FbFP с улучшенными характеристиками являются альтернативой широко известным белкам семейства GFP [191–196].

Несколько FbFP были получены из флуоресцирующего мутанта LOV2 C426A [197–199]. В исходном LOV2 домене консервативный остаток Cys426 образует ковалентный аддукт при возбуждении флавина синим светом, что приводит к отсутствию флуоресценции [200,201]. Мутация этого остатка на аланин блокирует фотохимическую реакцию и приводит к появлению флуоресценции с квантовым выходом 0.32, поэтому iLOV C426A используется как прототип для последующего создания улучшенных вариантов FbFP [198]. Последующие исследования по мутагенезу привели к возникновению белка iLOV с квантовым выходом флуоресценции 0.44 и повышенной фотостабильностью [198].

Для флуоресцентного белка iLOV спектр поглощения имеет максимумом при 447 нм и плечо при 470 нм [198]. Возбуждение iLOV на длине волны 450 нм

приводит к спектру флуоресценции с максимумом 497 нм и плечом с большей длиной волны. Все разработанные флуоресцентные белки с флавином, образованные из LOV C426A, имеют практически одинаковые значения максимумов полос поглощения и флуоресценции, однако квантовый выход отличается значительно [196].

4.4.2. Фотофизические свойства *iLOV*

Модельная система была получена на основе кристаллической структуры белка *iLOV* PDB ID: 4EET [199]. В соответствии с расчетами, проведенными методом молекулярной динамики с КМ/ММ потенциалами можно сделать вывод, что положения аминокислотных остатков в хромофор-содержащей области остаются постоянными за исключением Gln489, для которого характерны две конформации. Конформация Gln_{in} аналогична кристаллу и в ней боковая цепь взаимодействует с флавином. В случае Gln_{out} боковая цепь глутамина обращена в раствор (рис. 4.30). Анализ траектории показывает, что две конформации приблизительно одинаково заселены [202].

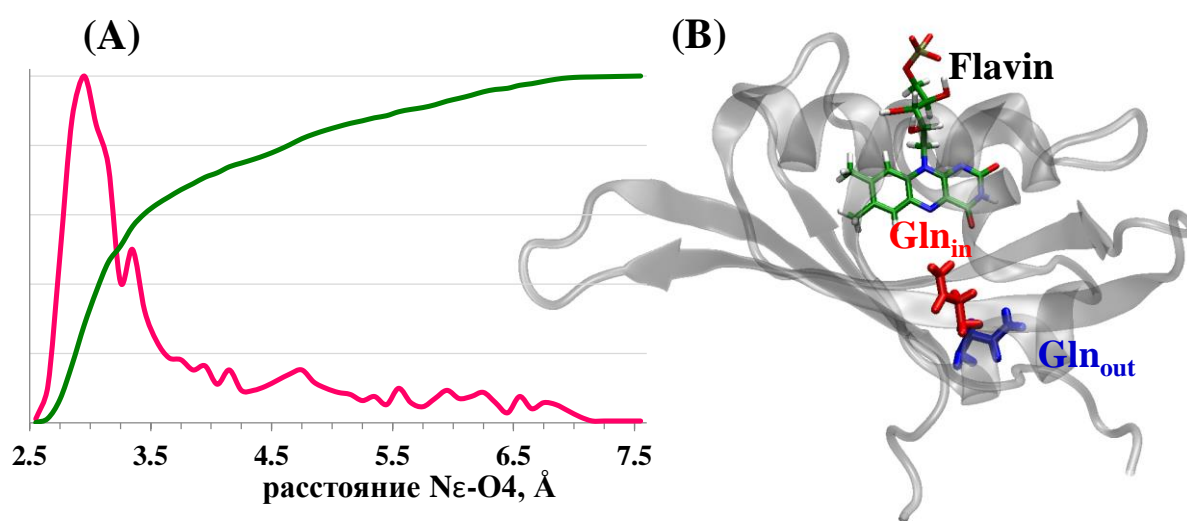


Рис. 4.30. Две различные конформации боковой цепи Gln489 в *iLOV*. (A) Распределение расстояний между атомами O4 флавина и Nε глутамина (малиновая кривая) и соответствующая накопленная вероятность (зелёная кривая). (B) Две конформации глутамина Gln_{in} и Gln_{out}.

Для расчета спектров поглощения и флуоресценции были получены равновесные геометрические конфигурации в КМ/ММ модели для основного электронного состояния методом PBE0/cc-pvdz/AMBER. Равновесные геометрические конфигурации в минимуме на первом возбужденном синглетном

состоянии рассчитывались в молекулярных кластерах с фиксированными концевыми атомами, при этом молекулярный кластер включал в себя всю квантовую часть КМ/ММ модели. Расчеты структуры $S_{1,min}$ проводились методом CASSCF, при этом электронная плотность не усреднялась по нескольким состояниям, а бралась исключительно для состояния S_1 . На рисунке 4.31 показаны равновесные геометрические конфигурации, а также изменения длин связей в хромофоре в возбужденном электронном состоянии. Рассчитанные величины энергий вертикальных переходов $S_{0,min} \rightarrow S_1$ для двух выбранных конформация дают различные значения: 448 нм для Gln_{out} и 461 нм для Gln_{in} (таблица 4.5). Это объясняется стабилизацией возбужденного состояния при условии наличия водородной связи с атомом N5 хромофора. Для эмиссии $S_{1,min} \rightarrow S_0$ были получены значения 486 нм (Gln_{out}) и 492 нм (Gln_{in}).

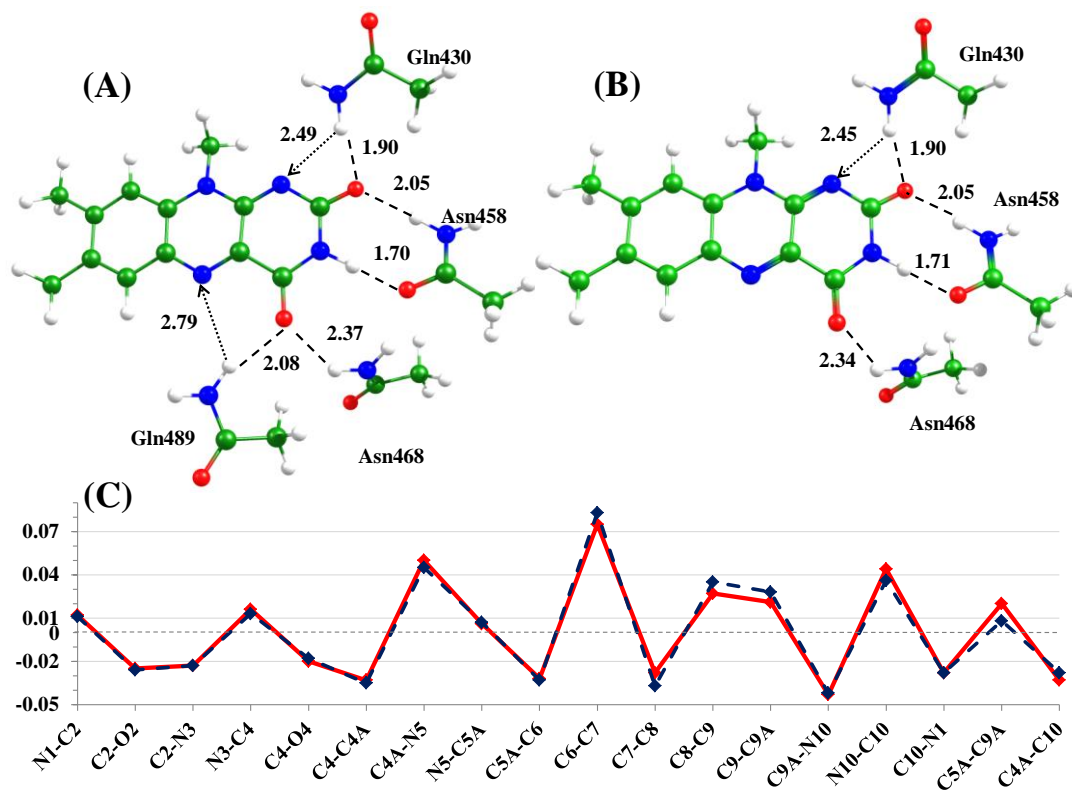


Рис. 4.31. (A,B) Ключевые расстояния в хромофор-содержащей области в двух различных конформациях iLOV Gln_{in} (A) и Gln_{out} (B) в $S_{0,min}$. (C) Альтернирование связей $S_{1,min}-S_{0,min}$. Положительные значения соответствуют удлинению связей в $S_{1,min}$ относительно $S_{0,min}$. Красные сплошные и синие пунктирные линии соответствуют конформациям Gln_{out} и Gln_{in} в iLOV.

Поскольку белок iLOV является потенциальным компонентом FRET сенсоров (FRET – резонансно-индуктивный перенос энергии, подробнее FRET сенсоры обсуждаются в главе 5), необходимо знать его дипольный момент

перехода $S_{0,\min} \rightarrow S_1$, если он выступает в качестве акцептора и дипольный момент перехода $S_{1,\min} \rightarrow S_0$, если он выполняет функцию донора. Дипольный момент перехода $S_{0,\min} \rightarrow S_1$ направлен по линии, соединяющей атомы N3 и C9A, а дипольный момент перехода $S_{1,\min} \rightarrow S_0$ по линии между атомами N3 и C10 хромофора (рис. 4.32). Эти результаты погут быть использованы для создания эффективных FRET пар. Рассчитанные направления дипольных моментов перехода хорошо согласуются с экспериментальными данными по измерениям в замороженной системе глицерин/вода с молекулами флавина [203] и приведенными в предыдущих расчетах [204].

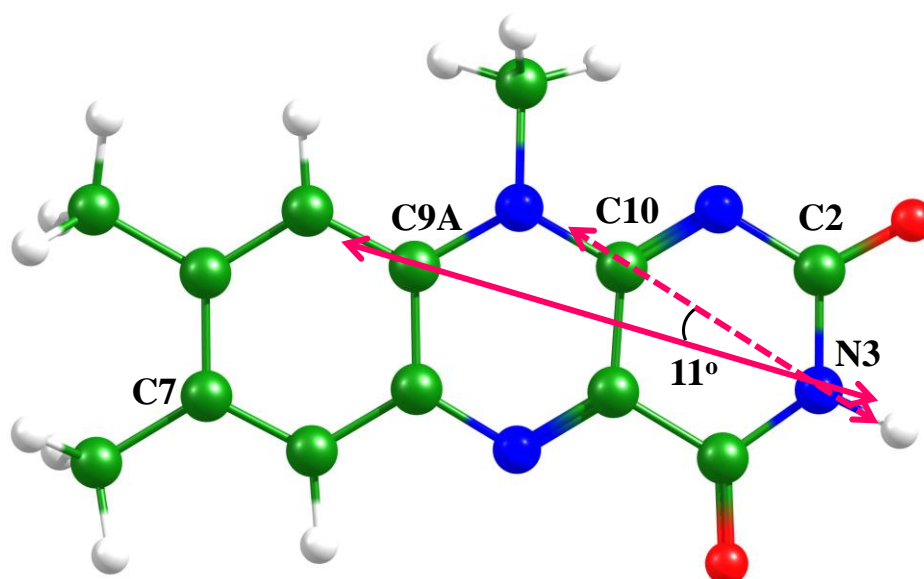


Рис. 4.32. Дипольные моменты перехода $S_{0,\min} \rightarrow S_1$ (сплошная линия) и $S_{1,\min} \rightarrow S_0$ (пунктирная линия) в хромофорной группе белка *iLOV*.

4.4.3. Мутантная форма *iLOV* Q489K

В данной работе предложена мутация глутамина 489 на лизин Q489K для добавления водородной связи с атомом азота N5 хромофора и усиления стабилизации возбужденного состояния. Это было сделано для того чтобы сместить спектры поглощения и флуоресценции в красную область и добавить дополнительный цвет в палитру цветов флуоресцентных белков на основе флавина. Модельная система была получена заменой боковой цепи глутамина в конформации Gln_{in} на заряженный остаток лизина. В равновесной геометрической конфигурации протонированная амино группа лизина образует водородные связи с атомами O4 и N5 хромофора (рис. 4.33). Анализ динамики такой структуры в основном электронном состоянии показывает, что водородная связь с атомом O4

стабильнее, чем с N5. По всей вероятности, при возбуждении происходит перераспределение электронной плотности и N5 становится более выгодным партнером для образования водородной связи.

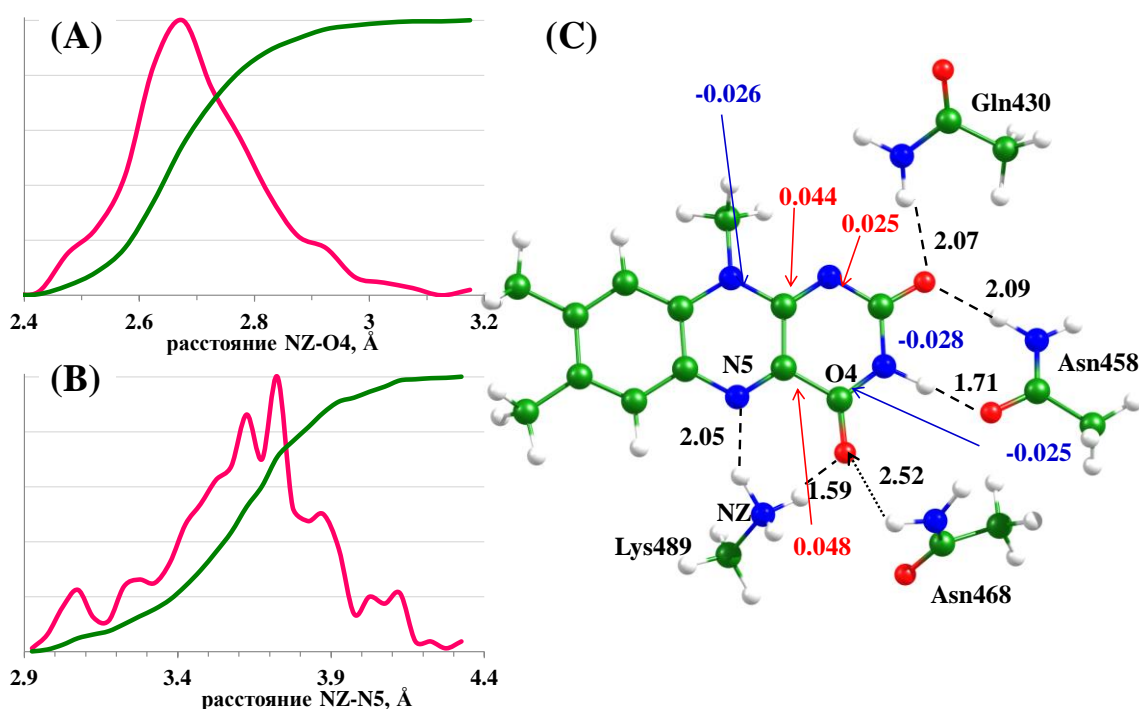


Рис. 4.33. Распределения длин водородных связей между лизином и флавином в *iLOV Q489K*, полученные по расчетам МД с КМ/ММ потенциалами (А,В). (С) Длины водородных связей (в Å) в равновесной геометрической конфигурации основного электронного состояния $S_{0,min}$ в *iLOV Q489K*, изменения в расстояниях (более 0.020 Å) при переходе $S_{0,min} \rightarrow S_{1,min}$ обозначены на рисунке красным и синим. Отрицательные значения соответствуют уменьшению расстояний в геометрии $S_{1,min}$.

Энергия вертикального перехода из равновесной геометрической конфигурации $S_{0,min}$, в соответствии с нашими ожиданиями, смещена в сторону больших длин волн по сравнению с исходным *iLOV*; величина $S_{0,min} \rightarrow S_1$ перехода составляет 500 нм. Рассчитанное значение для испускания $S_{1,min} \rightarrow S_0$ равно 583 нм, что практически на 100 нм смещено в красную область по сравнению с *iLOV*. Это дает возможность добавить новый цвет в палитру флуоресцентных белков на основе флавина.

Формы спектров были смоделированы путем введения Гауссова уширения к рассчитанным энергиям вертикального перехода и используя рассчитанные значения интенсивностей (рис. 4.34). Сплошная синяя линия соответствует суммарному спектру для двух полученных конформаций взятых с равными весами. Такой спектр немного сдвинут в красную область по сравнению со спектром *iLOV*-

Gln_{out} , однако в суммарном спектре также наблюдается один пик, что согласуется с данными о том, что плечо в экспериментальном спектре относится к колебательному спутнику.

Для рассматриваемых модельных систем также рассчитаны радиационные времена. Согласно экспериментальным данным время жизни флуоресценции составляет 5 нс, а квантовый выход 0.44, что дает значение радиационного времени 11.4 нс [205]. Полученная в данной работе величина превышает экспериментальное значение приблизительно в 2 раза и составляет 25.4 нс, что является удовлетворительным. Радиационное время рассчитанное для системы, состоящей из флавина и пяти молекул воды составляет 15.1 нс, что хорошо согласуется с экспериментальным значением 17.1 нс [206].

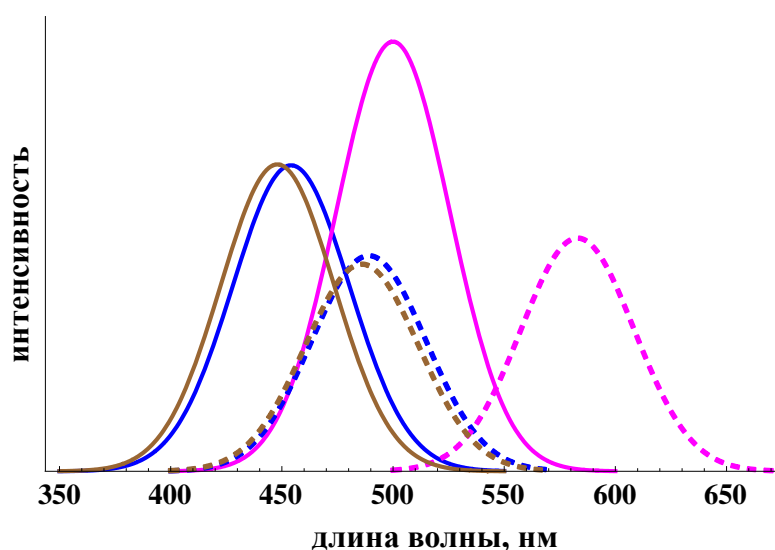


Рис. 4.34. Рассчитанные спектры поглощения (сплошными линиями) и флуоресценции (пунктирными линиями) для *iLOV* (синим), *iLOV-Gln_{out}* (коричневым) и *iLOV-Q489K* (малиновым).

4.5. Результаты главы 4

- Проведено соотнесение кристаллических структур с рецепторным и сигнальным состояниями BLUF домена белка AppA: в рецепторном состоянии боковая цепь глутамина находится в амидной форме, а в сигнальном – в имидной.
- Релаксация BLUF домена в результате фотореакции происходит в синглетном бирадикальном состоянии.

- Возвращение в рецепторное состояние BLUF домена проходит в результате протонирования боковой цепи глутамина с участием консервативного остатка гистидина.
- Передача сигнала от BLUF к EAL домену происходит между разными субъединицами.
- Мутация Q489K белка iLOV приводит к смещению спектра флуоресценции в красную область приблизительно на 90 нм.

Глава 5. FRET сенсоры на основе флуоресцентных белков: изучение и разработка улучшенных вариантов

Резонансно-индуктивный перенос энергии (FRET, Förster resonance energy transfer) – безызлучательный процесс, происходящий в том случае, если наблюдается перекрытие спектров флуоресценции донора и поглощения акцептора. При этом эффективность FRET падает с увеличением расстояния и пропорциональна $1/R^6$, где R – расстояние между донором и акцептором. Также эффективность резонансно-индуктивного переноса энергии зависит от взаимной ориентации донора и акцептора, а точнее, дипольного момента перехода $S_{1,\min} \rightarrow S_0$ донора и $S_{0,\min} \rightarrow S_1$ акцептора [207]. Эффективность FRET сенсора определяется выражением

$$E = \frac{k_T}{\tau_D^{-1} + k_T}$$

где τ_D – время жизни флуоресценции донора в отсутствие акцептора, а k_T – константа скорости резонансно-индуктивного переноса энергии. Константа скорости k_T зависит от индивидуальных параметров донора и акцептора: квантового выхода флуоресценции донора Q_D и коэффициента экстинкции акцептора, а также от интеграла перекрытия спектра поглощения акцептора и флуоресценции донора $J(\lambda)$, то есть от правильности подбора пары. Ещё одним фактором, влияющим на эффективность FRET, является взаимная ориентация донора и акцептора κ^2 , о чем подробнее речь пойдет в следующем разделе. Ниже представлено выражение, определяющее константу скорости FRET:

$$k_T = \frac{Q_D \kappa^2}{\tau_D R^6} \left(\frac{9000 (\ln 10)}{128 \pi^5 N_A n^4} \right) J(\lambda),$$

где N_A – число Авогадро, n – показатель преломления и π – число π .

FRET положен в основу работы многочисленных сенсоров, которые хорошо себя показали в изучении биологических объектов, в том числе в качестве маркеров в живых системах [208–217]. В частности, если внедрить специфическую последовательность в связующий пептид между донором и акцептором, такую, что её будет распознавать протеаза, можно регистрировать активность целевого фермента по интенсивности FRET. Наиболее распространёнными являются

системы, в которых как донор, так и акцептор являются флуоресцентными белками и об интенсивности FRET судят по соотношению интенсивностей флуоресценции донора и акцептора. Такой подход имеет недостаток, связанный с характерными для белковых систем широкими спектрами флуоресценции и зачастую наблюдаемым перекрыванием спектров в случае FRET пар. Этого можно избежать, если в качестве сигнала рассматривать отношение интенсивностей короткоживущей и долгоживущей компонент флуоресценции донора, а в качестве акцептора использовать хромопротеин.

Задачи молекулярного моделирования для таких систем можно сформулировать как интерпретацию наблюдаемых свойств FRET пар, так и разработку способов улучшения характеристик рассматриваемых систем. Если оставаться в рамках тех же компонентов FRET системы, то возможно создание интерфейса, способного правильно ориентировать молекулы донора и акцептора друг относительно друга, для этого предварительно необходимо проводить расчеты дипольных моментов перехода. Такие расчеты являются затратными, так как требуют поиска минимума на поверхности основного электронного состояния для молекулы акцептора, минимума на поверхности возбужденного электронного состояния для молекулы донора и оценки дипольных моментов перехода. Другой подход связан с оптимизацией структуры связующего пептида, предполагающий молекулярно-динамические расчёты для определения конформационной подвижности. Сами по себе такие расчеты менее затратны с точки зрения ресурсов, однако ввиду того, что требуется проанализировать множество различных структур связывающих пептидов, вычислительные затраты становятся значительными, что также требует привлечения суперкомпьютеров.

В данном разделе обсуждаются результаты изучения FRET сенсора на каспазу-3 на основе флуоресцентного белка TagRFP и хромопротеина KFP. К моменту начала работы был экспериментально изучен сенсор, состоящий из этих двух белков, соединенных гибким связующим пептидом (линкером), в состав которого входил аминокислотный мотив DEVD, специфически распознаваемый каспазой-3 [217]. Также рассматривается другой сенсор на каспазу-3 и фотохимические свойства индивидуальных компонентов FRET систем.

5.1. Ориентационные факторы компонентов FRET сенсоров

Общая формула для определения ориентационного фактора κ^2 выглядит следующим образом:

$$\kappa^2 = [\mathbf{d} \cdot \mathbf{a} - 3 (\mathbf{d} \cdot \mathbf{r}_{da})(\mathbf{a} \cdot \mathbf{r}_{da})]^2$$

где \mathbf{d} – вектор дипольного момента перехода $S_{1,\min} \rightarrow S_0$ донора, \mathbf{a} – вектор дипольного момента перехода $S_{0,\min} \rightarrow S_1$ акцептора и \mathbf{r}_{da} – радиус-вектор между хромофорами. Значение κ^2 может менять в пределах от 0 до 4, а в приближении свободно вращающихся донора и акцептора используется значение 2/3. Зачастую этого приближения оказывается достаточно, однако если происходит образование комплексов донора с акцептором, то неправильный учет ориентационного фактора может оказать значительное влияние.

В данном разделе будут рассмотрены ориентационные факторы белков TagRFP [218,219] и KFP [220–222] из изучаемого FRET сенсора, а также двух представителей семейства GFP-подобных белков – GFP (точнее его улучшенному варианту EGFP, однако в литературе на сегодняшний день принято понимать под GFP его EGFP форму) и KillerRed, хромофорные группы которых показаны на рисунке 5.1. Хромофорная группа GFP находится в *цис* форме, а TagRFP и KFP – в *транс* форме, также как и в белковых матрицах.

Равновесные геометрические параметры для выбранных систем на поверхности основного электронного состояния определялись в рамках метода DFT с гибридным функционалом PBE0 и базисом cc-pvdz. Минимумы на поверхности S_1 локализовывались в рамках многоконfigurационных методов: метода конфигурационного взаимодействия с однократными возбуждениями (CIS) и многоконfigurационного метода самосогласованного поля в полном пространстве активных орбиталей (CASSCF)[223,224].

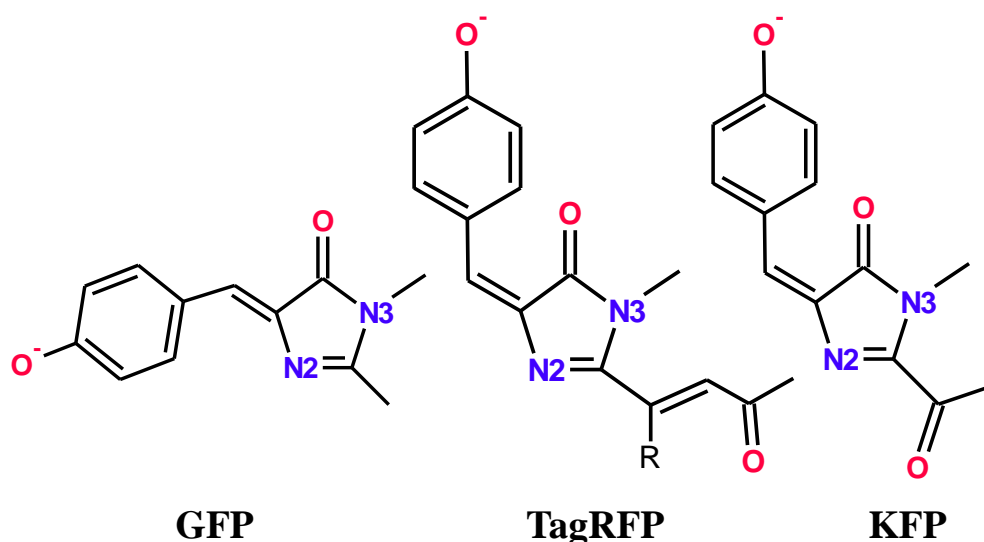


Рис. 5.1. Структуры хромофорных групп белков GFP, TagRFP и KFP.

5.1.1. Структура и свойства TagRFP

В качестве стартовой структуры для построения КМ/ММ модели белка TagRFP использовалась кристаллическая структура PDB ID: 3M22 [219], при этом квантовая подсистема состояла из хромофора, боковых цепей Arg67, Arg92, Asn143, Glu145, Ser158, His197 и Glu215, а также двух молекул воды хромофор-содержащей области. Также для сравнения проводились расчеты в молекулярном кластере размером 326 атомов в основном электронном состоянии, включавшем хромофор, боковые цепи аминокислотных остатков Leu13, Gln39, Ala59 Thr60, Ser61, Phe62, Ser66, Arg67, Arg92, Gln106, Tyr117, Asn143, Glu145, Ser158, Met160, Phe174, His197, Leu199, Gln213 и Glu215, а также 11 молекул воды для насыщения водородных связей на границах кластера; в процессе оптимизации геометрических параметров тяжелые атомы терминальных групп фиксировались. Равновесные геометрические конфигурации, полученные в рамках таких приближений, показали хорошее согласие между собой и с данными PCA (рис. 5.2). Важно отметить, что влияние белкового окружения приводит к отклонению конфигурации хромофора от планарной.

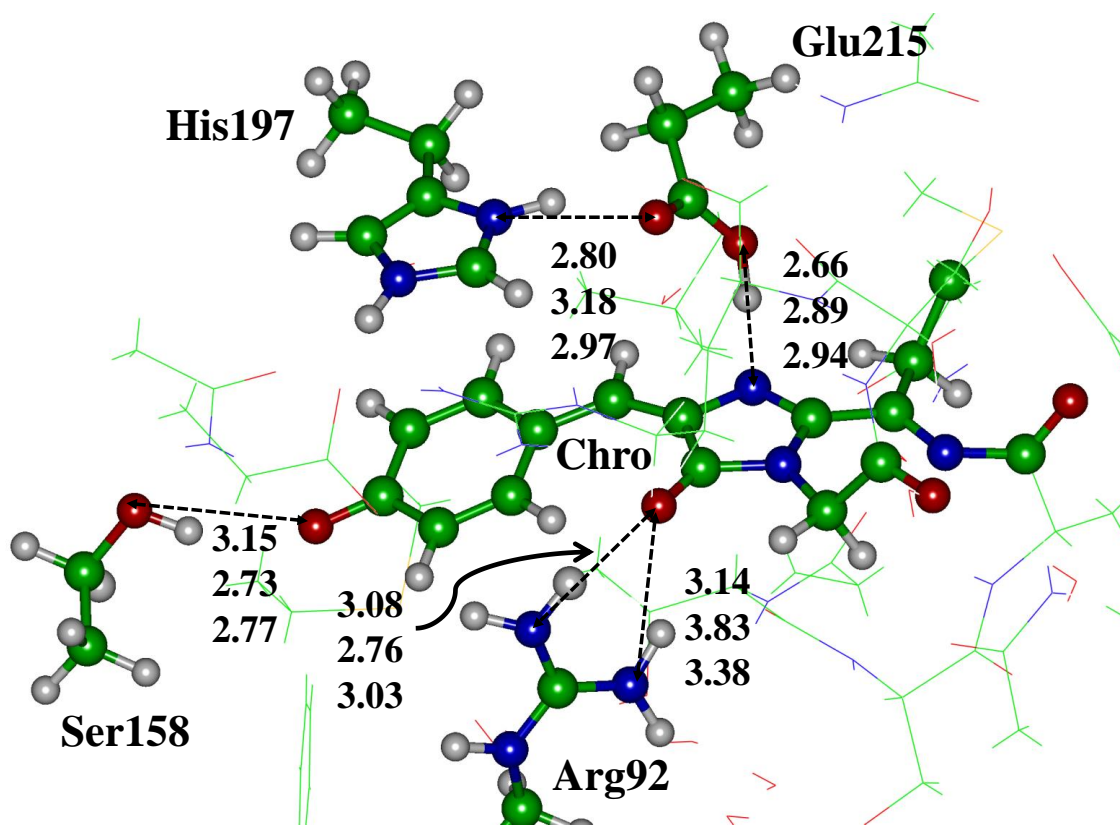


Рис. 5.2. Равновесная геометрическая конфигурация основного электронного состояния фрагмента хромофор-содержащей области TagRFP. Ключевые расстояния показаны в Å. Верхнее значение получено в молекулярном кластере, среднее – методом КМ/ММ, а нижнее по данным PCA.

На поверхности возбужденного электронного состояния минимумы были найдены двумя различными способами: методом CIS и CASSCF(6/6), используя в качестве стартового приближения равновесные геометрические конфигурации молекулярного кластера и КМ подсистему КМ/ММ модели, соответственно.

Поскольку для GFP-подобных хромофоров в анионной форме полуэмпирический метод ZINDO [225] даёт неплохую количественную оценку [226–230], а целью было определение дипольных моментов перехода, то этот метод и был выбран для расчетов.

Экспериментальное значение максимума полосы поглощения TagRFP составляет 555 нм (2.23 эВ) [218,219]. Результаты расчетов в молекулярных кластерах показывают значения 551 нм (2.25 эВ) для кластерной модели и 515 нм (2.41 эВ) для КМ/ММ модели. Экспериментальное значение максимума полосы флуоресценции составляет 548 нм (2.12 эВ) [218,219], а соответствующие значения для вертикальных энергий перехода $S_{1,\min} \rightarrow S_0$ 559 нм (2.21 эВ) при

расчете равновесной геометрической конфигурации методом CIS и 565 нм (2.19 эВ) при расчете методом CASSCF(6/6).

На рисунке 5.3 показаны дипольные моменты переходов для хромофора TagRFP $S_{0,\min} \rightarrow S_1$ и $S_{1,\min} \rightarrow S_0$; в обоих случаях их направления могут быть графически представлены как направления между атомами O и N3. Согласно экспериментальным данным дипольные моменты переходов $S_{0,\min} \rightarrow S_1$ и $S_{1,\min} \rightarrow S_0$ в GFP подобных флуоресцентных белках коллинеарны, что подтверждает полученный результат [231].

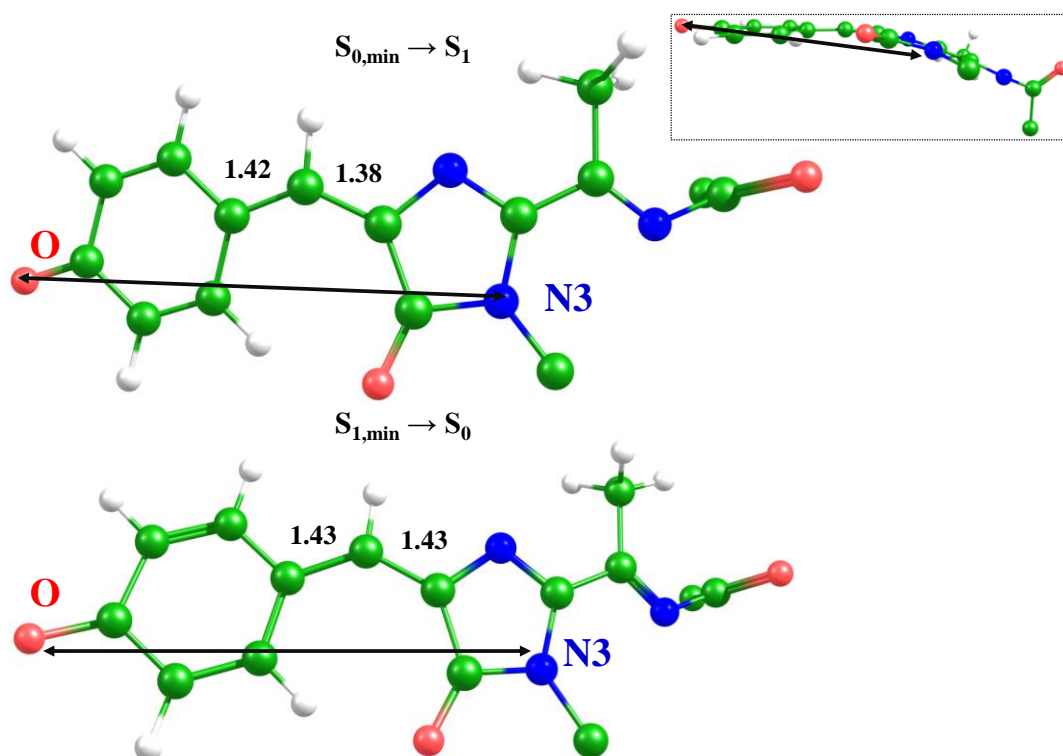


Рис. 5.3. Дипольные моменты перехода в хромофоре TagRFP. Верхняя часть соответствует переходу из минимума на поверхности S_0 , $S_{0,\min} \rightarrow S_1$ переход; нижняя часть соответствует переходу из минимума на поверхности S_1 , $S_{1,\min} \rightarrow S_0$ переход. Расстояния (в Å) показывают длины связей в мостиковом фрагменте. Стрелками показаны дипольные моменты перехода, направленные между атомами O и N3. Вставка справа сверху показывает существенное отклонение от планарности хромофора.

В теоретической работе [232] были представлены результаты расчётов для ряда GFP-подобных хромофоров в газовой фазе, дипольные моменты перехода направлены между двумя наиболее удаленными атомами сопряженной π -системы. Это отличается от данных наших расчётов, поскольку наиболее удаленными являются атомы кислорода (рис. 5.1). Возможно, такие отличия связаны с тем, в работе рассматривались хромофоры в *цис* форме, в то время как в данном случае хромофор TagRFP находится в *транс* форме.

5.1.2. Структуры и спектры поглощения KFP и GFP

Модельная система хромопротеина KFP для расчетов методом КМ/ММ была получена из кристаллической структуры PDB ID: 1XQM [221]. КМ подсистема состояла из хромофора и ближайших остатков: боковые цепи Lys67, Arg92, Glu145, Ser158, His197, Glu215 и молекул воды активного центра и описывалась методом DFT с функционалом PBE0 и базисом cc-pvdz. ММ подсистема описывалась с помощью силового поля AMBER.

На рисунке 5.4 показана равновесная геометрическая конфигурация минимума на поверхности основного электронного состояния, соответствующего *транс* форме хромофора KFP. Дипольный момент перехода $S_{0,\min} \rightarrow S_1$ ориентирован аналогичным образом с TagRFP.

Экспериментальное значение максимума полосы поглощения KFP составляет 568 нм (2.18 эВ) [220]. Рассчитанное значение вертикальной энергии $S_{0,\min} \rightarrow S_1$ перехода составляет 535 нм (2.31 эВ). Дипольный момент перехода показан на рис. 5.4 и направлен аналогично TagRFP.

Также был рассчитан дипольный момент перехода для GFP из равновесной геометрической конфигурации, полученной в работе [233] (рис. 5.5). В этом случае можно провести прямое сравнение с результатами работы [232], в которой в качестве направления дипольного момента перехода предлагается вектор, составляющий 70° градусов со связью C2=O2. В данной работе было получено направление дипольного момента перехода как вектор, соединяющий атомы O и N3 аналогично предыдущим системам.

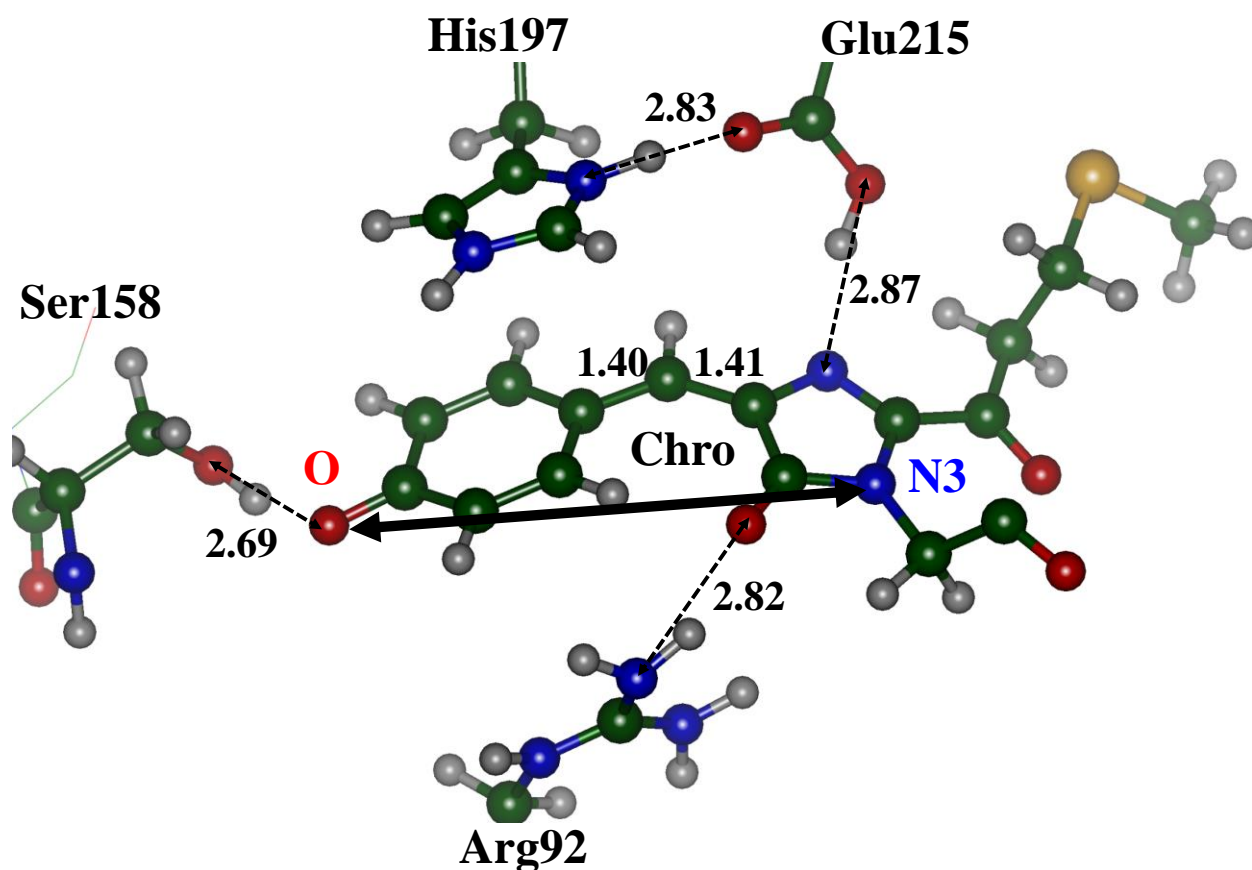


Рис. 5.4. Равновесная геометрическая конфигурация основного электронного состояния фрагмента хромофор-содержащей области KFP. Ключевые расстояния показаны в Å. Двойной стрелкой показан дипольный момент перехода $S_{0,min} \rightarrow S_1$.

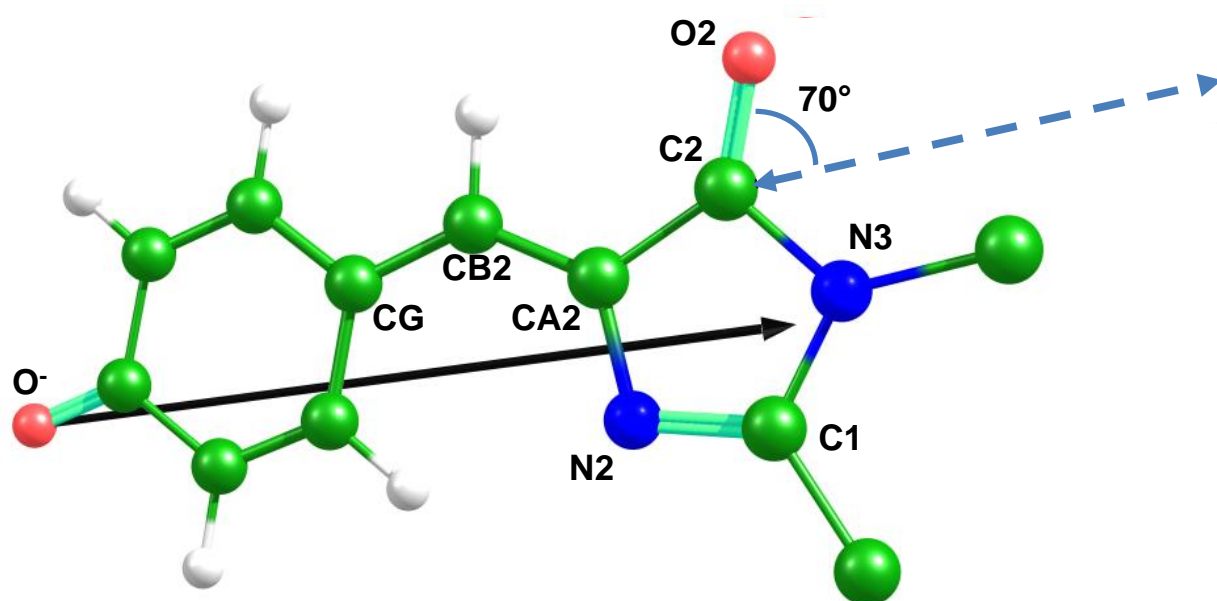


Рис. 5.5. Дипольный момент перехода для анионной формы хромофора GFP, полученный в данной работе (черная жирная линия) и в работе [232] (голубым пунктиром).

5.1.3. Ориентационные факторы в системе TagRFP-L23-KFP

В данном разделе показано как влияет ориентационный фактор на эффективность FRET на примере конкретной системы, изученной экспериментально. FRET сенсор TagRFP-L23-KFP состоит из флуоресцентного белка TagRFP и хромопротеина KFP, соединенных гибким связующим олигопептидом, обозначенным как L23. Последний состоит из 23 аминокислотных остатков, среди которых последовательность DEVD, специфически распознаваемая ферментом каспазой-3. Особенностью этой системы является то, что акцепторы образуют тетрамерную структуру, а доноры находятся на периферии системы. Исходя из экспериментальных данных по распределениям времен жизни для донора, можно сделать вывод о том, что в этом конкретном сенсоре доноры преимущественно находятся на некотором удалении относительно акцепторов, что контролируется конформационным набором связующего пептида. Методом белок-белкового докинга была получена наиболее вероятная структура, образующаяся в случае слипания донора с тетрамером акцепторов (рис. 5.6). Для такой структуры на основании данных об ориентационных факторах и взаимном расположении донора и акцепторов, а также расстояний между ними, были рассчитаны константы скоростей резонансно-индуктивного переноса энергии (таблица 5.1). Поскольку в системе содержится четыре акцепторов, образующих тетрамер, то для определения эффективности FRET необходимо учитывать все возможные каналы безызлучательного переноса энергии, то есть рассматривать все возможные параллельные процессы с соответствующими константами скоростей $k_{DA,i}$ ($i=1\div 4$) и $1/\tau_D$. Тогда общая эффективность FRET определяется по формуле

$$E = \frac{\sum_{i=1}^4 k_{DA,i}}{\sum_{i=1}^4 k_{DA,i} + 1/\tau_D}$$

Подстановка рассчитанных констант скоростей переноса энергии, полученных для всех пар донора с акцепторами, и времени жизни флуоресценции донора в отсутствие акцептора $\tau_D=2.4$ нс приводит к значению $E=86\%$. Полученное значение достаточно высокое несмотря на то, что в данной конкретной структуре рассчитанные значения ориентационных факторов не очень большие. Это говорит о том, что данная пара является очень удачной для образования FRET пар, а также о возможности модификации структуры поверхности одного из белков для

связывания в более выгодной конформации. Также таблица 5.1. демонстрирует, что правильный учет ориентационного фактора в случае наличия стабильного конформера является важным [234].

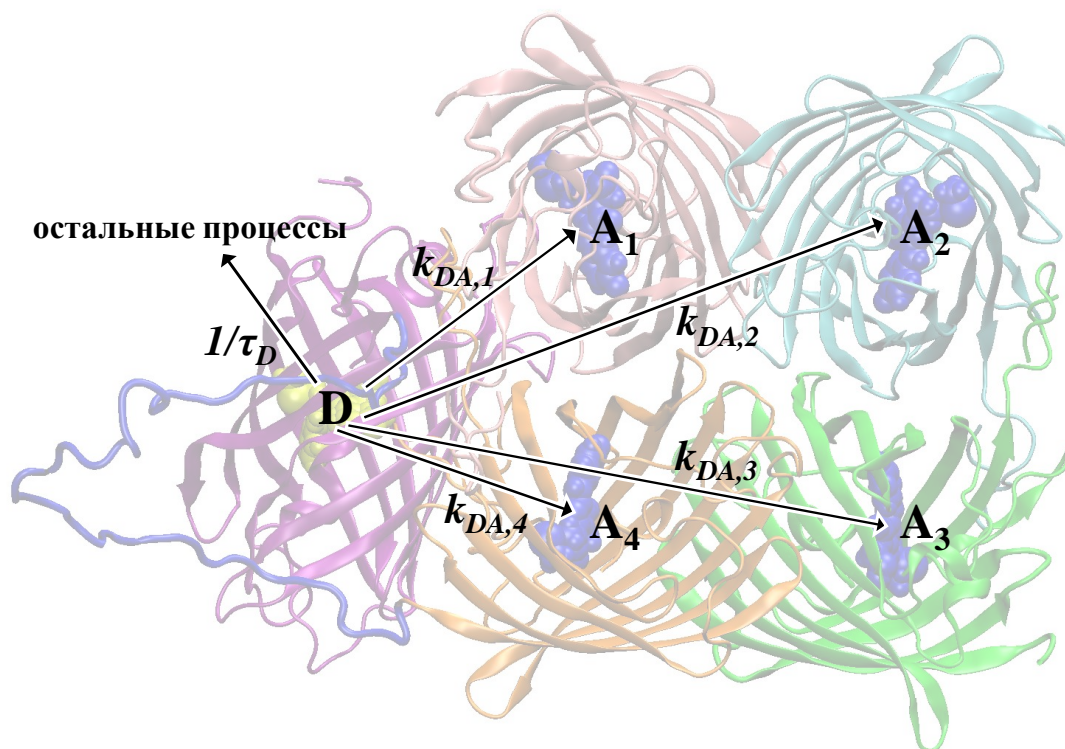


Рис. 5.6. Структура тетрамерного комплекса TagRFP-L23-KFP. Стрелками показаны возможные направления процесса. A_1 - A_4 – мономеры акцептора, D – донор, а $k_{DA,1}$ - $k_{DA,4}$ – соответствующие им константы скоростей FRET.

Таблица 5.1. Расстояния между донором и акцепторами (R), рассчитанные значения ориентационных факторов (κ^2) и соответствующие константы скоростей ($k_{DA,i}$) для системы, показанной на рис. 5.6.

Параметр	D- A_1	D- A_2	D- A_3	D- A_4
R , Å	38.5	63.1	57.8	37.7
κ^2	0.89	0.62	0.02	0.06
$k_{DA, i}$, нс ⁻¹	2.33	0.09	< 0.01	0.20

5.1.4. Влияние ориентационного фактора в димере KillerRed

Интерес к белку KillerRed обусловлен его фотоиндуцированной цитотоксичностью [235]. В частности, заслуживает внимания работа [236], в которой обсуждается мутантная форма Val44Ala этого белка. Данный белок находится в димерной форме и в случае, если в одном из мономеров хромофор

находится в анионной зеленой форме, а другой в нейтральной синей, наблюдается FRET между ними. Авторы связывают это с необычной взаимной ориентацией мономеров в этом димере по сравнению с другим подобными белками (рис. 5.7).

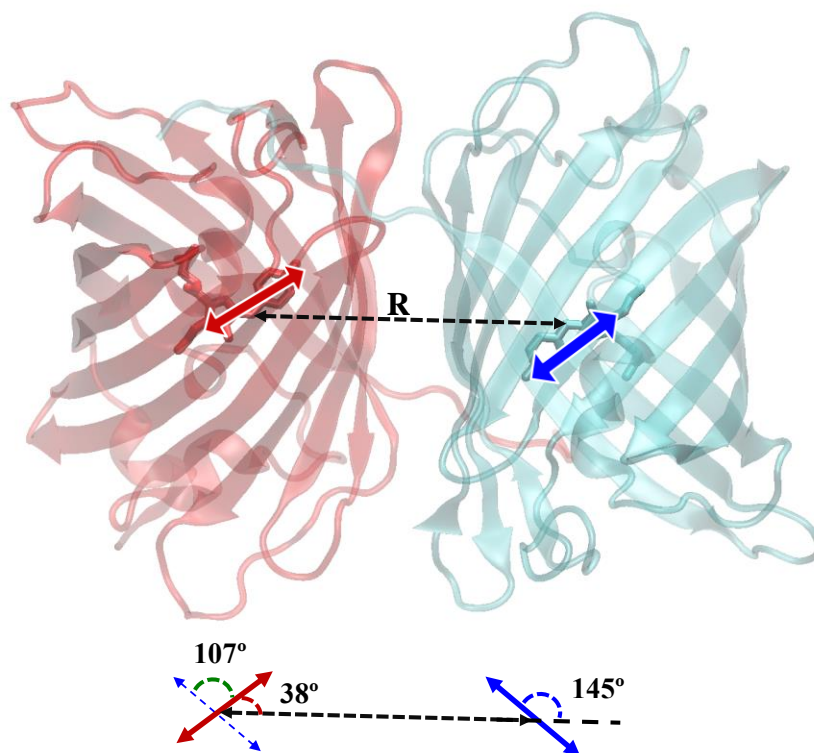


Рис. 5.7. Димерная структура мутантной формы белка *KillerRed Val44Ala*, полученная по данным PCA, PDB ID: 4B30 [236]. Дипольные моменты перехода обозначены сплошными стрелками, пунктиром показано направление между хромофорами. В нижней части показаны углы между соответствующими векторами.

Мы применили предложенное нами правило по определению дипольного момента перехода как вектора, соединяющего атомы O и N3. В этом приближении был рассчитан ориентационный фактор, который составил 2.6, что значительно превышает величину 2/3, применяемую в оценочных расчетах. Большое значение ориентационного фактора вместе с коротким расстоянием приводят к большой величине эффективности FRET, что и объясняет наблюдаемое в эксперименте.

5.2. Оптимизация структуры связующего пептида

В изучаемом FRET сенсоре связующий пептид состоял из гибких фрагментов серинов и глицинов и включал мотив DEVD, специфически распознаваемый каспазой-3. Анализ экспериментальных распределений по временам жизни донора в присутствии акцептора показывал, что

преимущественными являются конформации, в которых донор и акцептор находятся далеко друг от друга. Для улучшения свойств сенсора был выбран подход, основанный на выборе оптимальной структуры связующего пептида, обеспечивающего распределение расстояний между донором и акцептором сдвинутое в сторону меньших значений. Для лучшего сканирования конформационного пространства связующего пептида сенсора рассматривались модельные системы, в которые включался только олигопептид без белков донора и акцептора. Такие расчеты заметно ускоряют процесс, при этом позволяют описывать поведение олигопептида в растворе. Характерные длины траекторий составляли 50 нс [237].

На рис. 5.8 представлена типичная модельная система, состоящая из олигопептида в линейной конформации в прямоугольном параллелепипеде из молекул воды и содержащем анионы хлора и катионы натрия. Среди олигопептидов для которых проводились расчеты наилучшим оказался Gly-Leu-Leu-Leu-Gly-Pro-Gly-Gly-Asp-Glu-Val-Asp-Gly-Pro-Gly-Gly-Leu-Val-Leu-Val-Ala (далее в тексте M4), показанный на рис. 5.9. Особенностью его структуры является то, что гидрофобные фрагменты имеют тенденцию к слипанию, аминокислотные остатки пролина обеспечивают петлеобразную структуру, а фрагмент, распознаваемый ферментом, обращен в раствор.

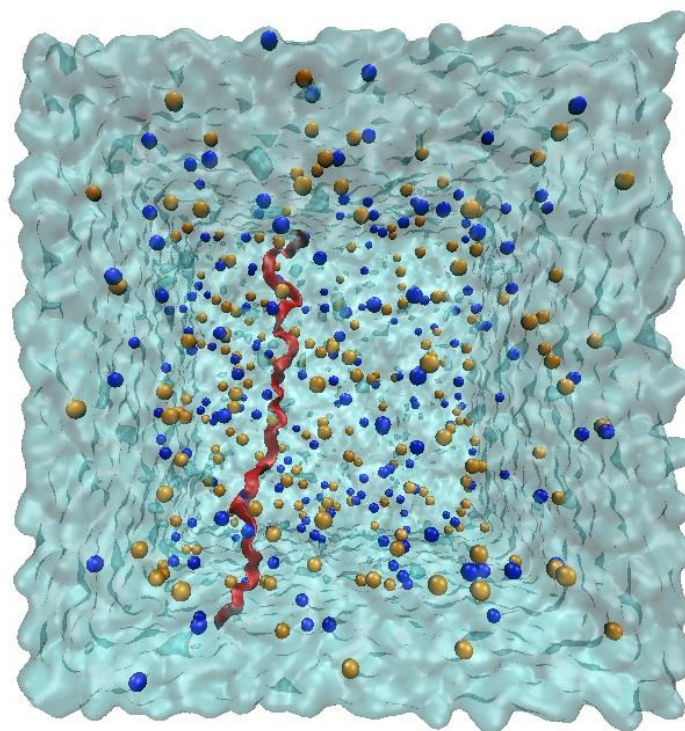


Рис. 5.8. Модельная система, использованная для молекулярно-динамических расчетов. Красным показан олигопептид, желтыми и синими шарами показаны ионы натрия и хлора, соответственно.

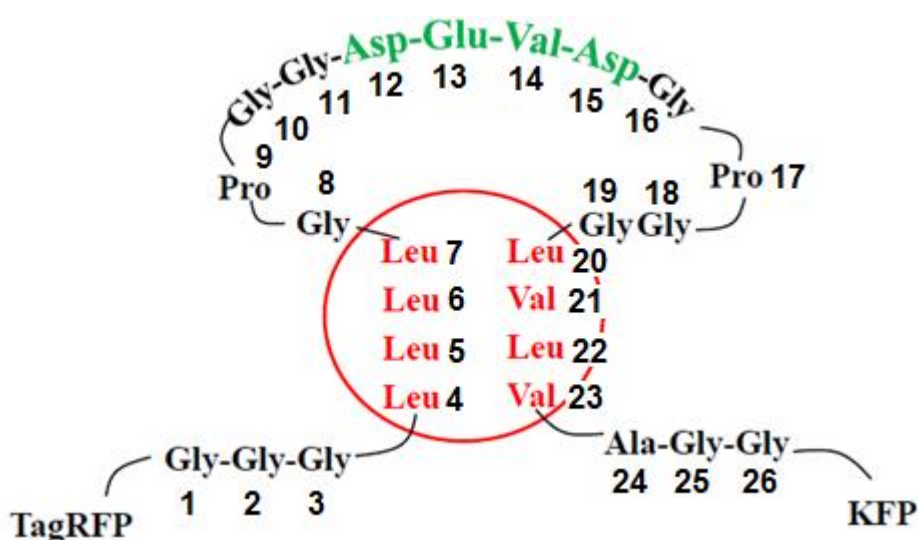


Рис. 5.9. Структура сенсора TagRFP-M4-KFP. Красным выделена гидрофобная область линкера, зеленым – специфический мотив, распознаваемый каспазой-3.

Экспериментальная проверка проводилась в лаборатории проф. А.П. Савицкого (ФИЦ Биотехнологии РАН). В результате синтеза нового сенсора также был получен ещё один сенсор, содержащий случайную точечную мутацию Gly18Asp (рис. 5.9, далее в тексте будет фигурировать как TagRFP-M4D-KFP). Для

олигопептида, моделирующего связывающий пептид с мутацией, также был проведен молекулярно-динамический расчет, описывающий конформационную подвижность.

На рис. 5.10 показаны распределения по расстояниям, а также по временам жизни, полученные для FRET систем с исходным линкером L23, предложенным линкером M4 и линкером, содержащим случайную мутацию Gly18Asp M4D. Видно, что в случае гибкого линкера L23 распределение по расстояниям широкое и преимущественно характеризует структуры с развернутыми конформациями связующего олигопептида. Для предложенного олигопептида M4 характерно распределение сдвинутое в сторону меньших расстояний, что приводит к смещению распределения по временам жизни в сторону меньших значений. Важно отметить, что одна точечная мутация в M4 на отрицательно заряженный аспартат приводит к заметным изменениям. Таким образом, можно судить о чувствительности выбранного метода.

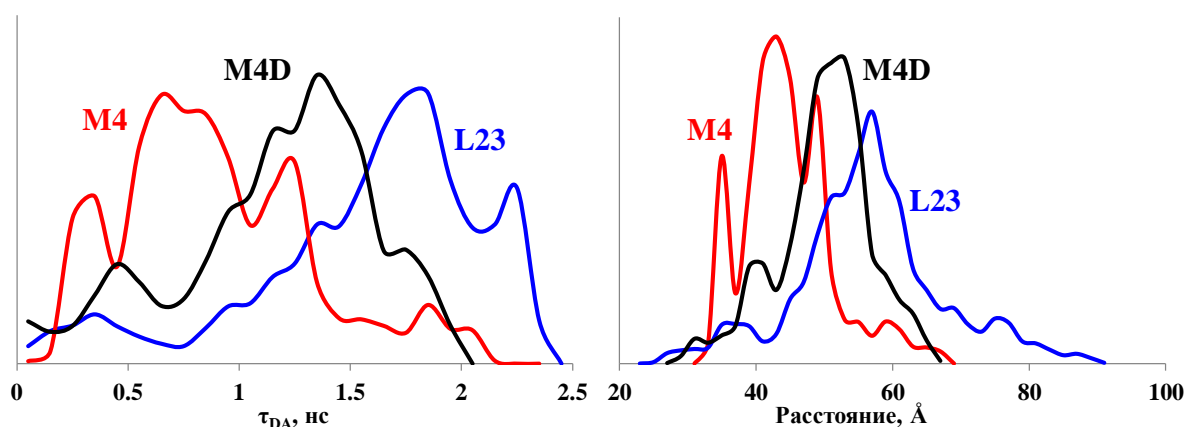


Рис. 5.10. Распределения по временам жизни слева и расстояниям справа. Синим, красным и черным показаны системы, содержащие олигопептиды L23, M4 и M4D, соответственно.

Экспериментальные данные полностью подтвердили теоретические результаты. Оказалось, что в новом сенсоре TagRFP-M4-KFP присутствует значительный вклад короткоживущей компоненты в распределении по временам жизни. В таблице 5.2 суммируются данные по разработанному сенсору. Видно, что для данного сенсора возможно разложение распределений по временам жизни на две экспоненты с временами 1.1 и 2.3 нс. При этом в контрольном образце, где сенсор не расщеплен, амплитуды короткоживущей и долгоживущей компонент

практически равны, в то время как в гидролизованном образце соотношение уменьшается до 0.18.

Таблица 5.2. Характеристики сенсора TagRFP-M4-KFP.

	Контрольный образец	Гидролизированный сенсор
τ_1 , нс	1.1	1.1
Амплитуда A_1	560	445
τ_2 , нс	2.3	2.3
Амплитуда A_2	676	2441
отношение амплитуд A_1/A_2	0.82	0.18

Таким образом, предложенный подход хорошо показал себя для рационального дизайна связующего олигопептида для FRET сенсора.

5.3. Изучение характеристик FRET сенсора с тербий-связывающим пептидом

Расчеты, аналогичные представленным в предыдущем разделе, были проведены для другого сенсора на каспазу-3, состоящего из тербий-связывающего пептида (ТВР) и красного флуоресцентного белка TagRFP. В результате возбуждения триптофана ТВР происходит перенос энергии на Tb^{3+} , после чего энергия переходит на акцептор TagRFP. Флуоресценция свободного TagRFP происходит на наносекундной шкале времени, в то время как флуоресценция, вызванная резонансно-индуктивным переносом энергии, характеризуется временами порядка микросекунд.

Для изучения конформационной подвижности связующего пептида были проведены молекулярно-динамические расчеты с длинами траекторий 200 нс. Выбранный олигопептид является гибким, что отражается в широком распределении по расстояниям (рис. 5.12). Среднее значение времени жизни флуоресценции составляет 0.19 мкс, что хорошо согласуется с экспериментальным значением. Эффективность FRET, рассчитанная как значение, усредненное по всем кадрам траектории составляет 43%, что согласуется с экспериментальным значением 44% [238].

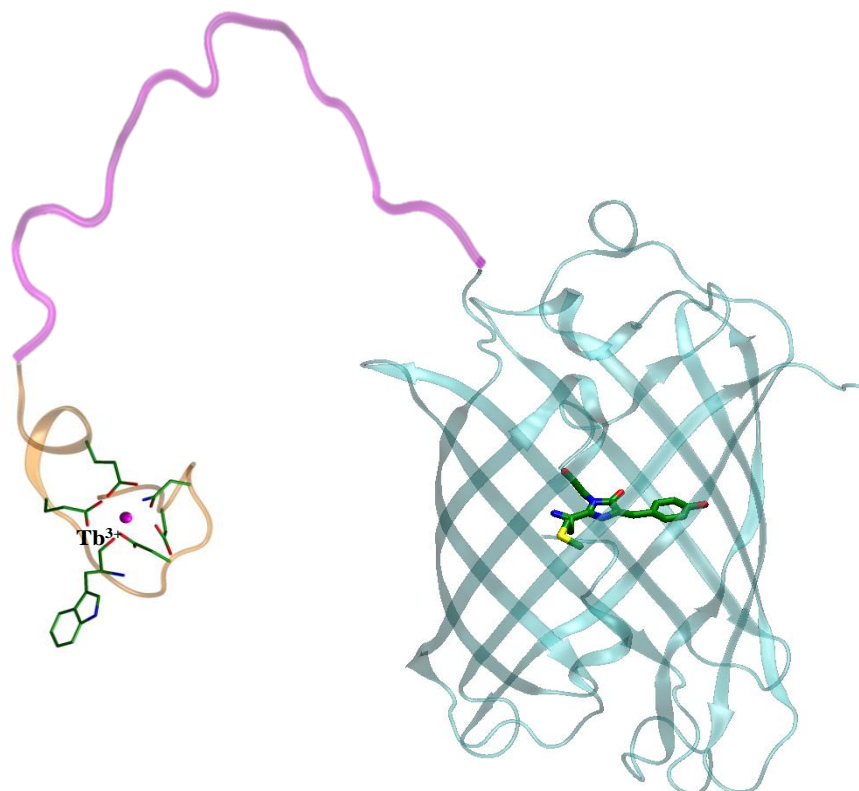


Рис. 5.11. Трехмерная структура сенсора на основе тербий-связывающего пептида и флуоресцентного белка TagRFP.

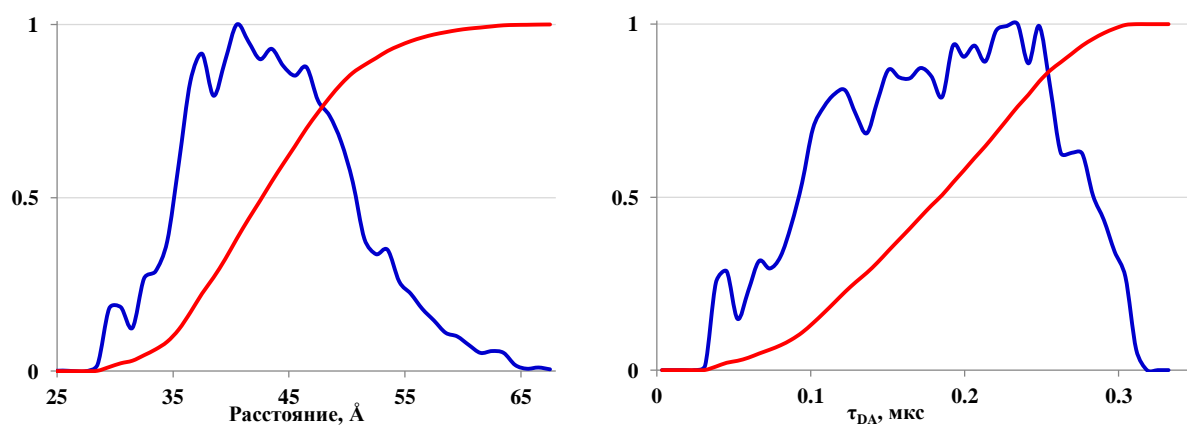


Рис. 5.12. Распределения по расстояниям между донором и акцептором (слева) и распределения по временам жизни флуоресценции (справа).

5.4. Изомеризация хромофора в хромопротеинах KFP и asFP595

Хромопротеин asFP595 и его мутантная форма A143G KFP являются одними из первых фотопереключаемых флуоресцентных белков, для которых был предложен механизм *цис-транс* изомеризации хромофора (рис. 5.13), лежащий в основе фотопереключения [220,239]. До облучения хромопротеин находится в выключенном состоянии, однако при облучении интенсивным зеленым лазером переходит во включенное флуоресцирующее состояние. Облучение синим светом приводит к возвращению системы обратно в нефлуоресцирующее состояние. Также возвращение в выключенное состояние происходит самопроизвольно с течением времени [239–242]. *Цис-транс* изомеризация, как процесс, лежащий в основе фотопереключения, был также предложен для других флуоресцентных белков, таких как Dronpa, Padron, HcRed [243–257]. Из-за важности данного процесса существует множество теоретических работ, в которых проводится изучение изомеризации GFP-подобных хромофоров в газовой фазе [209,240,258–270]. Также существуют работы, описывающие изомеризацию хромофоров в белке в рамках классических подходов [240,261]. Единственная работа, в которой применялся метод КМ/ММ, описывает *транс-цис* изомеризацию хромофора красного флуоресцентного белка HcRed [254]. Для оптимизации геометрических параметров КМ часть описывалась методом DFTB, являющимся упрощенным вариантом метода DFT, в котором добавлены эмпирические параметры для ускорения расчетов, ММ подсистема описывалась в рамках классического силового поля CHARMM. Энергии в стационарных точках пересчитывались методом КМ/ММ с описанием КМ подсистемы методом DFT с гибридным функционалом B3LYP. По результатам расчетов *транс* изомер оказался на 6 или 12 ккал/моль выше, чем *цис* изомер, а барьеры реакции составили 40 или 60 ккал/моль (в зависимости от протокола расчета). Поскольку авторы работы получили крайне высокие значения барьера изомеризации, ими был сделан вывод о том, что две конформации хромофора формируются в процессе созревания белка и не могут переходить друг в друга.

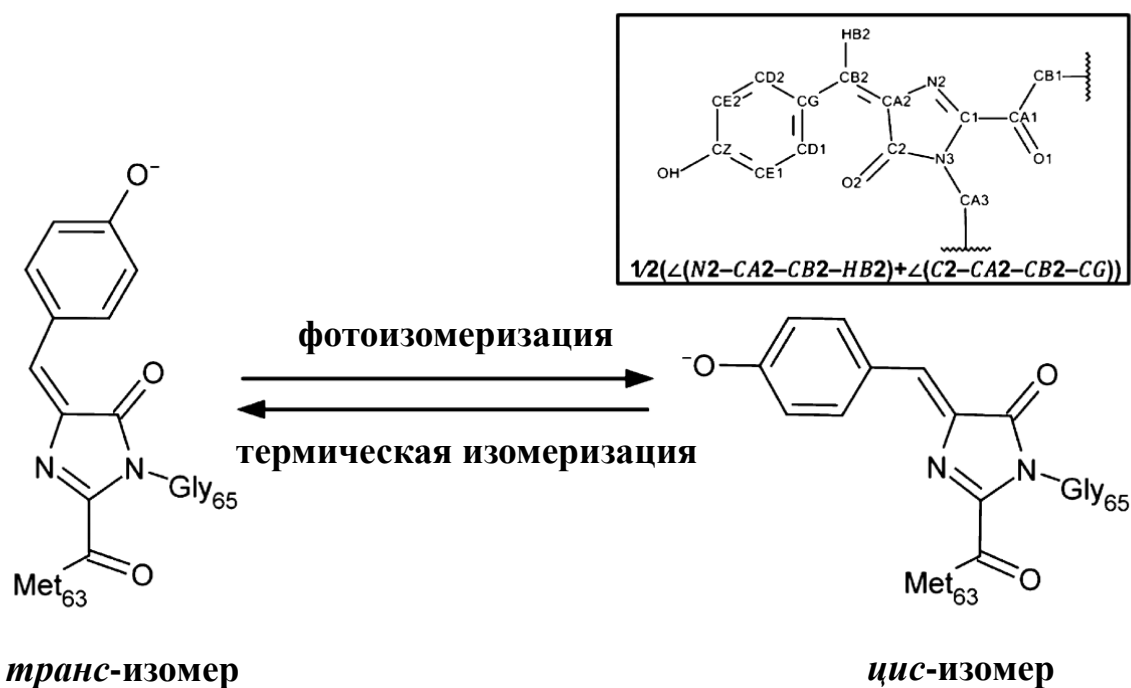


Рис. 5.13. Транс- и цис- изомеры хромофора белка *asFP595* (или *KFP*). Во вставке показаны двугранные углы, которые использовались в качестве координаты реакции при моделировании.

В данной работе проводился расчет методом молекулярной динамики с КМ/ММ потенциалами с последующим расчетом профиля свободной энергии методом зонтичной выборки [271,272], комбинированным с методом взвешенных гистограмм [273]. В качестве координаты реакции выбиралась полусумма двугранных углов, показанная на врезке рисунка 5.13. Квантово-механическая система описывалась методом функционала электронной плотности с функционалом BLYP и комбинированным базисом гауссовых функций и плоских волн с псевдопотенциалами QZV2P и включала в себя хромофор, Lys67, Arg92, Glu145, Ser158, Glu195, His197, Glu215 и несколько молекул воды активного центра. Классическая подсистема, включавшая остальную часть белка, а также молекулы воды, образующие ячейку $60 \times 70 \times 60 \text{ \AA}^3$, описывалась в рамках силового поля CHARMM. Моделирование проводилось при 300 К с термостатом CSVР для предварительных расчетов и Носе-Гувера для расчетов свойств [274].

На рис. 5.14 показаны рассчитанные профили свободной энергии для нейтральной и анионной форм (протонированный и депротонированный кислород фенильного фрагмента хромофора, рис. 5.13) хромофора белка *asFP595* и анионной формы хромофора *KFP*. В таблице 5.3 приведены количественные оценки для

изучаемых процессов. Для анионной формы asFP595, согласно расчетам, изомеризация хромофора происходит в 20 раз быстрее, чем в случае белка KFP, что согласуется с экспериментальными наблюдениями. Это связано с тем, что в asFP595 в активном центре находится меньший по размеру остаток Gly143, что облегчает изомеризацию. В KFP его позицию занимает больший по размеру остаток аланина. В случае, когда хромофор находится в нейтральной форме, барьер реакции настолько высок, что делает невозможным протекание этой реакции; такое наблюдается экспериментально при низких значениях pH [241].

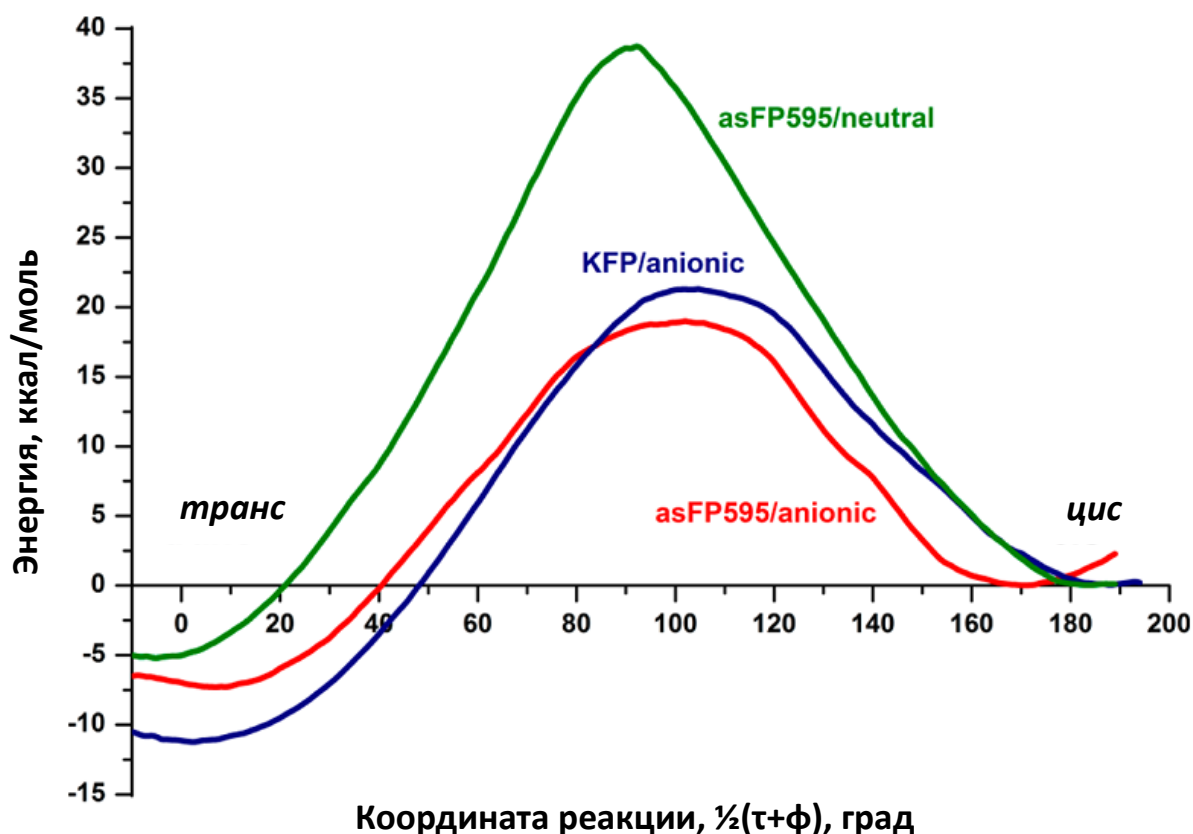


Рис. 5.14. Профили свободной энергии изомеризации хромофора в анионной (красным) и нейтральной (зеленым) формах в белке asFP595 и анионной форме белка KFP (синим).

Таблица 5.3. Разности энергий Гельмгольца цис- и транс- конформаций $\Delta F(\psi-t)$, соответствующие им константы равновесия K_c , энергии активации $\Delta F^\ddagger(\psi-t)$ и рассчитанные по ТАК константы скорости k и времена полупревращения $\tau_{1/2}$. Экспериментальные значения $\tau_{1/2}$ (эксп.) взяты из работы [220]. В названии модельной системы минус в скобках соответствует анионной форме хромофора, а 0 – нейтральной.

Модельная система	$\Delta F(\psi-t)$, ккал/моль	K_c	$\Delta F^\ddagger(\psi-t)$, ккал/моль	$k, \text{с}^{-1}$	$\tau_{1/2}, \text{с}$	$\tau_{1/2}$ (эксп.), с
asFP595(-)	7.3	$4.7 \cdot 10^{-6}$	19.0	$8.7 \cdot 10^{-2}$	8	7
KFP(-)	11.8	$2.5 \cdot 10^{-9}$	20.7	$4.7 \cdot 10^{-3}$	148	~50
asFP595(0)	5.2	$1.6 \cdot 10^{-4}$	38.8	$3.5 \cdot 10^{-16}$	$2.0 \cdot 10^{15}$	нет данных

Таким образом, дана интерпретация термической деактивации флуоресцирующих состояний белков asFP595 и KFP. Показано, что изомеризация происходит с анионной формой хромофора.

5.5. Фотостабильность хромофора в зеленом флуоресцентном белке

Принцип функционирования хромофора зеленого флуоресцентного белка GFP (рис. 5.15) связан с образованием различных протонированных форм хромофора, отличающихся по своим фотофизическим свойствам [214,275,276]. Особенности фотофизических свойств GFP обуславливают его широкое применение в биотехнологии и различных отраслях наук о живом. До недавнего времени основой интерес проявлялся к флуоресцентным свойствам GFP в связи с возможностью их использования в качестве биомаркеров в живых системах [214,275,276]. Множество работ направлено на изучение возможности улучшения свойств GFP для более эффективного практического применения. Зеленый флуоресцентный белок также успешно применяется в качестве компонента FRET пар при создании сенсоров. Генетически кодируемые сенсоры нашли широкое применение для определения каталитической активности ферментов в живых клетках и тканях (что уже обсуждалось выше). При этом особенностью таких объектов является то, что в клетках возможно наличие различных окислителей и восстановителей, а также, в целом, наблюдаться разное значение Red-Ox потенциала. Поэтому одно из последних исследований посвящено

возможности проявления фотоиндуцированных электронодонорных свойств хромофором GFP [277]. Суть эксперимента заключается в том, что в раствор белка помещаются различные окислители. Облучение такого раствора лазером с длиной волны 488 нм приводит к восстановлению окислителя и переходу GFP в другую форму с измененными спектральными свойствами – максимумы полос поглощения и флуоресценции смещаются в красную область. Такое явление может быть обусловлено формированием фотоиндуцированных частично ионизованных состояний, в которых электронная плотность локализована в полости вблизи хромофора. Подобные явления наблюдаются для анионов в водных растворах, например, в водном растворе иодид иона образуются состояния с переносом заряда на молекулы растворителя (CTTS – “charge transfer to solvent”), которые наблюдаются экспериментально спектральными методами [278–283]. В случае белковой молекулы также возможно формирование подобных состояний, которые далее в работе будут называться CTTS-подобными.

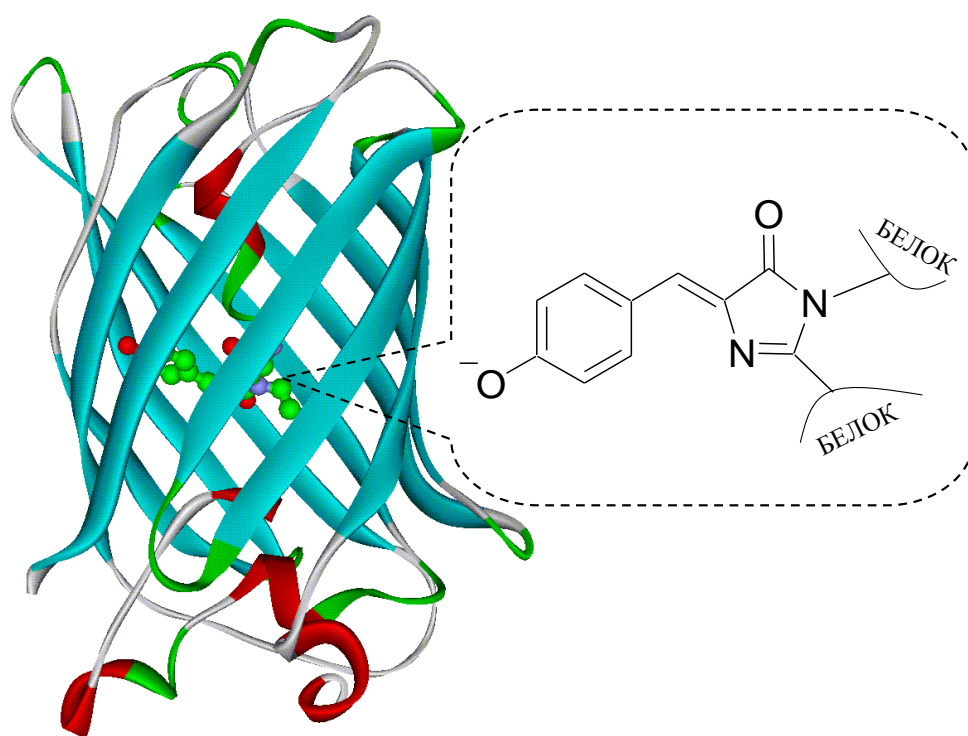


Рис. 5.15. Зеленый флуоресцентный белок с хромофором в анионной форме.

5.5.1. CTTS-подобные состояния в кластерных моделях

Как показано на рис. 5.15, хромофорная группа GFP находится в анионной форме, и можно предположить наличие возбужденных состояний, подобных CTTS. Ранее были получены равновесные геометрические параметры анионной формы GFP в рамках комбинированного подхода квантовой и молекулярной механики в варианте потенциалов эффективных фрагментов (КМ подсистема описывалась в рамках DFT/PBE0/ 6-31G*, ММ подсистема – с помощью силового поля AMBER). Квантовая часть такой модели, состоящая из молекул хромофора, боковых цепей аминокислотных остатков Arg96, His148, Ser205 и Glu222, а также двух молекул воды, использовалась далее для кластерных расчетов (рис. 5.16) [284].

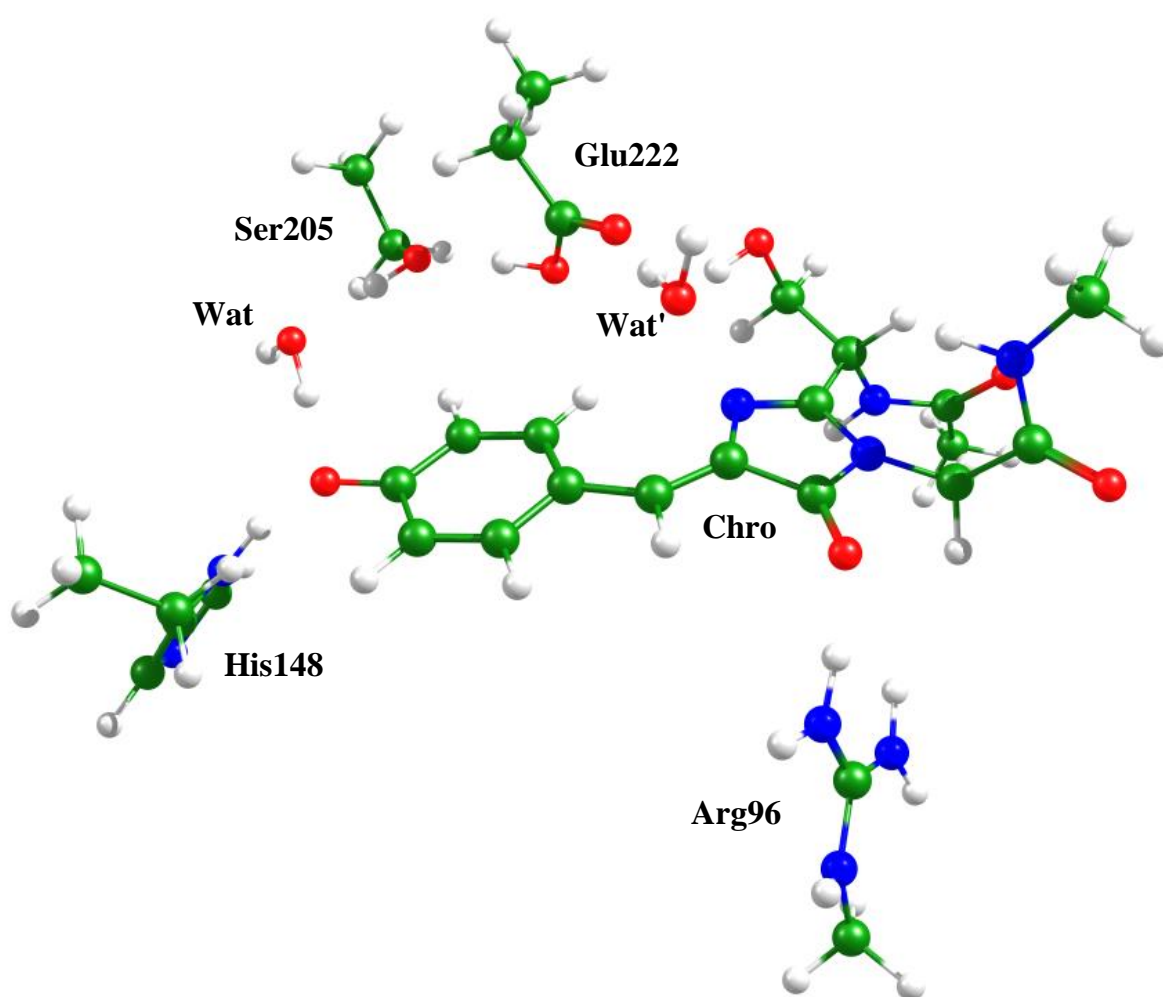


Рис. 5.16. Молекулярный кластер, описывающий хромофорный карман GFP.

Для описания CTTS-подобных состояний использовалась техника постепенного расширения базисного набора и насыщения его диффузными функциями. Оценка влияния окружающих молекулярных групп проводилась путем варьирования размера молекулярного кластера: от чистого хромофора до полного

кластера, показанного на рис. 5.16. Эти вычисления выполнялись в рамках метода конфигурационного взаимодействия с однократными возбуждениями (CIS), так как предполагается, что переходы носят преимущественно одноэлектронный характер и для данной системы можно наблюдать качественно правильное решение. После получения качественно правильной картины количественные значения уточнялись в рамках метода SOS-CIS(D). В таблице 5.4 приведены данные для модельных систем, полученных последовательным расширением окружения хромофора, образующего с ним водородные связи.

Такой выбор модельных систем обусловлен необходимостью определить влияние различных факторов. Гистидин и вода образуют водородные связи с кислородом фенильного фрагмента, на котором локализуется отрицательный заряд. Положительно заряженный аргинин влияет на перераспределение заряда на хромофоре, что также может приводить к изменению электронных свойств. Применение постепенно расширяющегося базиса с добавлением диффузных функций необходимо для корректного описания состояний, локализованных не на молекулах; такая методика ранее применялась для описания CTTS-подобных состояний в анионной форме молекулы HBDI – синтетического аналога хромофора зеленого флуоресцентного белка [285]. Из таблицы 3.1 видно, что при отсутствии диффузных функций (базис 6-31G**) невозможно описать CTTS-подобные состояния, однако уже добавление двух диффузных функций на тяжелые атомы и одной на атомы водорода дает стабильный результат, не изменяющийся при дальнейшем увеличении базиса, поэтому этот же базис использовался при дальнейших расчетах методом SOS-CIS(D). Такие базисы обладают высокой степенью линейной зависимости, что усложняет процесс расчета. В таблице 5.4 приведены энергии двух низших переходов для всех модельных систем. Анализ более высоко лежащих состояний показывает, что среди них также есть CTTS-подобные.

Таблица 5.4. Энергии вертикальных переходов в модельных системах, рассчитанные методом CIS в различных базисах. O.P. – оптически разрешенный переход, CTTS – CTTS-подобное состояние, в скобках показаны рассчитанные силы осцилляторов. В первой колонке в скобках указан заряд системы.

Система	Тип перехода	Базисный набор			
		6-31G**	6-31G**(+,+)	6-31G**(2+,+)	6-31G**(2+,2+)
Chro (-1)	O.P.	3.81 (1.62)	3.69 (1.46)	3.70 (1.34)	3.68 (0.24); 3.70 (1.08)
	CTTS	—	3.94 (0.06)	3.54 (0.09)	3.48 (0.06)
Chro + Arg (0)	O.P.	3.71 (1.72)	3.62 (1.58)	3.62 (1.61)	3.62 (1.61)
	CTTS	—	3.50 (0.05)	3.39 (0.01)	3.39 (0.01)
Chro + Wat (-1)	O.P.	3.87 (1.58)	3.77 (1.48)	3.75 (1.24)	3.75 (1.13)
	CTTS	—	4.24 (0.02)	3.85 (0.25); 4.08(0.001)	3.83 (0.36); 4.03(0.001)
Chro + His (-1)	O.P.	3.88 (1.68)	3.78 (1.58)	3.77 (1.53)	3.77 (1.52)
	CTTS	—	4.30 (0.10)	3.96 (0.05)	3.95 (0.06)
Chro + Arg + Wat (0)	O.P.	3.75 (1.68)	3.66 (1.55)	3.64 (0.64); 3.67 (0.95)	3.64 (0.64); 3.68 (0.95)
	CTTS	—	3.77 (0.04)	4.08 (0.01)	4.08 (0.01)
Chro + Arg + His (0)	O.P.	3.74 (1.68)	3.66 (1.68)	3.66 (1.66)	3.66 (1.65)
	CTTS	—	3.88 (0.01)	3.78 (0.03)	3.78 (0.03)
Chro + Arg + Wat + His (0)	O.P.	3.79 (1.72)	3.72 (1.64)	3.72 (1.64)	3.72 (1.64)
	CTTS	—	4.11 (0.002)	4.01 (0.003)	4.01 (0.003)
Весь кластер (0)	O.P.	3.89 (1.57)	3.82 (1.50)	3.82 (1.48)	3.82 (1.48)
	CTTS	—	4.04 (0.002)	3.91 (0.002)	3.94 (0.002)

Для минимальной модельной системы, состоящей из хромофора, в приближении CIS CTTS-подобное состояние находится ниже по энергии, чем оптически разрешенный переход – состояния разного типа хорошо отличимы при

анализе изменения электронной плотности при переходе из основного состояния в возбужденные (рис. 5.17). Из рисунка видно, что в результате S_0-S_1 перехода на хромофоре уменьшается электронная плотность, а в области рядом с хромофором увеличивается. S_0-S_2 переход, соответствующий оптически разрешенному переходу, сопровождается перераспределением электронной плотности по сопряженной π -системе хромофора.

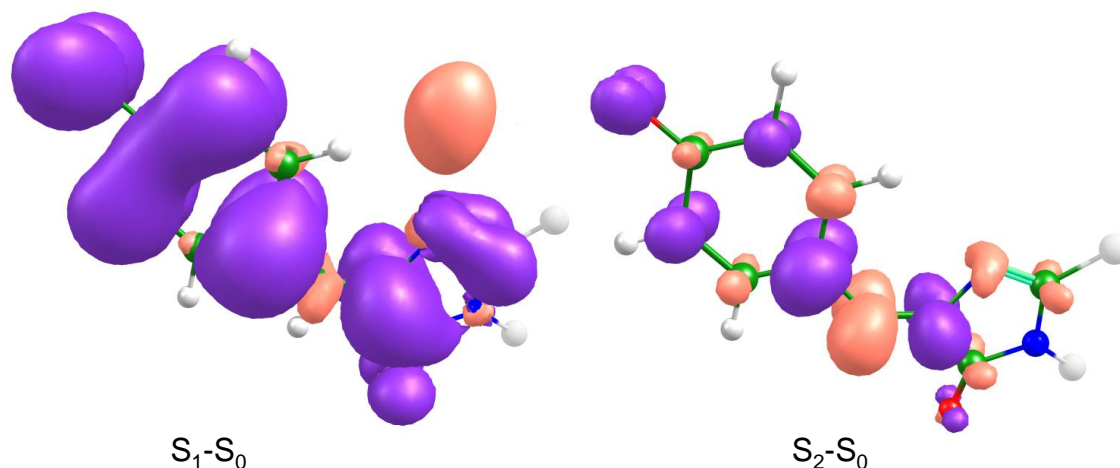


Рис. 5.17. Разности электронных плотностей состояний основного и первого возбужденного – S_1-S_0 (слева) и основного и второго возбужденно S_2-S_0 (справа), полученные методом CIS/6-31G**(2+,+) для хромофора. Здесь и далее в текущем главе фиолетовым показаны области уменьшения электронной плотности, красным – увеличения.

Добавление в систему молекулярной группы, образующей водородную связь с кислородом фенильного фрагмента хромофора, приводит к изменению порядка следования состояний – оптически разрешенный переход становится ниже по энергии. В белке GFP водородные связи с фенильным кислородом хромофора образуют молекула воды и гистидин (рис. 5.18, рис. 5.19). Из-за особенностей белковой структуры водородная связь между молекулой воды и хромофором короткая – 2.65 Å между атомами кислорода, с гистидином она больше и составляет 2.96 Å между атомами кислорода и азота. Такое положение воды является оптимальным для белковой системы, но не является предпочтительным для молекулярного кластера, не учитывающего влияние белковой матрицы. Именно это обстоятельство определяет более близкое расположение двух возбужденных уровней друг к другу в системе Chro + Wat и смешение электронных конфигураций двух возбужденных состояний S_1 и S_2 . Поскольку для системы Chro +

Wat S_2 состояние имело смешанный характер, в таблице 5.4 также приведена энергия перехода на более высоко лежащее состояние (S_0 - S_3) и на рисунке 5.18 показано характерное для него изменение электронной плотности.

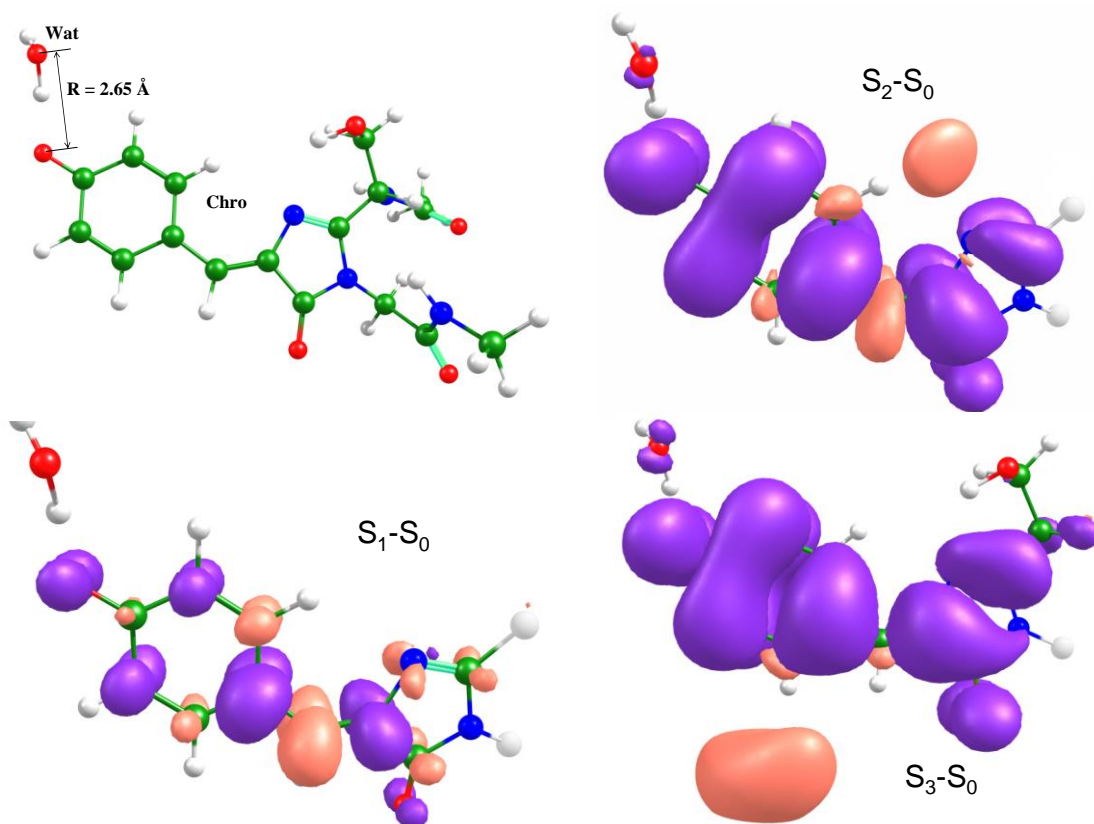


Рис. 5.18. Разности электронных плотностей состояний основного и первого возбужденного – S_1 - S_0 (слева снизу), основного и второго возбужденно S_2 - S_0 (справа сверху) и основного и третьего возбужденно S_3 - S_0 (справа снизу), полученные методом CIS/6-31G**(2+,+) для системы Chro + Wat.

Для системы Chro + His CTTS-подобное и оптически разрешенное состояние не замешиваются друг с другом. Это обусловлено большей длиной водородной связи, более характерной для молекулярных кластеров (рис. 5.19).

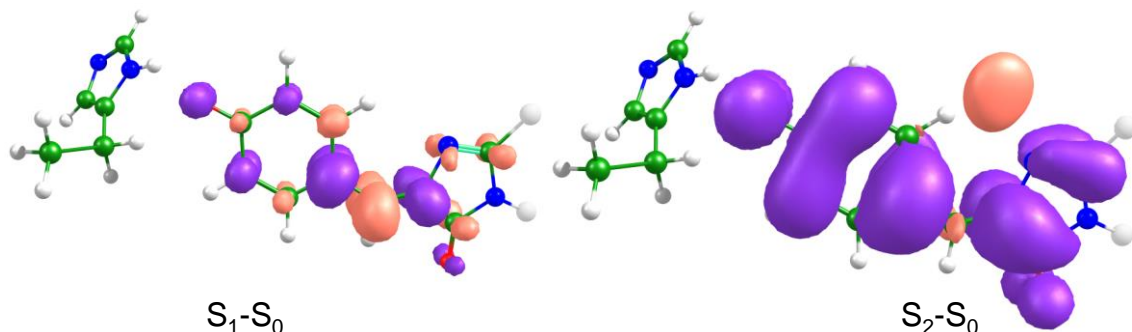


Рис. 5.19. Разности электронных плотностей состояний основного и первого возбужденного – S_1 - S_0 (слева) и основного и второго возбужденно S_2 - S_0 (справа), полученные методом CIS/6-31G**(2+,+) для системы Chro + His.

Добавление положительно заряженного аргинина в модельную систему не меняет порядок состояний по сравнению с минимальной системой, содержащей только хромофор (рис. 5.20). Однако для такой системы характерно увеличение вертикальной энергии ионизации, значения которой получены в рамках теоремы Купманса (рис. 5.21). При дальнейшем увеличении модельной системы тенденция сохраняется – наличие положительно заряженной молекулярной группы сильно увеличивает вертикальный потенциал ионизации.

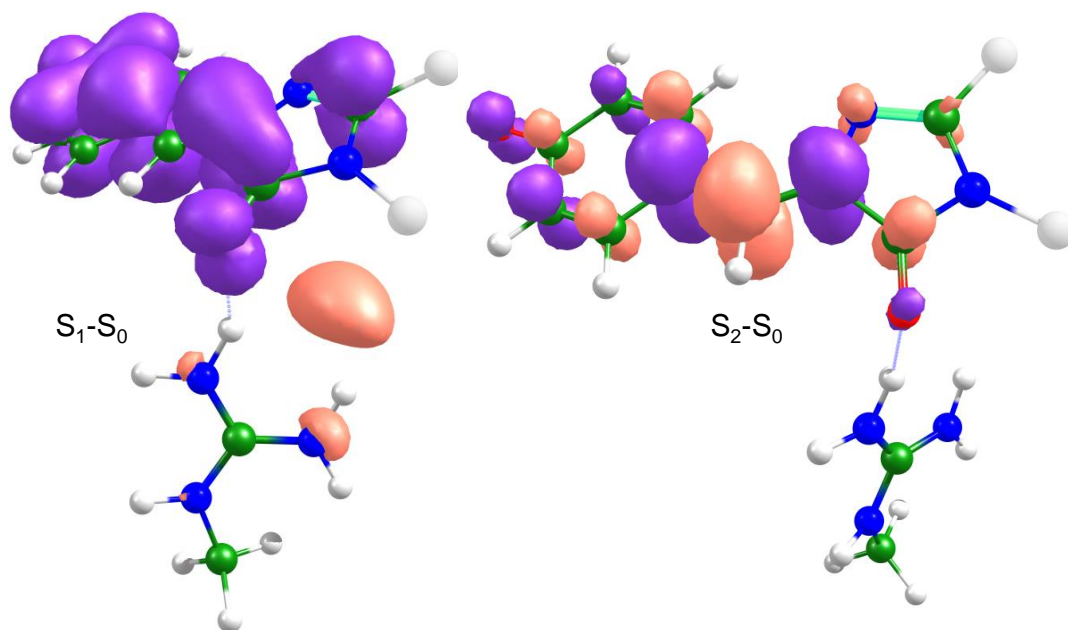


Рис. 5.20. Разности электронных плотностей состояний основного и первого возбужденного – S_1-S_0 (слева) и основного и второго возбужденно S_2-S_0 (справа), полученные методом CIS/6-31G**(2+, +) для системы Chro + Arg.

Увеличение модельной системы и добавление к хромофору положительно заряженного аргинина и молекулы воды, насыщающей водородную связь фенильного фрагмента хромофора, приводит к еще большему сближению двух низших возбужденных состояний и замешиванию их электронных структур (рис. 5.22). Из таблицы 5.4 видно, что S_0-S_1 и S_0-S_2 переходы имеют сравнимые силы осцилляторов, при этом для S_0-S_1 перехода характерно перераспределение электронной плотности по хромофору, а для S_0-S_2 переход электронной плотности с хромофора на молекулу воды. Только третий переход S_0-S_3 является мало интенсивным и может быть отнесен к CTTS-подобным, электронная плотность смещается в область между хромофором и аргинином.

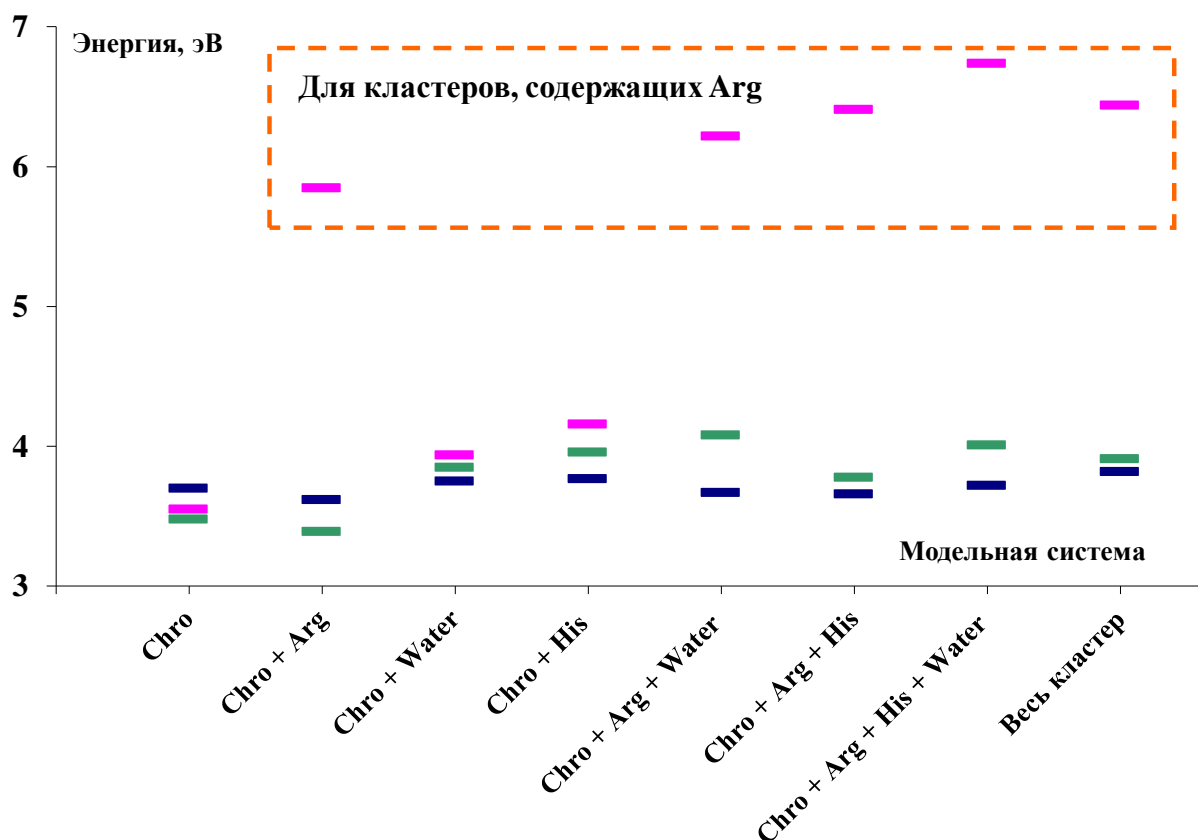


Рис. 5.21. Вертикальные энергии оптически разрешенных переходов (синим), ионизации (розовым), образования CTTS-подобных состояний (зеленым) в рамках метода CIS/6-31G**(2+,+).

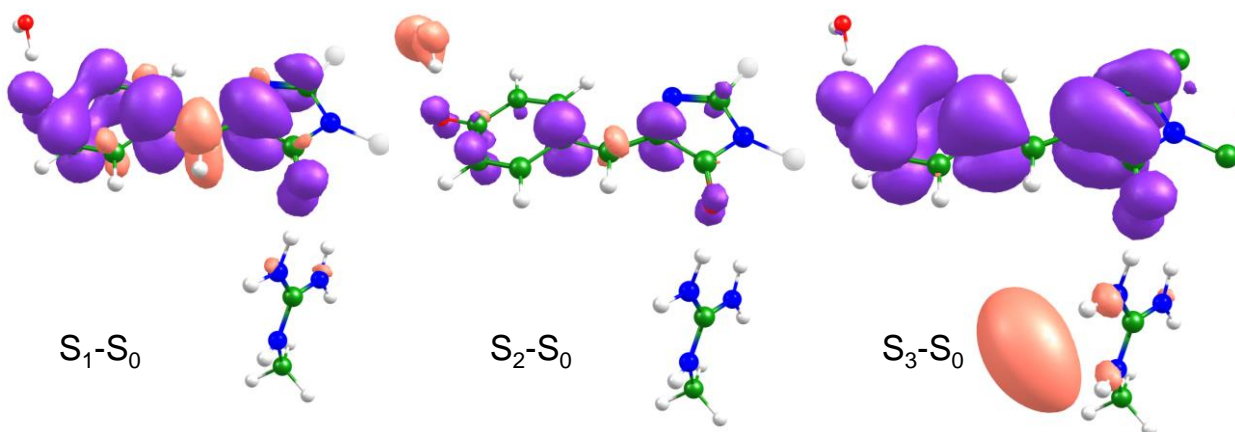


Рис. 5.22. Разности электронных плотностей состояний основного и первого возбужденного – S_1-S_0 (слева), основного и второго возбужденно S_2-S_0 (в центре) и основного и третьего возбужденно S_3-S_0 (справа) полученные методом CIS/6-31G**(2+,+) для системы Chro + Arg + Wat.

Для модельной системы Chro + Arg + His низшее возбужденное состояние является оптически разрешенным, а следующее – CTTS-подобным (рис. 5.23); вертикальная энергия ионизации также как и для остальных систем с аргинином оказывается больше 6 эВ.

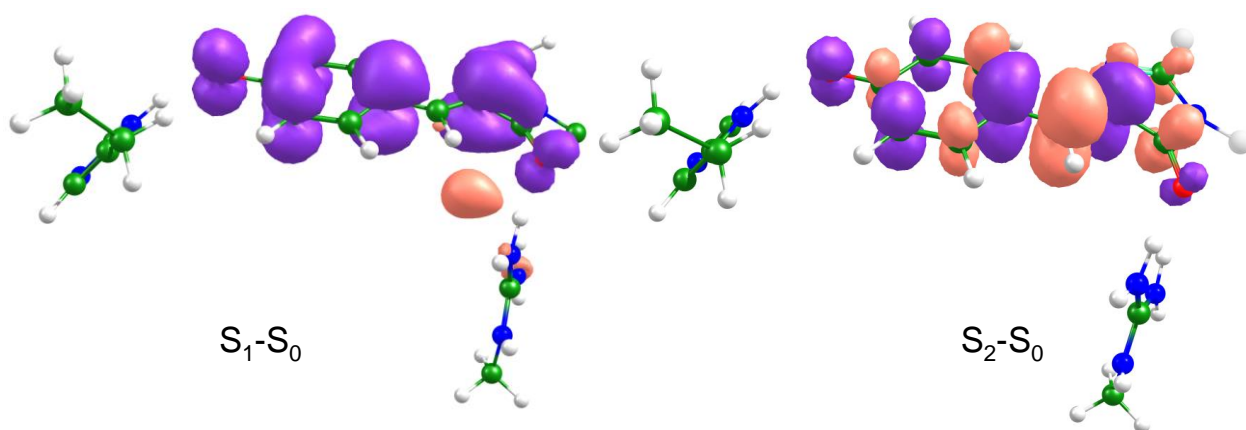


Рис. 5.23. Разности электронных плотностей состояний основного и первого возбужденного – S_1-S_0 (слева) и основного и второго возбужденно S_2-S_0 (справа), полученные методом CIS/6-31G**(2+,+) для системы Chro + Arg + His.

Дальнейшее увеличение модельной системы не приводит к появлению новых эффектов (рис. 5.24). В системе Chro + Arg + Wat + His, в которой присутствуют и положительный заряд, и два молекулярных фрагмента, образующих водородные связи с кислородом фенильного фрагмента хромофора, низшее возбужденное состояние является оптически разрешенным, а следующее – CTTS-подобным.

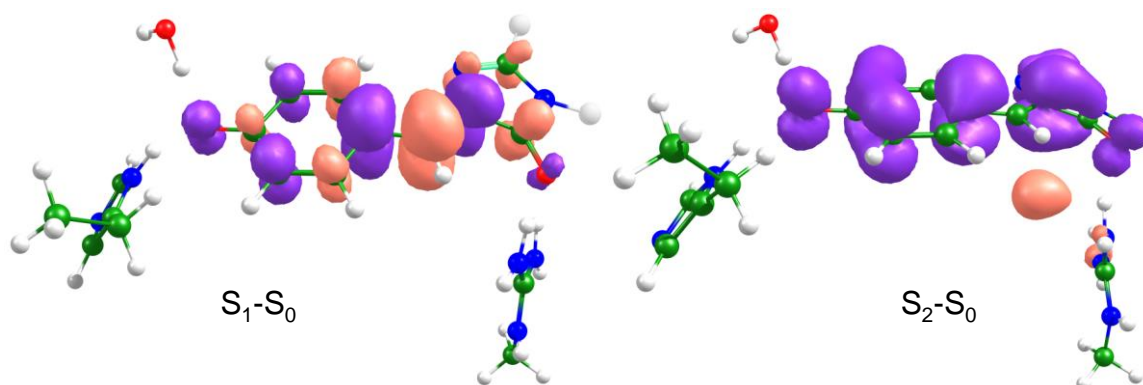


Рис. 5.24. Разности электронных плотностей состояний основного и первого возбужденного – S_1-S_0 (слева) и основного и второго возбужденно S_2-S_0 (справа), полученные методом CIS/6-31G**(2+,+) для системы Chro + Arg + His + Wat.

Для молекулярного кластера наибольшего размера электронные переходы имеют такой же характер, что и для системы Chro + Arg + Wat + His (рисунок не показан из-за большого размера и отсутствия наглядности).

Для количественного описания энергий переходов применялся метод SOS-CIS(D), полученные в нем значения энергий отличаются от метода CIS так как включают в себя поправки по теории возмущений, при этом само электронное решение остается тем же (рис. 5.25). Из рисунка видно, что энергетические

поправки приводят к изменению порядка состояний. При этом для всех рассматриваемых систем низшим возбужденным является оптически разрешенный переход, то есть для систем Chro и Chro + Arg меняется порядок состояний по сравнению с методом CIS. Насыщение водородной связи фенильного кислорода приводит к изменению разности энергий оптически разрешенного перехода и CTTS-подобного. Применимость данного метода подтверждается хорошим согласованием рассчитанного значения вертикального перехода (2.56 эВ) и максимума полосы поглощения (2.54 эВ).

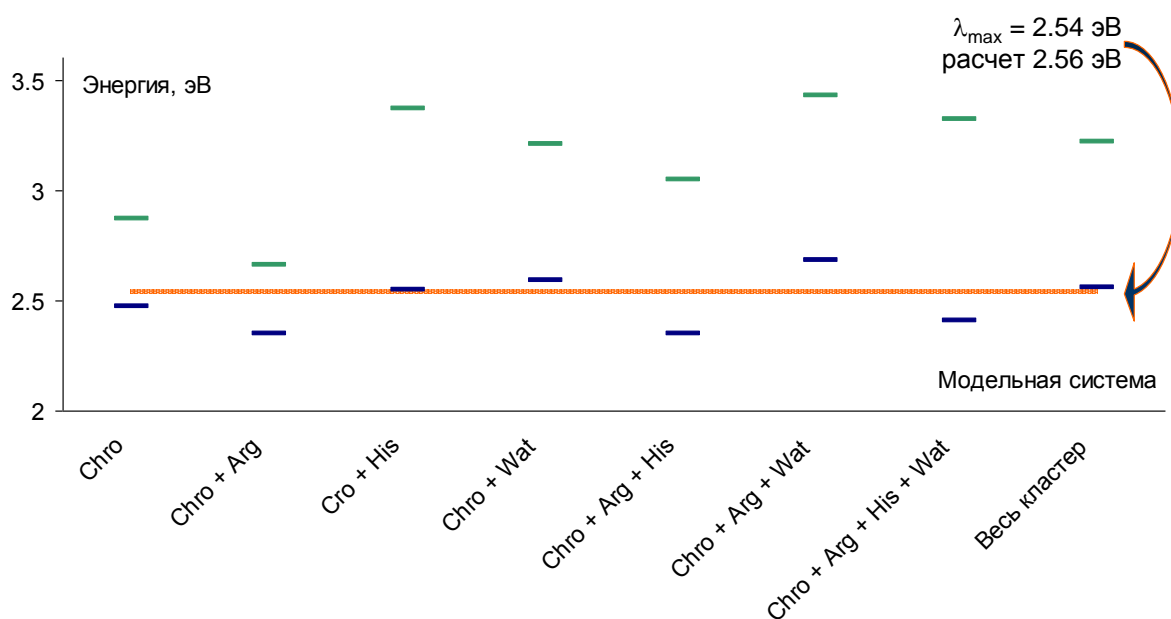


Рис. 5.25. Вертикальные энергии оптически разрешенных переходов (синим), образования CTTS-подобных состояний (зеленым) в рамках метода SOS-CIS(D)/6-31G**(2+, +).

5.5.2. Влияние водородных связей с фенильным фрагментом хромофора на его электронные свойства

Как уже отмечалось в предыдущем разделе, для равновесной геометрической конфигурации анионной формы характерна аномально короткая для раствора длина водородной связи между атомами кислорода молекулы воды Wat и кислородом фенильного фрагмента хромофора. Такая длина связи может быть оптимальной в белке благодаря особенностям его упаковки. Чтобы оценить влияние длины водородной связи на электронные свойства, была проведена серия расчетов с последовательным увеличением расстояния между атомами кислорода воды и хромофора (R) в системе Chro + Wat (рис. 5.26). При изучении влияния R на

электронные свойства системы учитывалась величина полной энергии системы в основном электронном состоянии, энергии трех низших электронных переходов и их интенсивности. На рис. 5.26 показано, что последовательное увеличение расстояния между хромофором и молекулой воды меняет электронное решение для возбужденных состояний. Из анализа зависимости энергии основного состояния от R можно заключить, что оптимальная длина водородной связи для молекулярного кластера составляет около 2.9 \AA , что примерно на 0.3 \AA больше, чем для оптимизированной белковой структуры. Изучение возбужденных состояний, их энергий и свойств показывает, что при последовательном увеличении расстояния R сначала наблюдается сближение состояний S_1 и S_2 по энергии и выравнивание их интенсивностей. При этом разность электронных плотностей для этих состояний указывает на смешанный характер состояний: перераспределение электронной плотности по хромофору и на область вблизи хромофора. Дальнейшее увеличение расстояния приводит к разрыву водородной связи между молекулярными группами, и молекула воды перестает оказывать влияние на хромофор; это приводит к изменению порядка состояний: СТТС-подобное состояние становится первым возбужденным, а оптически разрешенное – вторым.

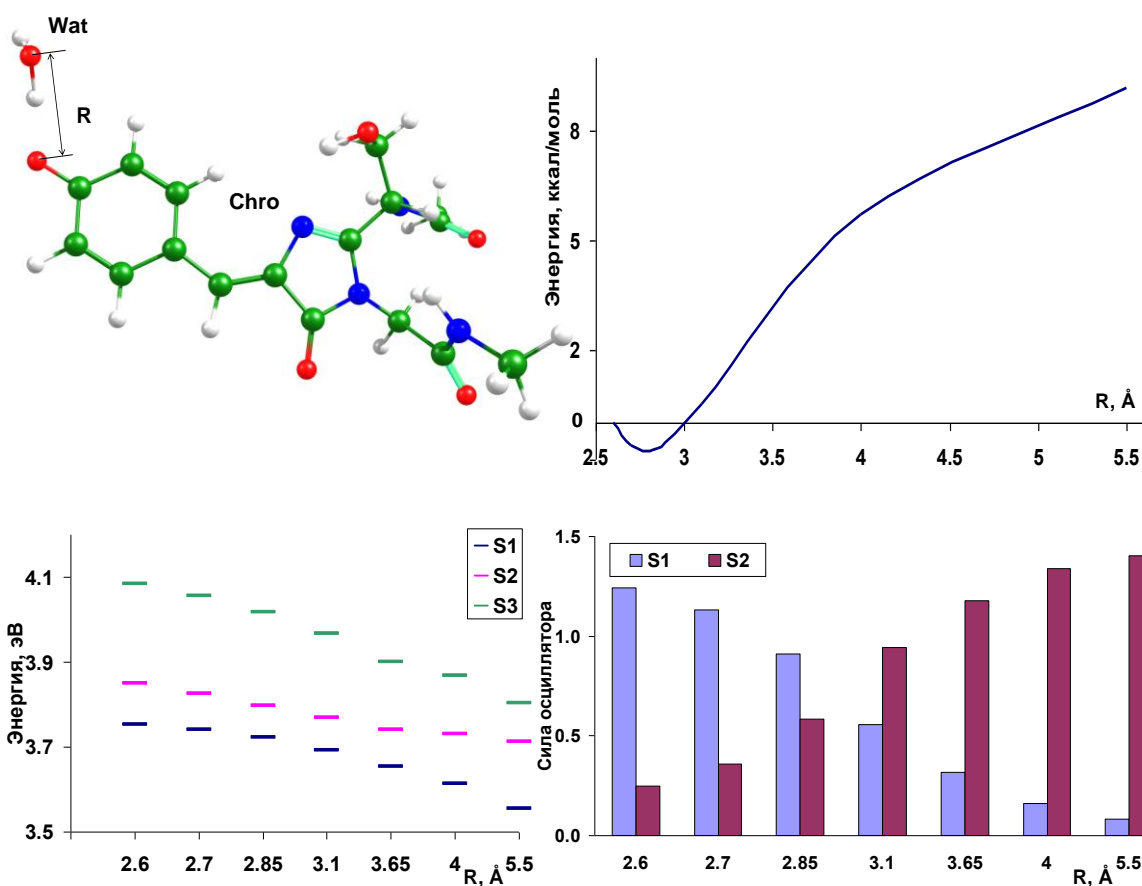


Рис. 5.26. Энергии трех низших синглетных возбужденных уровней (слева снизу), относительная энергия основного состояния систем с различным расположением молекулы воды (справа сверху) и рассчитанные силы осцилляторов (справа снизу), полученные методом CIS/6-31G**(2+, +) для систем Chro + Wat с различным значением R .

На рисунке 5.26 также показаны энергии переходов S_0 – S_3 , все они имеют очень низкую силу осциллятора и также являются CTTS-подобными. При увеличении значения R энергия перехода уменьшается. Это связано с тем, что при наличии водородной связи отрицательный заряд на фенильном кислороде хромофора стабилизируется и образование CTTS-подобных состояний, сопровождающееся понижением электронной плотности на фенильном фрагменте, энергетически менее выгодно.

Анализ влияния молекулярных групп, окружающих хромофор зеленого флуоресцентного белка, показывает, что образование водородных связей с фенильным кислородом хромофора приводит к увеличению энергии образования CTTS-подобных состояний. Добавление в систему положительно заряженного аргинина приводит к увеличению вертикальной энергии ионизации; при этом добавление аргинина в систему не приводит к увеличению энергии образования

СТТС-подобного состояния, поскольку аргинин не образует водородной связи с фенильным кислородом хромофора.

Наличие СТТС-подобных состояний свидетельствует в пользу возможности проявления электронодонорных свойств белком GFP. При этом не обязательно затрачивать энергию, равную энергии ионизации для отрыва электрона от хромофора, достаточно затратить меньшую энергию для образования СТТС-подобного состояния, в котором электрон уже локализован в полости вблизи хромофора, а не на самом хромофоре.

5.6. Результаты главы 5

- Методом классической молекулярной динамики проведена оптимизация структуры связующего пептида FRET сенсора на каспазу-3, состоящего из флуоресцентного белка TagRFP и хромопротеина KFP. Разработанный сенсор прошел экспериментальную проверку и обладает большим динамическим диапазоном.
- Рассчитаны дипольные моменты переходов $S_{0,\min} \rightarrow S_1$ и $S_{1,\min} \rightarrow S_0$ для флуоресцентных белков, применяющихся во FRET сенсорах, позволяющие оценить значения ориентационных факторов при создании новых генетически кодируемых FRET сенсоров.
- Построена молекулярная модель, описывающая поведение FRET сенсора с тербий-связывающим пептидом.
- Предложен механизм фотопереключения белков KFP и asFP595.
- Дана интерпретация фотоиндуцированных окислительно-восстановительных свойств белка GFP.

Основные результаты и выводы

- На основании выполненных расчетов и анализа результатов показано, что суперкомпьютерное молекулярное моделирование, основанное на построении полноатомной модели белка, выделении активного центра фермента или фоторецепторной системы для рассмотрения в рамках комбинированного метода квантовой механики/молекулярной механики (КМ/ММ), позволяет интерпретировать экспериментальные данные и прогнозировать свойства белковых систем с требуемой для опытной проверки точностью.
- Установленный механизм реакции протеолиза в активном центре матриксной металлопротеиназы ММР-2 позволяет интерпретировать структурные и кинетические экспериментальные данные и прогнозировать новые ингибиторы фермента на основе олигопептидов и их миметиков, обладающие заданным набором свойств, проверенных *in vitro*.
- Гидролиз гуанозинтрифосфата в комплексах малых ГТФаз с белками-ускорителями, приводящий к разрыву фосфор-кислородной связи субстрата, сопровождается таутомеризацией каталитического аминокислотного остатка глутамина в активном центре фермента и его последующим возвращением из имидной в амидную форму. Энергетические барьеры стадии регенерации фермента, требующей переориентации неорганического фосфата выше, чем барьеры разрыва связи фосфор-кислород. Наличие заселённых интермедиатов позволяет дополнительно верифицировать предложенный механизм реакции гидролиза методами ИК-спектроскопии с временным разрешением.
- Механизмы фотоциклов флавин-содержащих фоторецепторных белков BLUF и iLOV, установленные методами КМ/ММ моделирования, позволяют оптимизировать свойства перспективного флуоресцентного белка iLOV за счет точечного мутагенеза.
- Рациональный дизайн связующего пептида в комплексе, состоящем из флуоресцентного белка TagRFP и хромопротеина KFP, позволяет увеличить

динамический диапазон измерения эффективности резонансно-индуктивного переноса энергии данного FRET сенсора на каспазу-3.

- Разработанный алгоритм моделирования светособирающей антенны LH1 и реакционного центра RC термофильной бактерии *Thermochromatium tepidum* позволяет объяснить наблюдаемую в эксперименте повышенную термическую стабильность комплекса за счет вхождения аминокислотных остатков из двух соседних субъединиц LH1 в координационную сферу катионов кальция.

Список иллюстраций

Рис. 1.1. Общая схема решения задач.....	22
Рис. 1.2. Схема реакции гидролиза пенициллина G.	23
Рис. 1.3. Стадии ацилирования и деацилирования реакции гидролиза пенициллина G пенициллинацилазой.	24
Рис. 1.4. Профиль поверхности потенциальной энергии стадий ацилирования и деацилирования реакции гидролиза пенициллина G пенициллинацилазой.	25
Рис. 1.5. Фермент-субстратный комплекс пенициллина G в активном центре пенициллинацилазы.	27
Рис. 1.6. Распределение по расстояниям C(PNN)...O(β Ser1) в фермент-субстратном комплексе.	27
Рис. 1.7. КМ подсистема, выбранная в расчетах по протоколам 3 и 4. Синим показаны атомы на границах КМ и ММ частей.	28
Рис. 1.8. Ключевые геометрические параметры первой стадии реакции гидролиза пенициллина G в активном центре пенициллинацилазы.	29
Рис. 1.9. Модельная система комплекса LH1-RC бактерии <i>Thermochromatium teridum</i> , помещенного в липидный бислой и сольватированного молекулами воды. Вода и липидный бислой показаны красными точками и зелеными линиями, соответственно. Реакционный центр, α и β цепи LH1 показаны зелеными, синими и красными спиралями или трубками, соответственно. На вставке показан вид сверху для комплекса LH1-RC.	34
Рис. 1.10. Расположение катионов кальция в модельной системе (пурпурным); жирным выделены катионы кальция вблизи ($< 3 \text{ \AA}$) белка.	35
Рис. 1.11. Изменение расстояние между одним из катионов кальция и аминокислотными остатками β Leu46 и α Asp49 вдоль МД траектории.....	35
Рис. 1.12. Эволюция 16 сайтов связывания кальция. По оси ординат отложено число ионов кальция, взаимодействующих с соответствующим аминокислотным остатком. Во врезке показаны результаты ускоренной молекулярной динамики. ..	36

Рис. 1.13. Слева показана координационная сфера кальция в кристаллической структуре 3WMM [53]. Справа – координационная сфера кальция в результате МД расчета.	37
Рис. 1.14. Наложение кольца LN1, полученного в молекулярной модели и в кристалле (PDB ID: 3WMM) голубым и пурпурным, соответственно. На врезке справа розовым показан фрагмент реакционного центра и относительное расположение внутренних спиралей.	37
Рис. 2.1. Схема каталитического механизма протеолиза в ферменте MMP-3. Фермент-субстратный комплекс, переходные состояния, интермедиат и комплекс продуктов обозначены как ES, TS1, TS2, INT и PROD, соответственно [60].	40
Рис. 2.2. Энергетические профили для систем А (пунктиром), В (сплошной линией) и В-ONIOM (жирным), полученные в рамках теории функционала электронной плотности с гибридным функционалом B3LYP в базисе LANL2DZ [60].	42
Рис. 2.3. Жирная линия - профиль свободной энергии системы В-ONIOM, полученный на основании расчетов методом DFT с функционалом B3LYP в расширенном базисе 6-311G**+; тонкая линия – вклад в энергию системы В-ONIOM внешнего слоя, энергия которого описывалась методом MNDO [60].	43
Рис. 2.4. Энергетический профиль реакции гидролиза пептида Ace-Gly~Pe-Nme, катализируемой MMP-2, полученный в результате КМ расчета в молекулярном кластере методом DFT/B3LYP/LACVP* [63].	45
Рис. 2.5. Основные фермент-субстратные взаимодействия в каталитическом центре фермента MMP-2 [63].	45
Рис. 2.6. Энергетические профили реакции гидролиза Pα1 в активном центре фермента MMP-2 [63]. <i>EQM/MMenzyme + solvent</i> – относительная энергия КМ/ММ расчета; <i>EQM/menzyme</i> – КМ/ММ энергия, рассчитанная в одной точке, для структур, содержащих 50 молекул воды, ближайших к Zn1; GPB – PB расчет в точке; EQM – КМ расчет в точке только для КМ части.; <i>ΔGMMPBsingle – point</i> – ММ-PB поправка к свободной энергии, рассчитанная в одной точке; <i>ΔGMMPB</i> –среднее значение ММ-PB поправки к свободной энергии.	46
Рис. 2.7. КМ подсистема, использованная в расчетах.	48

Рис. 2.8. Общая схема реакции гидролиза олигопептида в активном центре матриксной металлопротеиназы-2.....	49
Рис. 2.9. Равновесная геометрическая конфигурация фермент-субстратного комплекса. Здесь и далее длины связей указаны в ангстремах, зеленым, синим, красным, белым и желтым показаны атомы углерода, азота, кислорода и цинка, соответственно.....	49
Рис. 2.10. Интермедиаты I1, I2, I3, I4 реакции гидролиза модельного субстрата в MMP-2, полученные методом PBE0-D3/6-31G**/CHARMM.....	50
Рис. 2.11. Сечения поверхности потенциальной энергии реакции гидролиза модельного субстрата MMP-2, полученные методами PBE0-D3/6-31G**/CHARMM (синим), B3LYP/6-31G**/CHARMM (зеленым) и DLPNOCCSD(T)/def2-TZVP/CHARMM//PBE0-D3/6-31G**/CHARMM (красным).51	51
Рис. 2.12. Сечения поверхности потенциальной энергии первой стадии реакции, рассчитанные методом PBE0-D3/6-31G**/CHARMM. Кривая 7 соответствует профилю, представленному на рис. 2.10.....	52
Рис. 2.13. Реакционные (сверху) и нереакционные (снизу) ES комплексы. Номерами обозначены соответствующие им потенциальные кривые на рис. 2.12..	53
Рис. 2.14. Атомы олигопептидного субстрата показаны сферами. MMP-2 – тёмно-синей изоповерхностью, а сольватная оболочка глубиной 12 Å – голубым.....	55
Рис. 2.15. Влияние размера сольватной оболочки на профиль ППЭ первой стадии реакции.	56
Рис. 2.16. Профили потенциальной энергии для первой стадии, полученные для фермент-субстратных комплексов в КМ/ММ расчетах с различными способами описания КМ части.....	59
Рис. 2.17. Профили поверхностей потенциальной энергии. Во врезке слева показан профиль для первой стадии, справа: ППЭ для второй и третьей стадий.	61
Рис. 2.18. Сечения поверхности потенциальной энергии первой стадии реакции, рассчитанные методом PBE-D3/TZV2P/CHARMM. Нумерация кривых соответствует рис. 2.12.	63

Рис. 2.19. Сечения поверхности потенциальной энергии реакции гидролиза модельного субстрата нативной формой MMP-2 (красным) и мутантной формой Glu116Asp (чёрным), полученные методом PBE0-D3/6-31G**/CHARMM.	64
Рис. 2.20. Равновесные геометрические конфигурации стационарных точек, полученных для реакции гидролиза модельного субстрата мутантной формой MMP-2 Glu116Asp.	65
Рис. 2.21. Профили свободной энергии для первой стадии реакции гидролиза, посчитанные методом PBE0-D3/6-31G**/CHARMM для нативного фермента (красным) и мутанта Glu116Asp(чёрным).	66
Рис. 2.22. Профиль поверхности свободной энергии, полученный методом PBE-D3/TZV2P/CHARMM для нативного фермента (красным) и мутантной формы Glu116Asp (чёрным).	69
Рис. 2.23. Потенциалы средней силы, полученные для выхода N-продукта в нативном ферменте (красным) и мутанте Glu116Asp (синим).	70
Рис. 2.24. Структура заменяемого фрагмента (сверху) и реакция гидратации кетона (снизу).	72
Рис. 2.25. Механизм реакции гидратации кетометиленового производного натурального субстрата в активном центре MMP-2. Энергии на профиле потенциальной энергии в ккал/моль, ключевые расстояния приведены в Å.	73
Рис. 2.26. Равновесные геометрические конфигурации комплексов MMP-9-Inh ^{pro} и MMP-9-Regasepin-1. Динамика изменения расстояния между атомом азота His1 и катионом цинка в комплексе MMP-9-Regasepin-1, полученные в моделировании методом КМ/ММ-МД (снизу).	74
Рис. 2.27. Структура активного центра после классических МД расчетов с длинами траекторий 50 нс, полученные с зарядами из силового поля CHARMM (слева) и ESP (справа).	77
Рис. 2.28. Равновесные геометрические конфигурации комплексов MMP-2-APP-IP (слева) и MMP-2-APP-IP ^{ZnF} (справа). На графиках показаны расстояния His5...Zn ²⁺ (сверху), AspOD2...Zn ²⁺ (красным) и AspOD1...Zn ²⁺ (синим) (снизу) вдоль молекулярно-динамических траекторий в Å.	78

Рис. 2.29. Равновесная геометрическая конфигурация комплекса MMP-2-Inh ^{D-Cys} . Ключевые расстояния показаны в Å.	80
Рис. 2.30. Равновесные геометрические конфигурации комплексов MMP-2 с APP- IP-Asp6Ser (слева) и APP-IP-Asp6Cys (справа). Ключевые расстояния показаны в Å.	82
Рис. 2.31. Среднеквадратичные отклонения (RMSD) основной цепи APP-IP (красным), APP-IP-Asp6Cys (зеленым) и APP-IP-Asp6Ser (синим) вдоль МД траектории.	83
Рис. 2.32. Распределения углов ϕ и ψ на картах Рамачандрана для остатков Asn5 (сверху) и Leu8 (снизу). Красным, зеленым и синим показаны значения, соответствующие APP-IP, APP-IP-Asp6Cys и APP-IP-Asp6Ser, соответственно.	84
Рис. 3.1. Комплекс малой ГТФазы Ras и белка ускорителя GAP с ГТФ (GTP).....	86
Рис. 3.2. Механизм реакции гидролиза ГТФ, предложенный в работе [101]......	88
Рис. 3.3. Энергетический профиль реакции гидролиза ГТФ, предложенный в работе [101]......	88
Рис. 3.4. Профили свободной энергии для реакции гидролиза ГТФ в белковом комплексе Ras-GAP и водном растворе [99].	89
Рис. 3.5. Кинетические кривые, полученные в работе [110]. Спадающая кривая соответствует убыли ГТФ, кривая накопления относится к неорганическому фосфату в растворе, пунктирная кривая показывает изменение концентрации комплекса GAP·Ras·GDP·P _i . Данные получены при температуре 303 К.....	91
Рис. 3.6. Модельная система для КМ/ММ расчетов (слева) и КМ подсистема (справа).	92
Рис. 3.7. Механизм реакции гидролиза ГТФ в активном центре белкового комплекса Ras-GAP.....	93
Рис. 3.8. Равновесные геометрические конфигурации стационарных точек, соответствующих минимум на ППЭ ES и I1 и переходным состояниям TS1 и TS2 реакции гидролиза ГТФ в белковом комплексе Ras-GAP. Здесь и далее в главе 3 расстояния представлены в Å.....	94

Рис. 3.9. Равновесная геометрическая конфигурация интермедиата I2 реакции гидролиза ГТФ в белковом комплексе Ras-GAP.	94
Рис. 3.10. Энергетический профиль реакции гидролиза ГТФ в белковом комплексе Ras-GAP. В нижней части рисунка показаны константы скоростей элементарных стадий, вычисленные по теории активированного комплекса при T = 303 К (в с ⁻¹).95	95
Рис. 3.11. Равновесные геометрические конфигурации интермедиатов стадии регенерации фермента (I2, I3 и I4), а также комплекса фермент-продукты (EP) для реакции гидролиза ГТФ в белковом комплексе Ras-GAP.....	96
Рис. 3.12. Наложение рассчитанных кинетических кривых (Pi красным, ES синим и EP зеленым) на экспериментальные [110].	98
Рис. 3.13. Кинетические кривые для ES и EP, полученные численным решением кинетических уравнений.....	98
Рис. 3.14. Таутомерные формы NGln.	100
Рис. 3.15. Фермент-субстратные комплексы мутантного фермента Ras-GAP Gln61NGln с нитро (слева) и аци-нитро (справа) формой NGln61.....	100
Рис. 3.16. Механизм реакции гидролиза в мутантном ферменте Ras-GAP Gln61NGln.	101
Рис. 3.17. Профили потенциальной энергии для реакции гидролиза ГТФ в Ras-GAP (синим) и его мутантной форме Ras-GAP Gln61NGln (красным).	101
Рис. 3.18. Распределение расстояний P _γ ...O-Wat в фермент-субстратных комплексах Ras-GAP (красным), ^{G12V} Ras-GAP (синим) и ^{G13V} Ras-GAP (зелёным) вдоль фрагмента МД траектории.	103
Рис. 3.19. Конформационные изменения, происходящие в активном центре белкового комплекса при введении точечной мутации G13V(шаро-стержневая модель). Малиновым показаны молекулярные фрагменты фермент-субстратного комплекса Ras-GAP.	104
Рис. 3.20. Иллюстрация конформационных изменений, происходящих в активном центре белкового комплекса при введении точечной мутации G12V (шаро-стержневая модель). Стержневой моделью пастельных цветов показан нативный фермент-субстратный комплекс.	105

Рис. 3.21. Изотопные метки в ГТФ. Слева показаны замещения ^{16}O на ^{18}O в γ -фосфатной группе и мостиковом кислороде $\text{O}_{\beta\gamma}$. Справа показаны изотопные метки неорганического фосфата.	106
Рис. 3.22. Рассчитанные значения колебательных частот для интермедиатов реакции (в cm^{-1}), в скобках показаны значения изотопных сдвигов при замене ^{16}O - ^{18}O . Соответствующие им экспериментальные частоты [124,126]: $\nu_1=1207$ (32) cm^{-1} и $\nu_2=1112$ (20) cm^{-1}	107
Рис. 3.23. Сравнение структуры комплекса фермент-продукты, полученного в данной работе, с интермедиатом, описанным в [127]. Значения в скобках соответствуют полученным в работе [127].	108
Рис. 3.24. Рассчитанные колебательные спектры интермедиатов I2 (зеленым), I3 (черным), I4 (красным) и EP (синим). Формы колебательных мод, визуализированные во вставках, выделены звездочками. Числа во вставках соответствуют волновым числам в cm^{-1}	109
Рис. 3.25. Наложение равновесных геометрических конфигураций фермент-субстратных комплексов Arl3-RP2 (шаро-стержневая модель) и Ras-GAP (стержневая модель). Расстояния перед косой чертой соответствуют Arl3-RP2, после – Ras-GAP.	110
Рис. 3.26. Сетки водородных связей вокруг аргининового пальца в фермент-субстратных комплексах Arl3-RP2 (слева) и Ras-GAP (справа).	111
Рис. 3.27. Рассчитанный энергетический профиль реакции гидролиза ГТФ в белковом комплексе Arl3-RP2.	112
Рис. 3.28. Равновесные геометрические конфигурации интермедиатов на участке процесса $\text{GTP}\cdot\text{H}_2\text{O}\cdot\text{Gln} \rightarrow \text{GDP}\cdot\text{Pi}\cdot\text{Gln}^*$ реакции гидролиза ГТФ в белковом комплексе Arl3-RP2.	112
Рис. 3.29. Равновесные геометрические конфигурации интермедиатов в процессе регенерации фермента в реакции гидролиза ГТФ в белковом комплексе Arl3-RP2.	113
Рис. 3.30. Распределение расстояний вдоль КМ/ММ МД траектории на участке реакции $\text{I1} \rightarrow \text{I2} \rightarrow \text{I3}$	114

Рис. 3.31. Кинетические кривые, соответствующие реакции гидролиза ГТФ в белковом комплексе Arg3-RP2.....	115
Рис. 3.32. Рассчитанные колебательные спектры (сверху) и разностные колебательные спектры (снизу). В верхней части рисунка показаны характеристические моды (выделены на разностных спектрах), относящиеся к колебаниям каталитической молекулы воды (ES) и функциональной группы Gln71 (I1, I2).....	117
Рис. 4.1. Изоаллоксазиновое кольцо флавина и нумерация атомов.....	119
Рис. 4.2. Фрагмент хромофорного кармана BLUF домена белка AppA. Функциональная группа Gln63, а также положения Met106 и Trp104 показаны схематично.....	122
Рис. 4.3. Возможные формы функциональной группы Gln63.....	122
Рис. 4.4. Переход из рецепторного состояния в синглетное бирадикальное состояние в результате фотовозбуждения.....	124
Рис. 4.5. Равновесные геометрические параметры рецепторного состояния BLUF домена белка AppA. Здесь и далее расстояния указаны в ангстремах. В скобках приведены расстояния, взятые из кристаллической структуры PDB ID: 2IYG [149]. Здесь и далее в главе 4 расстояния приведены в Å.....	125
Рис. 4.6. Равновесные геометрические параметры сигнального состояния BLUF домена белка AppA. В скобках приведены расстояния, взятые из кристаллической структуры PDB ID: 1YRX [138].....	126
Рис. 4.7. Сравнение равновесных геометрических параметров рецепторного состояния BLUF домена, полученного в данной работе (верхнее значение) и работе [141] (нижнее значение). В скобках приведены расстояния, взятые из кристаллических структур PDB ID: 2IYG (AppA) [149] и 2BYC (BlrB) [136].....	126
Рис. 4.8. Сравнение равновесных геометрических параметров сигнального состояния BLUF домена, полученного в данной работе (верхнее значение) и работе [141] (нижнее значение). В круглых скобках приведены расстояния, взятые из кристаллической структуры PDB ID: 1YRX [138].....	127

Рис. 4.9. Точками показаны параметры кадров вдоль МД траектории. На верхнем графике показаны зависимости расстояний Nε(Gln63) – N5(FAD) – розовым и Nε(Gln63) – N5(FAD) – синим, на нижнем показаны расстояния Nε(Gln63) – O4(FAD) – розовым и Nε(Gln63) – O4(FAD) – синим от двугранного угла Cβ-Cγ-S-Cε (χ) боковой цепи Met106.....	131
Рис. 4.10. Равновесные геометрические параметры рецепторного состояния BLUF домена белка AppA с боковой цепью Met106 в двух различных конформациях, полученные методом КМ/ММ.	132
Рис. 4.11. Возможные пути протекания реакции: конформационные изменения боковой цепи Gln63 в бирадикальном состоянии и последующая рекомбинация радикалов (путь А, сверху); рекомбинация радикалов с последующими конформационными изменениями, преимущественно с боковой цепью Gln63 (путь В, снизу).....	135
Рис. 4.12. Бирадикальная структура реагентов А-І ₀ . Голубым и розовым показана α и β спиновая плотность.....	136
Рис. 4.13. Энергетический профиль стадии А1. Угол, отвечающий координате реакции, показан на вставке.	136
Рис. 4.14. Энергетический профиль стадии А2. Угол, отвечающий координате реакции, показан на вставке.	137
Рис. 4.15. Энергетический профиль стадии А3. Во вставке показана форма колебания, соответствующая мнимой колебательной моде в структуре переходного состояния стадии А3.	138
Рис. 4.16. Энергетическая диаграмма, полученная при расчете в молекулярных кластерах.	139
Рис. 4.17. Энергетический профиль стадии В3.	140
Рис. 4.18. Равновесные геометрические параметры стационарной точки продуктов стадии А3, полученные в КМ/ММ модели. В скобках показаны расстояния из мономеров А и В кристаллической структуры PDB ID: 2IYI [149]......	141

Рис. 4.19. Модель сигнального состояния, использованная в КМ/ММ расчетах. Стрелками показаны направления переноса протонов на первой стадии реакции.	142
Рис. 4.20. Интермедиаты реакции восстановления рецепторного состояния; водородные связи показаны пунктирными линиями.....	143
Рис. 4.21. Слева показаны энергетические профили реакции восстановления рецепторного (DARK) состояния из сигнального (LIGHT): синим показано сечение ППЭ для нативного белка, красным для мутантной формы, содержащей фторированный тирозин. Справа красным выделен атом водорода тирозина, по которому проходит замещение на фтор.....	144
Рис. 4.22. Конформации хромофорной области мутанта Q63E. Расстояния показаны для водородных связей.	145
Рис. 4.23. Сравнение экспериментальных (синим) [172] и рассчитанных в работе (красным курсивом) значений максимумов полос поглощения и вертикальных энергий возбуждения, соответственно.	145
Рис. 4.24. Три возможные области передачи сигнала от BLUF к EAL домену. Здесь и далее фиолетовым цветом показан мономер А, а зеленым – В.....	147
Рис. 4.25. Область связывания петли $\alpha 3\alpha 4$ BLUF домена с EAL доменом. Здесь и далее в разделе 4.2.2 серым показаны атомы углерода, красным — кислорода, синим – азота.....	151
Рис. 4.26. Область связывания $\alpha 4$ спирали BLUF домена с EAL доменом.	153
Рис. 4.27. Область связывания $\alpha 4$ спирали BLUF домена с EAL доменом.	153
Рис. 4.28. Возможные варианты образования дисульфидных мостиков для мутанта Ser309Cys—Ser312Cys белка BlrP1.	154
Рис. 4.29. (А) Равновесная геометрическая конфигурация флавина с 5 молекулами воды в основном электронном состоянии S_0 (верхние значения) и возбужденном S_1 (нижние значения), полученные методами DFT/PBE0/cc-pvdz и CASSCF(8/7)/cc-pvdz соответственно. (В) Разность электронной плотности S_1-S_0 рассчитанная в минимуме на поверхности S_0 ($S_{0,min}$) методом XMCQDPT2/CASSCF(12/11)/cc-pvdz. Розовый и голубой цвета относятся к положительному и отрицательному	

значениям разностной электронной плотности, соответственно. (С)	
Альтернирование связей $S_{1,min}-S_{0,min}$. Положительные значения соответствуют удлинению связей в $S_{1,min}$ по сравнению с $S_{0,min}$. Красные сплошные линии и синие пунктирные соответствуют данным для комплекса флавина с водой и флавина в вакууме.	156
Рис. 4.30. Две различные конформации боковой цепи Gln489 в iLOV. (А) Распределение расстояний между атомами O4 флавина и Nε глутамина (малиновая кривая) и соответствующая накопленная вероятность (зелёная кривая). (В) Две конформации глутамина Gln _{in} и Gln _{out}	158
Рис. 4.31. (А,В) Ключевые расстояния в хромофор-содержащей области в двух различных конформациях iLOV Gln _{in} (А) и Gln _{out} (В) в $S_{0,min}$. (С) Альтернирование связей $S_{1,min}-S_{0,min}$. Положительные значения соответствуют удлинению связей в $S_{1,min}$ относительно $S_{0,min}$. Красные сплошные и синие пунктирные линии соответствуют конформациям Gln _{out} и Gln _{in} в iLOV.....	159
Рис. 4.32. Дипольные моменты перехода $S_{0,min} \rightarrow S_1$ (сплошная линия) и $S_{1,min} \rightarrow S_0$ (пунктирная линия) в хромофорной группе белка iLOV.	160
Рис. 4.33. Распределения длин водородных связей между лизином и флавином в iLOV Q489K, полученные по расчетам МД с КМ/ММ потенциалами (А,В). (С) Длины водородных связей (в Å) в равновесной геометрической конфигурации основного электронного состояния $S_{0,min}$ в iLOV Q489K, изменения в расстояниях (более 0.020 Å) при переходе $S_{0,min} \rightarrow S_{1,min}$ обозначены на рисунке красным и синим. Отрицательные значения соответствуют уменьшению расстояний в геометрии $S_{1,min}$	161
Рис. 4.34. Рассчитанные спектры поглощения (сплошными линиями) и флуоресценции (пунктирными линиями) для iLOV (синим), iLOV-Gln _{out} (коричневым) и iLOV-Q489K (малиновым).	162
Рис. 5.1. Структуры хромофорных групп белков GFP, TagRFP и KFP.	167
Рис. 5.2. Равновесная геометрическая конфигурация основного электронного состояния фрагмента хромофор-содержащей области TagRFP. Ключевые	

расстояния показаны в Å. Верхнее значение получено в молекулярном кластере, среднее – методом КМ/ММ, а нижнее по данным РСА.	168
Рис. 5.3. Дипольные моменты перехода в хромофоре TagRFP. Верхняя часть соответствует переходу из минимума на поверхности S_0 , $S_{0,\min} \rightarrow S_1$ переход; нижняя часть соответствует переходу из минимума на поверхности S_1 , $S_{1,\min} \rightarrow S_0$ переход. Расстояния (в Å) показывают длины связей в мостиковом фрагменте. Стрелками показаны дипольные моменты перехода, направленные между атомами O и N3. Вставка справа сверху показывает существенное отклонение от планарности хромофора.	169
Рис. 5.4. Равновесная геометрическая конфигурация основного электронного состояния фрагмента хромофор-содержащей области KFP. Ключевые расстояния показаны в Å. Двойной стрелкой показан дипольный момент перехода $S_{0,\min} \rightarrow S_1$	171
Рис. 5.5. Дипольный момент перехода для анионной формы хромофора GFP, полученный в данной работе (черная жирная линия) и в работе [233] (голубым пунктиром).	171
Рис. 5.6. Структура тетрамерного комплекса TagRFP-L23-KFP. Стрелками показаны возможные направления процесса. A_1 - A_4 – мономеры акцептора, D – донор, а $k_{DA,1}$ - $k_{DA,4}$ – соответствующие им константы скоростей FRET.	173
Рис. 5.7. Димерная структура мутантной формы белка KillerRed Val44Ala, полученная по данным РСА, PDB ID: 4B30 [237]. Дипольные моменты перехода обозначены сплошными стрелками, пунктиром показано направление между хромофорами. В нижней части показаны углы между соответствующими векторами.	174
Рис. 5.8. Модельная система, использованная для молекулярно-динамических расчетов. Красным показан олигопептид, желтыми и синими шарами показаны ионы натрия и хлора, соответственно.	176
Рис. 5.9. Структура сенсора TagRFP-M4-KFP. Красным выделена гидрофобная область линкера, зеленым – специфический мотив, распознаваемый каспазой-3.	176

Рис. 5.10. Распределения по временам жизни слева и расстояниям справа. Синим, красным и черным показаны системы, содержащие олигопептиды L23, M4 и M4D, соответственно.....	177
Рис. 5.11. Трехмерная структура сенсора на основе тербий-связывающего пептида и флуоресцентного белка TagRFP.	179
Рис. 5.12. Распределения по расстояниям между донором и акцептором (слева) и распределения по временам жизни флуоресценции (справа).....	179
Рис. 5.13. Транс- и цис- изомеры хромофора белка asFP595 (или KFP). Во вставке показаны двугранные углы, которые использовались в качестве координаты реакции при моделировании.	181
Рис. 5.14. Профили свободной энергии изомеризации хромофора в анионной (красным) и нейтральной (зеленым) формах в белке asFP595 и анионной форме белка KFP (синим).....	182
Рис. 5.15. Зеленый флуоресцентный белок с хромофором в анионной форме.....	184
Рис. 5.16. Молекулярный кластер, описывающий хромофорный карман GFP.	185
Рис. 5.17. Разности электронных плотностей состояний основного и первого возбужденного – S_1-S_0 (слева) и основного и второго возбужденно S_2-S_0 (справа), полученные методом CIS/6-31G**(2+,+) для хромофора. Здесь и далее в текущем главе фиолетовым показаны области уменьшения электронной плотности, красным – увеличения.	188
Рис. 5.18. Разности электронных плотностей состояний основного и первого возбужденного – S_1-S_0 (слева снизу), основного и второго возбужденно S_2-S_0 (справа сверху) и основного и третьего возбужденно S_3-S_0 (справа снизу), полученные методом CIS/6-31G**(2+,+) для системы Chro + Wat.....	189
Рис. 5.19. Разности электронных плотностей состояний основного и первого возбужденного – S_1-S_0 (слева) и основного и второго возбужденно S_2-S_0 (справа), полученные методом CIS/6-31G**(2+,+) для системы Chro + His.....	189
Рис. 5.20. Разности электронных плотностей состояний основного и первого возбужденного – S_1-S_0 (слева) и основного и второго возбужденно S_2-S_0 (справа), полученные методом CIS/6-31G**(2+,+) для системы Chro + Arg.	190

Рис. 5.21. Вертикальные энергии оптически разрешенных переходов (синим), ионизации (розовым), образования CTTS-подобных состояний (зеленым) в рамках метода CIS/6-31G**(2+,+)	191
Рис. 5.22. Разности электронных плотностей состояний основного и первого возбужденного – S_1-S_0 (слева), основного и второго возбужденно S_2-S_0 (в центре) и основного и третьего возбужденно S_3-S_0 (справа) полученные методом CIS/6-31G**(2+,+) для системы Chro + Arg + Wat.	191
Рис. 5.23. Разности электронных плотностей состояний основного и первого возбужденного – S_1-S_0 (слева) и основного и второго возбужденно S_2-S_0 (справа), полученные методом CIS/6-31G**(2+,+) для системы Chro + Arg + His.	192
Рис. 5.24. Разности электронных плотностей состояний основного и первого возбужденного – S_1-S_0 (слева) и основного и второго возбужденно S_2-S_0 (справа), полученные методом CIS/6-31G**(2+,+) для системы Chro + Arg + His + Wat.	192
Рис. 5.25. Вертикальные энергии оптически разрешенных переходов (синим), образования CTTS-подобных состояний (зеленым) в рамках метода SOS-CIS(D)/6-31G**(2+,+)	193
Рис. 5.26. Энергии трех низших синглетных возбужденных уровней (слева снизу), относительная энергия основного состояния систем с различным расположением молекулы воды (справа сверху) и рассчитанные силы осцилляторов (справа снизу), полученные методом CIS/6-31G**(2+,+) для систем Chro + Wat с различным значением R.	195

Список таблиц

Таблица 1.1. Ключевые расстояния в структуре фермент-субстратного комплекса.	30
Таблица 1.2. Ключевые расстояния в структуре первого переходного состояния TS1 ^a	30
Таблица 1.3. Ключевые расстояния в структуре тетраэдрического интермедиата TI ^a	31
Таблица 1.4. Относительные энергии стационарных точек и вклады в общую энергию системы. В каждом случае за 0 ккал/моль принята энергия ES. Все энергии представлены в ккал/моль.	32
Таблица 2.1. Модельные системы, рассмотренные в работе [60].	41
Таблица 2.2. Ключевые геометрические параметры комплексов ES.	54
Таблица 2.3. Ключевые геометрические параметры интермедиатов I.	54
Таблица 2.4. Расстояние Gly-O...H-Wat* (в Å) в системах с различными сольватными оболочками (столбцы соответствуют разным толщинам оболочек). ..	57
Таблица 2.5. Ключевые геометрические параметры, полученные для фермент-субстратных комплексов в КМ/ММ расчетах с различными способами описания КМ части.	58
Таблица 2.6. Ключевые расстояния в стационарных точках вдоль реакционных путей, полученных методами PBE0-D3/6-31G**/CHARMM (обозначено PBE0 в таблице), DFTB2/3OB/CHARMM (DFTB2) и DFTB3/3OB/CHARMM (DFTB3). ...	61
Таблица 2.7. Относительные свободные энергии переходного состояния ΔF^\ddagger и интермедиата ΔF первой стадии реакции, полученные для нативного фермента и мутантной формы Glu116Asp. WHAM и UI относятся к способу статистической обработки результатов расчета.	67
Таблица 2.8. Ключевые расстояния, полученные в результате КМ/ММ минимизации (Opt), КМ/ММ-МД (через 10 пс – MD 10 ps и через 60 пс – MD 60 ps) расчетов и из данных PCA(X-ray, PDB ID: 1L6J). Все расстояния приведены в Å, значения в скобках соответствуют стандартным отклонениям.	75

Таблица 2.9. Параметры координационной сферы цинка в МД расчетах: представлены средние значения и стандартные отклонения в Å. Звездочка в правой нижней ячейке обозначает, что в координационную сферу цинка входит молекула воды, однако происходит её замена на другие молекулы воды из раствора вдоль траектории.....	76
Таблица 2.10. Ключевые расстояния, полученные в результате КМ/ММ минимизации (Opt) и КМ/ММ-МД расчетов (MD) для систем MMP-2-APP-IP и MMP-2-APP-IP ^{ZnF} и по данным РСА (X-ray, PDB ID: 3AYU). Все расстояния приведены в Å, значения в скобках соответствуют стандартным отклонениям.	79
Таблица 3.1. Сравнение ключевых геометрических параметров в динамике фермент-субстратных комплексов нативного Ras-GAP ^{G13V} Ras-GAP и ^{G12V} Ras-GAP. Критериями наличия водородной связи (X-H...Y) являются $r(H...Y) < 2.2 \text{ \AA}$ и $\angle(X-H...Y) > 120^\circ$. В строке «%» указана доля конформаций, в которых есть водородная связь или доля продуктивных конформации с $r(Py...O-Wat) < 3.4 \text{ \AA}$	103
Таблица 3.2. Колебательные частоты (в см ⁻¹), изотопные сдвиги (в скобках в см ⁻¹) и интенсивности (в квадратных скобках в км/моль) для фермент-субстратного комплекса. Экспериментальные данные (Экс) соответствуют Ras·NF1·GTP·H ₂ O комплексу [124]. Рассчитанные величины представлены для двух модельных систем КМ1 и КМ2.....	106
Таблица 4.1. Наблюдаемые [148] и рассчитанные величины колебательных частот и изотопные сдвиги. В скобках указаны изотопные сдвиги для изотопомеченных систем N3-D, ¹⁵ N и ¹³ C соответственно.	129
Таблица 4.2. Расстояния между тирозином и флавином, полученные для систем с различными конформациями Met106, отличающимися значениями двугранного угла C _β -C _γ -S-C _ε (χ), полученные усреднением вдоль МД траектории и по расчетам равновесных геометрических конфигураций методом КМ/ММ, а также по данным РСА.	133
Таблица 4.3. Стабильность водородных связей между аминокислотными остатками BLUF и EAL доменов вдоль траекторий 5 нс и 20 нс. Чувствительность результата к выбранному критерию длины связи R и угла Φ.....	148

Таблица 4.4. Стабильность водородных связей между аминокислотными остатками BLUF и EAL доменов. Результаты независимых МД траекторий длиной 5 нс показаны в колонках 1, 2 и 3. Пустые ячейки указывают на стабильность меньше 5 %.....	150
Таблица 4.5. Длины волн (нм) и соответствующие им энергии вертикальных переходов (в скобках в эВ), а также соответствующие им дипольные моменты переходов (в квадратных скобках в ае). Верхний ряд значений в колонке для iLOV соответствует конформации Gln _{out} , а нижний – Gln _{in}	157
Таблица 5.1. Расстояния между донором и акцепторами (R), рассчитанные значения ориентационных факторов (k^2) и соответствующие константы скоростей ($k_{DA,i}$) для системы, показанной на рис. 5.6.	173
Таблица 5.2. Характеристики сенсора TagRFP-M4-KFP.....	178
Таблица 5.3. Разности энергий Гельмгольца цис- и транс- конформаций $\Delta F(\text{ц-т})$, соответствующие им константы равновесия K_c , энергии активации $\Delta F^\ddagger(\text{ц-т})$ и рассчитанные по ТАК константы скорости k и времена полупревращения $\tau_{1/2}$. Экспериментальные значения $\tau_{1/2}(\text{эксп.})$ взяты из работы [221]. В названии модельной системы минус в скобках соответствует анионной форме хромофора, а 0 – нейтральной.	183
Таблица 5.4. Энергии вертикальных переходов в модельных системах, рассчитанные методом CIS в различных базисах. О.Р. – оптически разрешенный переход, CTTS – CTTS-подобное состояние, в скобках показаны рассчитанные силы осцилляторов. В первой колонке в скобках указан заряд системы.	187

Список литературы

- [1] Норман Г.Э., Орехов Н.Д., Писарев В.В., Смирнов Г.С., Стариков С.В., Стегайлов В.В., Янилкин А.В., Зачем и какие суперкомпьютеры экзафлопсного класса нужны в естественных науках. // Программные системы теория и приложения - 2015. - V. 6. - P. 243–311.
- [2] Хренова М.Г., Коц Е.Д., Кулакова А.М., Лычко Л.А., Немухин А.В., Суперкомпьютерное моделирование молекулярного полиморфизма ферментов человека. // Суперкомпьютерные технологии в науке, образовании и промышленности. Под редакцией В.А. Садовниченко, Г.И. Савина, Вл.В. Воеводина. Изд-во Московского университета Москва - 2016.
- [3] Хренова М.Г., Григоренко Б.Л., Немухин А.В., Суперкомпьютеры и квантовая биохимия. // Суперкомпьютерные технологии в науке, образовании и промышленности. Под редакцией В.А. Садовниченко, Г.И. Савина, Вл.В. Воеводина. Изд-во Московского университета Москва - 2009. - V. 1. - P. 22:1–5.
- [4] Jensen, F. Introduction to Computational Chemistry. John Wiley & Sons Ltd.: 2007.
- [5] MacKerell A.D., Bashford D., Bellott M., Dunbrack R.L., Evanseck J.D., Field M.J., Fischer S., Gao J., Guo H., Ha S., Joseph-McCarthy D., Kuchnir L., Kuczera K., Lau F.T.K., Mattos C., Michnick S., Ngo T., Nguyen D.T., Prodhom B., Reiher W.E., Roux B., Schlenkrich M., Smith J.C., Stote R., Straub J., Watanabe M., Wiórkiewicz-Kuczera J., Yin D., Karplus M., MacKerell, Bashford D., Bellott M., Dunbrack Jr. R.L., Evanseck J.D., Field M.J., Fischer S., Gao J., Guo H., Ha S., Joseph-McCarthy D., Kuchnir L., Kuczera K., Lau F.T.K., Mattos C., Michnick S., Ngo T., Nguyen D.T., Prodhom B., Reiher W.E., Roux B., Schlenkrich M., Smith J.C., Stote R., Straub J., Watanabe M., Wiórkiewicz-Kuczera J., Yin D., Karplus M., All-Atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. // J. Phys. Chem. B - 1998. - V. 102. - P. 3586–3616.
- [6] Cornell W.D., Cieplak P., Bayly C.I., Gould I.R., Merz K.M., Ferguson D.M., Spellmeyer D.C., Fox T., Caldwell J.W., Kollman P.A., A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids, and organic molecules. // J. Am. Chem. Soc. - 1995. - V. 117. - P. 5179–5197.
- [7] Schmid N., Eichenberger A.P., Choutko A., Riniker S., Winger M., Mark A.E.,

- Gunsteren W.F. van, Definition and testing of the GROMOS force-field versions 54A7 and 54B7. // *Eur. Biophys. J.* - 2011. - V. 40. - P. 843–856.
- [8] Monticelli L., Kandasamy S.K., Periole X., Larson R.G., Tieleman D.P., Marrink S.-J., The MARTINI Coarse-Grained Force Field: Extension to Proteins. // *J. Chem. Theory Comput.* - 2008. - V. 4. - P. 819–834.
- [9] Бажанова З.Г., Хренова М.Г., Немухин А.В., Расчеты взаимодействий в биомолекулярных системах: сравнение квантовых и классических подходов. // *Вычислительные методы и программирование Новые вычислительные технологии (Электронный научный журнал)* - 2011. - V. 12. - P. 298–302.
- [10] Lunin V.Y., Grum-Grzhimailo A.N., Gryzlova E. V, Sinitsyn D.O., Petrova T.E., Lunina N.L., Balabaev N.K., Tereshkina K.B., Stepanov A.S., Krupyanskii Y.F., Efficient calculation of diffracted intensities in the case of nonstationary scattering by biological macromolecules under XFEL pulses. // *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* - 2015. - V. 71. - P. 293–303.
- [11] Krupyanskii Y.F., Esin S.V., Eshenko G.V., Mikhailyuk M.G., Spatio – temporal features of protein specific motions. The influence of hydration. // *J. Biol. Phys.* - 2002. - V. 28. - P. 139–145.
- [12] Phillips J.C., Braun R., Wang W., Gumbart J., Tajkhorshid E., Villa E., Chipot C., Skeel R.D., Kalé L., Schulten K., Scalable molecular dynamics with NAMD. // *J. Comput. Chem.* - 2005. - V. 26. - P. 1781–1802.
- [13] Koch, W. and Holthausen, M. C. A chemist's guide to density functional theory. John Wiley & Sons Ltd.: 2001.
- [14] Vener M.V., Levina E.O., Astakhov A.A., Tsirelson V.G., Specific features of the extra strong intermolecular hydrogen bonds in crystals: Insights from the theoretical charge density analysis. // *Chem. Phys. Lett.* - 2015. - V. 638. - P. 233–236.
- [15] Никитенко Н.Г., Шестаков А.Ф., Механизм термического распада ацетилацетоната диметилзолота(III): квантово-химическое моделирование. // *Кинетика и катализ* - 2014. - V. 55. - P. 421–429.
- [16] Никитенко Н.Г., Шестаков А.Ф., Квантово-химическое исследование активации C–H-связи в метане и метаноле кверцетиновыми комплексами Au(I) в мягких условиях. // *Доклады Академии наук* - 2013. - V. 450. - P. 181–184.
- [17] Perdew J.P., Burke K., Ernzerhof M., Generalized gradient approximation made

simple. // *Phys. Rev. Lett.* - 1996. - V. 77. - P. 3865–3868.

[18] Becke A.D., Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. // *Phys. Rev. A* - 1988. - V. 38. - P. 3098–3100.

[19] Lee C., Yang W., Parr R.G., Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. // *Phys. Rev. B* - 1988. - V. 37. - P. 785–789.

[20] Vandevondele J., Krack M., Mohamed F., Parrinello M., Chassaing T., Hutter J., Quickstep: Fast and accurate density functional calculations using a mixed Gaussian and plane waves approach. // *Comput. Phys. Commun.* - 2005. - V. 167. - P. 103–128.

[21] Lippert G., Hutter J., Parrinello M., A hybrid Gaussian and plane wave density functional scheme. // *Mol. Phys.* - 1997. - V. 92. - P. 477–487.

[22] Adamo C., Barone V., Toward reliable density functional methods without adjustable parameters: The PBE0 model. // *J. Chem. Phys.* - 1999. - V. 110. - P. 6158.

[23] Becke A.D., Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. // *J. Chem. Phys.* - 1993. - V. 98. - P. 5648.

[24] Zhao Y., Lynch B.J., Truhlar D.G., Development and assessment of a new hybrid density functional model for thermochemical kinetics. // *J. Phys. Chem. A* - 2004. - V. 108. - P. 2715–2719.

[25] Riplinger C., Sandhoefer B., Hansen A., Neese F., Natural triple excitations in local coupled cluster calculations with pair natural orbitals. // *J. Chem. Phys.* - 2013. - V. 139. - P. 134101.

[26] Liakos D.G., Neese F., Is it possible to obtain coupled cluster quality energies at near density functional theory cost? domain-based local pair natural orbital coupled cluster vs modern density functional theory. // *J. Chem. Theory Comput.* - 2015. - V. 11. - P. 4054–4063.

[27] Distasio R.A., Head-Gordon M., Optimized spin-component scaled second-order Møller-Plesset perturbation theory for intermolecular interaction energies. // *Mol. Phys.* - 2007. - V. 105. - P. 1073–1083.

[28] Grimme S., Improved second-order Møller-Plesset perturbation theory by separate scaling of parallel- and antiparallel-spin pair correlation energies. // *J. Chem. Phys.* - 2003. - V. 118. - P. 9095–9102.

[29] Rhee Y.M., Head-Gordon M., Scaled second-order perturbation corrections to

configuration interaction singles: Efficient and reliable excitation energy methods. // J. Phys. Chem. A - 2007. - V. 111. - P. 5314–5326.

[30] Nakano H., Uchiyama R., Hirao K., Quasi-degenerate perturbation theory with general multiconfiguration self-consistent field reference functions. // J. Comput. Chem. - 2002. - V. 23. - P. 1166–1175.

[31] Granovsky A.A., Extended multi-configuration quasi-degenerate perturbation theory: The new approach to multi-state multi-reference perturbation theory. // J. Chem. Phys. - 2011. - V. 134. - P. 214113.

[32] Warshel A., Levitt M., Theoretical studies of enzymic reactions: Dielectric, electrostatic and steric stabilization of the carbonium ion in the reaction of lysozyme. // J. Mol. Biol. - 1976. - V. 103. - P. 227–249.

[33] Bakowies D., Thiel W., Hybrid models for combined quantum mechanical and molecular mechanical approaches. // J. Phys. Chem. - 1996. - V. 100. - P. 10580–10594.

[34] Rosta E., Klähn M., Warshel A., Towards Accurate Ab Initio QM/MM Calculations of Free-Energy Profiles of Enzymatic Reactions. // J. Phys. Chem. B - 2006. - V. 110. - P. 2934–2941.

[35] Lin H., Truhlar D.G., QM/MM: What have we learned, where are we, and where do we go from here? // Theor. Chem. Acc. - 2007. - V. 117. - P. 185–199.

[36] Цирельсон, В. Г. Квантовая химия. Молекулы, молекулярные системы и твердые тела. Бином. Лаборатория знаний: Москва 2010.

[37] Grigorenko B.L., Khrenova M.G., Nilov D.K., Nemukhin A. V., Švedas V.K., Catalytic cycle of penicillin acylase from *Escherichia coli*: QM/MM modeling of chemical transformations in the enzyme active site upon penicillin G hydrolysis. // ACS Catal. - 2014. - V. 4. - P. 2521–2529.

[38] Kuznetsov A.S., Volynsky P.E., Efremov R.G., Role of the lipid environment in the dimerization of transmembrane domains of glycophorin A. // Acta Naturae - V. 7. - P. 122–127.

[39] Dubovskii P. V, Konshina A.G., Efremov R.G., Cobra cardiotoxins: membrane interactions and pharmacological potential. // Curr. Med. Chem. - 2014. - V. 21. - P. 270–87.

[40] Klenina I.B., Makhneva Z.K., Moskalenko A.A., Gudkov N.D., Bolshakov M.A., Pavlova E.A., Proskuryakov I.I., Singlet-triplet fission of carotenoid excitation in light-

harvesting LH2 complexes of purple phototrophic bacteria. // *Biochem.* - 2014. - V. 79. - P. 235–241.

[41] Klenina I.B., Makhneva Z.K., Moskalenko A.A., Proskuryakov I.I., Carotenoid triplet states in vitro and in light-harvesting complexes of the phototrophic bacterium *Allochrochromatium minutissimum*. // *Dokl. Biochem. Biophys.* - 2011. - V. 441. - P. 290–293.

[42] Madigan M.T., Anoxygenic phototrophic bacteria from extreme environments. // *Photosynth. Res.* - 2003. - V. 76. - P. 157–171.

[43] Kimura Y., Yu L.J., Hirano Y., Suzuki H., Wang Z.Y., Calcium ions are required for the enhanced thermal stability of the light-harvesting-reaction center core complex from thermophilic purple sulfur bacterium *thermochromatium tepidum*. // *J. Biol. Chem.* - 2009. - V. 284. - P. 93–99.

[44] Jakob-Grun S., Radeck J., Braun P., Ca²⁺-binding reduces conformational flexibility of RC-LH1 core complex from thermophile *Thermochromatium tepidum*. // *Photosynth. Res.* - 2012. - V. 111. - P. 139–147.

[45] Roszak A.W., Howard T.D., Southall J., Gardiner A.T., C.J. L., Isaacs N.W., Cogdell R.J., Crystal structure of the RC-LH1 core complex from *Rhodospseudomonas palustris*. // *Science* - 2003. - V. 302. - P. 1969–1972.

[46] Nogi T., Fathir I., Kobayashi M., Nozawa T., Miki K., Crystal structures of photosynthetic reaction center and high-potential iron-sulfur protein from *Thermochromatium tepidum*: Thermostability and electron transfer. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* - 2000. - V. 97. - P. 13561–13566.

[47] Cherezov V., Clogston J., Papiz M.Z., Caffrey M., Room to move: crystallizing membrane proteins in swollen lipidic mesophases. // *J. Mol. Biol.* - 2006. - V. 357. - P. 1605–1618.

[48] Vanommeslaeghe K., Hatcher E., Acharya C., Kundu S., Zhong S., Shim J., Darian E., Guvench O., Lopes P., Vorobyov I., Mackerell A.D., CHARMM general force field: A force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields. // *J. Comput. Chem.* - 2009. - V. 31. - P. 671–690.

[49] Немухин А.В., Хренова М.Г., Поляков И.В., Григоренко Б.Л., Московский А.А., Компьютерное моделирование компонентов фоторецепторных систем. // *Известия РАН. Серия химическая* - 2014. - P. 1703–1709.

- [50] Хренова М.Г., Немухин А.В., Григоренко Б.Л., Московский А.А., Оптические переходы в светособирающих комплексах бактериальных фотосинтетических центров. // Вестник Московского университета. Серия 2 Химия - 2014. - V. 69. - P. 199–202.
- [51] Хренова М.Г., Поляков И.В., Григоренко Б.Л., Немухин А.В., Молекулярная модель светособирающего комплекса LH1 фотосинтетического центра бактерий *Thermochromatium tepidum*. // Вестник Московского университета. Серия 2 Химия - 2013. - V. 54. - P. 78–80.
- [52] Khrenova M.G., Nemukhin A. V., Grigorenko B.L., Wang P., Zhang J.P., All-atom structures and calcium binding sites of the bacterial photosynthetic LH1-RC core complex from *Thermochromatium tepidum*. // *J. Mol. Model.* - 2014. - V. 20. - P. 2287:1–2287:6.
- [53] Niwa S., Yu L.-J., Takeda K., Hirano Y., Kawakami T., Wang-Otomo Z.-Y., Miki K., Structure of the LH1–RC complex from *Thermochromatium tepidum* at 3.0 Å. // *Nature* - 2014. - V. 508. - P. 228–232.
- [54] Khrenova M.G., Grigorenko B.L., Zhang J.-P., Wang P., Nemukhin A. V., Computational characterization of the all-atom structure and the calcium binding sites of the LH1–RC core complex from *Thermochromatium tepidum*. // *J. Theor. Comput. Chem.* - 2016. - P. 1650020.
- [55] Matrix metalloproteinase inhibitors. Specificity of binding and structure-activity relationships. Springer: Basel, Switzerland 2012.
- [56] Overall C.M., Kleifeld O., Tumour microenvironment — Opinion: Validating matrix metalloproteinases as drug targets and anti-targets for cancer therapy. // *Nat. Rev. Cancer* - 2006. - V. 6. - P. 227–239.
- [57] Jacobsen J., Major Jourden J.L., Miller M.T., Cohen S.M., To bind zinc or not to bind zinc: an examination of innovative approaches to improved metalloproteinase inhibition. // *Biochim. Biophys. Acta* - 2010. - V. 1803. - P. 72–94.
- [58] Dormán G., Cseh S., Hajdú I., Barna L., Kónya D., Kupai K., Kovács L., Ferdinandy P., Dormán, György, Cseh, Sandor, Hajdu, Istvan, Matrix metalloproteinase inhibitors. A critical appraisal of design principles and proposed therapeutic utility. // *Drugs* - 2010. - V. 70. - P. 949–964.
- [59] Ndinguri M.W., Bhowmick M., Tokmina-Roszyk D., Robichaud T.K., Fields G.B.,

Peptide-based selective inhibitors of matrix metalloproteinase-mediated activities. // *Molecules* - 2012. - V. 17. - P. 14230–14248.

[60] Pelmeshnikov V., Siegbahn P.E.M., Catalytic mechanism of matrix metalloproteinases: Two-layered ONIOM study. // *Inorg. Chem.* - 2002. - V. 41. - P. 5659–5666.

[61] Antonczak S., Monard G., Ruiz-Lopez M., Rivail J.-L., Insights in the peptide hydrolysis mechanism by thermolysin: A theoretical QM/MM study. // *J. Mol. Model.* - 2000. - V. 6. - P. 527–538.

[62] Hay P.J., Wadt W.R., Ab initio effective core potentials for molecular calculations. Potentials for K to Au including the outermost core orbitals. // *J. Chem. Phys.* - 1985. - V. 82. - P. 299.

[63] Díaz D.N., Suárez D.D., Peptide Hydrolysis Catalyzed by Matrix Metalloproteinase 2: A Computational Study. // *J. Phys. Chem. B* - 2008. - V. 112. - P. 8412–8424.

[64] Díaz N., Suárez D., Molecular dynamics simulations of the active matrix metalloproteinase-2: Positioning of the N-terminal fragment and binding of a small peptide substrate. // *Proteins* - 2008. - V. 72. - P. 50–61.

[65] Dhanaraj V., Ye Q.-Z., Johnson L., Hupe D., Ortwine D., Dunbar, Jr J., Rubin J., Pavlovsky A., Humblet C., Blundell T., X-ray structure of a hydroxamate inhibitor complex of stromelysin catalytic domain and its comparison with members of the zinc metalloproteinase superfamily. // *Structure* - 1996. - V. 4. - P. 375–386.

[66] Vasilevskaya T., Khrenova M.G., Nemukhin A. V., Thiel W., Mechanism of proteolysis in matrix metalloproteinase-2 revealed by QM/MM modeling. // *J. Comput. Chem.* - 2015. - V. 36. - P. 1621–1630.

[67] Vasilevskaya T., Khrenova M.G., Nemukhin A. V., Thiel W., Methodological aspects of QM/MM calculations: A case study on matrix metalloproteinase-2. // *J. Comput. Chem.* - 2016.

[68] Benighaus T., Thiel W., A General boundary potential for hybrid QM/MM simulations of solvated biomolecular systems. // *J. Chem. Theory Comput.* - 2009. - V. 5. - P. 3114–3128.

[69] Elstner M., Porezag D., Jungnickel G., Elsner J., Haugk M., Frauenheim T., Suhai S., Seifert G., Self-consistent-charge density-functional tight-binding method for simulations of complex materials properties. // *Phys. Rev. B* - 1998. - V. 58. - P. 7260–

7268.

[70] Gaus M., Cui Q., Elstner M., DFTB3: Extension of the self-consistent-charge density-functional tight-binding method (SCC-DFTB). // *J. Chem. Theory Comput.* - 2011. - V. 7. - P. 931–948.

[71] Gaus M., Lu X., Elstner M., Cui Q., Parameterization of DFTB3/3OB for sulfur and phosphorus for chemical and biological applications. // *J. Chem. Theory Comput.* - 2014. - V. 10. - P. 1518–1537.

[72] Gaus M., Goez A., Elstner M., Parametrization and benchmark of DFTB3 for organic molecules. // *J. Chem. Theory Comput.* - 2013. - V. 9. - P. 338–354.

[73] Lu X., Gaus M., Elstner M., Cui Q., Parametrization of DFTB3/3OB for magnesium and zinc for chemical and biological applications. // *J. Phys. Chem. B* - 2015. - V. 119. - P. 1062–1082.

[74] Vasilevskaya T., Khrenova M., Nemukhin A., Thiel W., Reaction mechanism of matrix metalloproteinases with a catalytically active zinc ion studied by the QM(DFTB)/MM simulations. // *Mendeleev Commun.* - 2016. - V. 26. - P. 209–211.

[75] Ivchenko O., Bachert P., Imhof P., Umbrella sampling of proton transfer in a creatine–water system. // *Chem. Phys. Lett.* - 2014. - V. 600. - P. 51–55.

[76] Li T., Cui Y., Mathaga J., Kumar R., Kuroda D.G., Hydration and vibrational dynamics of betaine (N,N,N-trimethylglycine). // *J. Chem. Phys.* - 2015. - V. 142. - P. 212438.

[77] Hassanali A.A., Zhong D., Singer S.J., An AIMD study of the CPD repair mechanism in water: reaction free energy surface and mechanistic implications. // *J. Phys. Chem. B* - 2011. - V. 115. - P. 3848–3859.

[78] Mironov V.A., Khrenova M.G., Lychko L.A., Nemukhin A. V., Computational characterization of the chemical step in the GTP hydrolysis by Ras-GAP for the wild-type and G13V mutated Ras. // *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* - 2015. - V. 83. - P. 1046–1053.

[79] Cha J., Auld D.S., Site-directed mutagenesis of the active site glutamate in human matrilysin: investigation of its role in catalysis. // *Biochemistry* - 1997. - V. 36. - P. 16019–16024.

[80] Crabbe T., Zucker S., Cockett M.I., Willenbrock F., Tickle S., O’Connell J.P., Scothern J.M., Murphy G., Docherty A.J.P., Mutation of the active site glutamic acid of

- human gelatinase A: Effects on latency, catalysis, and the binding of tissue inhibitor of metalloproteinases-1. // *Biochemistry* - 1994. - V. 33. - P. 6684–6690.
- [81] Park S., Khalili-Araghi F., Tajkhorshid E., Schulten K., Free energy calculation from steered molecular dynamics simulations using Jarzynski's equality. // *J. Chem. Phys.* - 2003. - V. 119. - P. 3559.
- [82] Bertini I., Calderone V., Fragai M., Luchinat C., Maletta M., Yeo K.J., Snapshots of the reaction mechanism of matrix metalloproteinases. // *Angew. Chemie Int. Ed.* - 2006. - V. 45. - P. 7952–7955.
- [83] Solomon A., Akabayov B., Frenkel A., Milla M.E., Sagi I., Key feature of the catalytic cycle of TNF- converting enzyme involves communication between distal protein sites and the enzyme catalytic core. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* - 2007. - V. 104. - P. 4931–4936.
- [84] Stack M.S., Gray R.D., The effect of pH, temperature, and D2O on the activity of porcine synovial collagenase and gelatinase. // *Arch. Biochem. Biophys.* - 1990. - V. 281. - P. 257–263.
- [85] Welgus H.G., Jeffrey J.J., Eisen A.Z., Human skin fibroblast collagenase. // *J. Biol. Chem.* - 1981. - V. 256. - P. 9516–9521.
- [86] Khrenova M.G., Solovyev I.D., Azev V.N., Lapshin G.D., Savitsky A.P., Oxoethylene derivative of the natural substrate as an inhibitor of matrix metalloproteinase MMP-2. // *Mendeleev Commun.* - 2016. - V. 26. - P. 207–208.
- [87] Khrenova M.G., Nemukhin A. V., Savitsky A.P., Computational characterization of ketone-ketal transformations at the active site of matrix metalloproteinases. // *J. Phys. Chem. B* - 2014. - V. 118. - P. 4345–4350.
- [88] Khrenova M.G., Savitsky A.P., Topol I.A., Nemukhin A. V., Exploration of the zinc finger motif in controlling activity of matrix metalloproteinases. // *J. Phys. Chem. B* - 2014. - V. 118. - P. 13505–13512.
- [89] Hu J., Fiten P., Steen P.E. Van den, Chaltin P., Opdenakker G., Simulation of evolution-selected propeptide by high-throughput selection of a peptidomimetic inhibitor on a capillary DNA sequencer platform. // *Anal. Chem.* - 2005. - V. 77. - P. 2116–24.
- [90] Higashi S., Miyazaki K., Identification of a region of b-amyloid precursor protein essential for its gelatinase A inhibitory activity. // *J. Biol. Chem.* - 2003. - V. 278. - P. 14020–14028.

- [91] Hashimoto H., Takeuchi T., Komatsu K., Miyazaki K., Sato M., Higashi S., Structural basis for matrix metalloproteinase-2 (MMP-2)-selective inhibitory action of b-amyloid precursor protein-derived inhibitor. // *J. Biol. Chem.* - 2011. - V. 286. - P. 33236–33243.
- [92] Higashi S., Miyazaki K., Identification of amino acid residues of the matrix metalloproteinase-2 essential for its selective inhibition by b-amyloid precursor protein-derived inhibitor. // *J. Biol. Chem.* - 2008. - V. 283. - P. 10068–10078.
- [93] Rayón V.M., Valdés H., Díaz N., Suárez D., Monoligand Zn(II) complexes: Ab initio benchmark calculations and comparison with density functional theory methodologies. // *J. Chem. Theory Comput.* - 2008. - V. 4. - P. 243–256.
- [94] Sprang S.R., G proteins, effectors and GAPs: structure and mechanism. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* - 1997. - V. 7. - P. 849–856.
- [95] Cox A.D., Der C.J., Ras history. // *Small GTPases* - 2010. - V. 1. - P. 2–27.
- [96] Malumbres M., Barbacid M., Timeline: RAS oncogenes: the first 30 years. // *Nat. Rev. Cancer* - 2003. - V. 3. - P. 459–465.
- [97] Haim M., The epidemiology of retinitis pigmentosa in Denmark. // *Acta Ophthalmol. Scand.* - 2002. - V. 80. - P. 1–34.
- [98] Veltel S., Gasper R., Eisenacher E., Wittinghofer A., The retinitis pigmentosa 2 gene product is a GTPase-activating protein for Arf-like 3. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* - 2008. - V. 15. - P. 373–380.
- [99] Prasad B R., Plotnikov N. V., Lameira J., Warshel A., Quantitative exploration of the molecular origin of the activation of GTPase. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* - 2013. - V. 110. - P. 20509–20514.
- [100] Glennon T.M., Villà J., Warshel A., How does GAP catalyze the GTPase reaction of Ras?: A computer simulation study. // *Biochemistry* - 2000. - V. 39. - P. 9641–9651.
- [101] Grigorenko B.L., Nemukhin A. V., Shadrina M.S., Topol I.A., Burt S.K., Mechanisms of guanosine triphosphate hydrolysis by Ras and Ras-GAP proteins as rationalized by ab initio QM/MM simulations. // *Proteins* - 2006. - V. 66. - P. 456–466.
- [102] Li G., Zhang X.C., GTP hydrolysis mechanism of Ras-like GTPases. // *J. Mol. Biol.* - 2004. - V. 340. - P. 921–932.
- [103] Martín-García F., Mendieta-Moreno J.I., López-Viñas E., Gómez-Puertas P., Mendieta J., The role of Gln61 in HRas GTP hydrolysis: A quantum

- mechanics/molecular mechanics study. // *Biophys. J.* - 2012. - V. 102. - P. 152–157.
- [104] Prakash P., Gorfe A.A., Overview of simulation studies on the enzymatic activity and conformational dynamics of the GTPase Ras. // *Mol. Simul.* - 2014. - V. 40. - P. 839–847.
- [105] Rudack T., Xia F., Schlitter J., Kötting C., Gerwert K., The role of magnesium for geometry and charge in GTP hydrolysis, revealed by quantum mechanics/molecular mechanics simulations. // *Biophys. J.* - 2012. - V. 103. - P. 293–302.
- [106] Shurki A., Warshel A., Why does the Ras switch “break” by oncogenic mutations? // *Proteins* - 2004. - V. 55. - P. 1–10.
- [107] Heesen H. te, Gerwert K., Schlitter J., Role of the arginine finger in Ras·RasGAP revealed by QM/MM calculations. // *FEBS Lett.* - 2007. - V. 581. - P. 5677–5684.
- [108] Xia F., Rudack T., Kötting C., Schlitter J., Gerwert K., The specific vibrational modes of GTP in solution and bound to Ras: a detailed theoretical analysis by QM/MM simulations. // *Phys. Chem. Chem. Phys.* - 2011. - V. 13. - P. 21451.
- [109] Carvalho A.T.P., Szeler K., Vavitsas K., Åqvist J., Kamerlin S.C.L., Modeling the mechanisms of biological GTP hydrolysis. // *Arch. Biochem. Biophys.* - 2015. - V. 582. - P. 80–90.
- [110] Phillips R.A., Hunter J.L., Eccleston J.F., Webb M.R., The mechanism of Ras GTPase activation by neurofibromin. // *Biochemistry* - 2003. - V. 42. - P. 3956–65.
- [111] Allin C., Ahmadian M.R., Wittinghofer A., Gerwert K., Monitoring the GAP catalyzed H-Ras GTPase reaction at atomic resolution in real time. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* - 2001. - V. 98. - P. 7754–7759.
- [112] Scheffzek K., Ahmadian M.R., Kabsch W., Wiesmüller L., Lautwein A., Schmitz F., Wittinghofer A., The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. // *Science* - 1997. - V. 277. - P. 333–8.
- [113] Khrenova M.G., Grigorenko B.L., Kolomeisky A.B., Nemukhin A. V., Hydrolysis of guanosine triphosphate (GTP) by the Ras-GAP protein complex: Reaction mechanism and kinetic scheme. // *J. Phys. Chem. B* - 2015. - V. 119. - P. 12838–12845.
- [114] Хренова М.Г., Коц Е.Д., Кулакова А.М., Поляков И.В., Моделирование реакции гидролиза гуанозинтрифосфата белковом комплексе RAS GAP. // *Вестник Московского университета. Серия 2 Химия* - 2016. - V. 57. - P. 7–10.
- [115] Миронов В.А., Лычко Л.А., Хренова М.Г., Особенности расчетов профилей

свободной энергии ферментативных реакций: Гидролиз гуанозинтрифосфата белковым комплексом Ras-GAP. // Вестник Московского университета. Серия 2 Химия - 2016. - V. 57. - P. 1–4.

[116] KINET, software for numerical modeling kinetics of complex chemical reactions. www.chem.msu.su/rus/teaching/KINET2012

[117] Chung H.H., Benson D.R., Schultz P.G., Probing the structure and mechanism of Ras protein with an expanded genetic code. // Science - 1993. - V. 259. - P. 806–9.

[118] Lammertsma K., Bharatam P.V., Keto \rightleftharpoons enol, imine \rightleftharpoons enamine, and nitro \rightleftharpoons aci-nitro tautomerism and their interrelationship in substituted nitroethylenes. Keto, imine, nitro, and vinyl substituent effects and the importance of H-bonding. // J. Org. Chem. - 2000. - V. 65. - P. 4662–70.

[119] Naumov P., Lee S.C., Ishizawa N., Jeong Y.G., Chung I.H., Fukuzumi S., New type of dual solid-state thermochromism: modulation of intramolecular charge transfer by intermolecular pi-pi interactions, kinetic trapping of the aci-nitro group, and reversible molecular locking. // J. Phys. Chem. A - 2009. - V. 113. - P. 11354–66.

[120] Dhaked D.K., Bharatam P. V., Nitro \rightleftharpoons aci-nitro tautomerism and E/Z isomeric preferences of nitroethenediamine derivatives: a quantum chemical study. // RSC Adv. - 2013. - V. 3. - P. 25268.

[121] Khrenova M.G., Grigorenko B.L., Mironov V.A., Nemukhin A. V., Why does mutation of Gln61 in Ras by the nitro analog NQln maintain activity of Ras-GAP in hydrolysis of guanosine triphosphate? // Proteins - 2015. - V. 83. - P. 2091–2099.

[122] Wey M., Lee J., Jeong S.S., Kim J., Heo J., Kinetic mechanisms of mutation-dependent harvey Ras activation and their relevance for the development of Costello syndrome. // Biochemistry - 2013. - V. 52. - P. 8465–79.

[123] Khrenova M.G., Mironov V.A., Grigorenko B.L., Nemukhin A. V., Modeling the role of G12V and G13V ras mutations in the ras-GAP-catalyzed hydrolysis reaction of guanosine triphosphate. // Biochemistry - 2014. - V. 53. - P. 7093–7099.

[124] Kotting C., Bleszenohl M., Suveyzdis Y., Goody R.S., Wittinghofer A., Gerwert K., A phosphoryl transfer intermediate in the GTPase reaction of Ras in complex with its GTPase-activating protein. // Proc. Natl. Acad. Sci. - 2006. - V. 103. - P. 13911–13916.

[125] Kotting C., Kallenbach A., Suveyzdis Y., Wittinghofer A., Gerwert K., The GAP arginine finger movement into the catalytic site of Ras increases the activation entropy. //

Proc. Natl. Acad. Sci. - 2008. - V. 105. - P. 6260–6265.

[126] Sot B., Kötting C., Deaconescu D., Suveyzdis Y., Gerwert K., Wittinghofer A., Unravelling the mechanism of dual-specificity GAPs. // *EMBO J.* - 2010. - V. 29. - P. 1205–1214.

[127] Xia F., Rudack T., Cui Q., Kötting C., Gerwert K., Detailed structure of the H₂PO₄ – –guanosine diphosphate intermediate in Ras-GAP decoded from FTIR experiments by biomolecular simulations. // *J. Am. Chem. Soc.* - 2012. - V. 134. - P. 20041–20044.

[128] Khrenova M.G., Grigorenko B.L., Nemukhin A. V., Theoretical vibrational spectroscopy of intermediates and the reaction mechanism of the guanosine triphosphate hydrolysis by the protein complex Ras-GAP. // *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* - 2016. - V. 166. - P. 68–72.

[129] Khrenova M.G., Kots E.D., Nemukhin A. V., Reaction mechanism of guanosine triphosphate hydrolysis by the vision-related protein complex Arl3–RP2. // *J. Phys. Chem. B* - 2016. - V. 120. - P. 3873–3879.

[130] Gomelsky M., Kaplan S., AppA, a novel gene encoding a trans-acting factor involved in the regulation of photosynthesis gene expression in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. // *J. Bacteriol.* - 1995. - V. 177. - P. 4609–18.

[131] Tyagi A., Penzkofer A., Griese J., Schlichting I., Kirienko N. V., Gomelsky M., Photodynamics of blue-light-regulated phosphodiesterase BlrP1 protein from *Klebsiella pneumoniae* and its photoreceptor BLUF domain. // *Chem. Phys.* - 2008. - V. 354. - P. 130–141.

[132] Masuda S., Bauer C.E., AppA is a blue light photoreceptor that antirepresses photosynthesis gene expression in *Rhodobacter sphaeroides*. // *Cell* - 2002. - V. 110. - P. 613–623.

[133] Laan W., Horst M.A. van der, Stokkum I.H. van, Hellingwerf K.J., Initial characterization of the primary photochemistry of AppA, a blue-light-using flavin adenine dinucleotide-domain containing transcriptional antirepressor protein from *Rhodobacter sphaeroides*: a key role for reversible intramolecular proton transfer f. // *Photochem. Photobiol.* - 2003. - V. 78. - P. 290.

[134] Kraft B.J., Masuda S., Kikuchi J., Dragnea V., Tollin G., Zaleski J.M., Bauer C.E., Spectroscopic and mutational analysis of the blue-light photoreceptor AppA: A novel

- photocycle involving flavin stacking with an aromatic amino acid. // *Biochemistry* - 2003. - V. 42. - P. 6726–6734.
- [135] Masuda S., Hasegawa K., Ono T., Light-induced structural changes of apoprotein and chromophore in the sensor of blue light using FAD (BLUF) domain of AppA for a signaling state. // *Biochemistry* - 2005. - V. 44. - P. 1215–1224.
- [136] Jung A., Domratcheva T., Tarutina M., Wu Q., Ko W.H., Shoeman R.L., Gomelsky M., Gardner K.H., Schlichting I., Structure of a bacterial BLUF photoreceptor: Insights into blue light-mediated signal transduction. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* - 2005. - V. 102. - P. 12350–12355.
- [137] Obanayama K., Kobayashi H., Fukushima K., Sakurai M., Structures of the chromophore binding sites in BLUF domains as studied by molecular dynamics and quantum chemical calculations. // *Photochem. Photobiol.* - 2008. - V. 84. - P. 1003–1010.
- [138] Anderson S., Dragnea V., Masuda S., Ybe J., Moffat K., Bauer C., Structure of a novel photoreceptor, the BLUF domain of AppA from *Rhodobacter sphaeroides*. // *Biochemistry* - 2005. - V. 44. - P. 7998–8005.
- [139] Grinstead J.S., Avila-Perez M., Hellingwerf K.J., Boelens R., Kaptein R., Light-induced flipping of a conserved glutamine sidechain and its orientation in the AppA BLUF domain. // *J. Am. Chem. Soc.* - 2006. - V. 128. - P. 15066–15067.
- [140] Grinstead J.S., Hsu S.-T.D., Laan W., Bonvin A.M.J.J., Hellingwerf K.J., Boelens R., Kaptein R., The solution structure of the AppA BLUF domain: Insight into the mechanism of light-induced signaling. // *ChemBioChem* - 2006. - V. 7. - P. 187–193.
- [141] Sadeghian K., Bocola M., Schütz M., A conclusive mechanism of the photoinduced reaction cascade in blue light using flavin photoreceptors. // *J. Am. Chem. Soc.* - 2008. - V. 130. - P. 12501–12513.
- [142] Laan W., Gauden M., Yeremenko S., Grondelle R. van, Kennis J.T.M., Hellingwerf K.J., On the mechanism of activation of the BLUF domain of AppA. // *Biochemistry* - 2006. - V. 45. - P. 51–60.
- [143] Domratcheva T., Grigorenko B.L., Schlichting I., Nemukhin A. V, Molecular models predict light-induced glutamine tautomerization in BLUF photoreceptors. // *Biophys. J.* - 2008. - V. 94. - P. 3872–3879.
- [144] Wu Q., Gardner K.H., Structure and insight into blue light-induced changes in the

- BlrP1 BLUF domain. // *Biochemistry* - 2009. - V. 48. - P. 2620–2629.
- [145] Dragnea V., Arunkumar A.I., Yuan H., Giedroc D.P., Bauer C.E., Spectroscopic studies of the AppA BLUF domain from *Rhodobacter sphaeroides*: addressing movement of tryptophan 104 in the signaling state. // *Biochemistry* - 2009. - V. 48. - P. 9969–9979.
- [146] Dragnea V., Waegele M., Balascuta S., Bauer C., Dragnea B., Time-resolved spectroscopic studies of the AppA blue-light receptor BLUF domain from *Rhodobacter sphaeroides*. // *Biochemistry* - 2005. - V. 44. - P. 15978–15985.
- [147] Mathes T., Götze J.P., A proposal for a dipole-generated BLUF domain mechanism. // *Front. Mol. Biosci.* - 2015. - V. 2. - P. 62:1–62:14.
- [148] Unno M., Sano R., Masuda S., Ono T.A., Yamauchi S., Light-induced structural changes in the active site of the BLUF domain in AppA by Raman spectroscopy. // *J. Phys. Chem. B* - 2005. - V. 109. - P. 12620–12626.
- [149] Jung A., Reinstein J., Domratcheva T., Shoeman R.L., Schlichting I., Crystal structures of the AppA BLUF domain photoreceptor provide insights into blue light-mediated signal transduction. // *J. Mol. Biol.* - 2006. - V. 362. - P. 717–732.
- [150] Stelling A.L., Ronayne K.L., Nappa J., Tonge P.J., Meech S.R., Ultrafast structural dynamics in BLUF domains: transient infrared spectroscopy of AppA and its mutants. // *J. Am. Chem. Soc.* - 2007. - V. 129. - P. 15556–15564.
- [151] Gauden M., Stokkum I.H. van, Key J.M., Luhrs Dc., Grondelle R. van, Hegemann P., Kennis J.T., Hydrogen-bond switching through a radical pair mechanism in a flavin-binding photoreceptor. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 2006. - V. 103. - P. 10895–10900.
- [152] Gauden M., Yeremenko S., Laan W., Stokkum I.H.M. van, Ihalainen J.A., Grondelle R. van, Hellingwerf K.J., Kennis J.T.M., Photocycle of the flavin-binding photoreceptor AppA, a bacterial transcriptional antirepressor of photosynthesis genes. // *Biochemistry* - 2005. - V. 44. - P. 3653–3662.
- [153] Mathes T., Stokkum I.H.M. van, Bonetti C., Hegemann P., Kennis J.T.M., The hydrogen-bond switch reaction of the Blrb BLUF domain of *Rhodobacter sphaeroides*. // *J. Phys. Chem. B* - 2011. - V. 115. - P. 7963–7971.
- [154] Bonetti C., Mathes T., Stokkum I.H.M. van, Mullen K.M., Groot M.-L., Grondelle R. van, Hegemann P., Kennis J.T.M., Hydrogen bond switching among flavin and amino acid side chains in the BLUF photoreceptor observed by ultrafast infrared spectroscopy.

// *Biophys. J.* - 2008. - V. 95. - P. 4790–4802.

[155] Mathes T., Stokkum I.H.M. van, Stierl M., Kennis J.T.M., Redox modulation of flavin and tyrosine determines photoinduced proton-coupled electron transfer and photoactivation of BLUF photoreceptors. // *J. Biol. Chem.* - 2012. - V. 287. - P. 31725–31738.

[156] Shibata Y., Murai Y., Satoh Y., Fukushima Y., Okajima K., Ikeuchi M., Itoh S., Acceleration of electron-transfer-induced fluorescence quenching upon conversion to the signaling state in the blue-light receptor, TePixD, from *Thermosynechococcus elongatus*. // *J. Phys. Chem. B* - 2009. - V. 113. - P. 8192–8198.

[157] Bonetti C., Stierl M., Mathes T., Stokkum I.H.M. van, Mullen K.M., Cohen-Stuart T.A., Grondelle R. van, Hegemann P., Kennis J.T.M., The role of key amino acids in the photoactivation pathway of the *Synechocystis* Slr1694 BLUF domain. // *Biochemistry* - 2009. - V. 48. - P. 11458–11469.

[158] Fujisawa T., Takeuchi S., Masuda S., Tahara T., Signaling-state formation mechanism of a BLUF protein PapB from the purple bacterium *Rhodospseudomonas palustris* studied by femtosecond time-resolved absorption spectroscopy. // *J. Phys. Chem. B* - 2014. - P. 141210160022000.

[159] Nagai H., Fukushima Y., Okajima K., Ikeuchi M., Mino H., Formation of interacting spins on flavosemiquinone and tyrosine radical in photoreaction of a blue light sensor BLUF protein TePixD. // *Biochemistry* - 2008. - V. 47. - P. 12574–12582.

[160] Fudim R., Mehlhorn J., Berthold T., Weber S., Schleicher E., Kennis J.T.M., Mathes T., Photoinduced formation of flavin radicals in BLUF domains lacking the central glutamine. // *FEBS J.* - 2015. - V. 282. - P. 3161–3174.

[161] Meier K., Thiel W., Gunsteren W.F. van, On the effect of a variation of the force field, spatial boundary condition and size of the QM region in QM/MM MD simulations. // *J. Comput. Chem.* - 2012. - V. 33. - P. 363–378.

[162] Götze J.P., Greco C., Mitrić R., Bonačić-Koutecký V., Saalfrank P., BLUF Hydrogen network dynamics and UV/Vis spectra: A combined molecular dynamics and quantum chemical study. // *J. Comput. Chem.* - 2012. - V. 33. - P. 2233–2242.

[163] Götze J., Saalfrank P., Serine in BLUF domains displays spectral importance in computational models. // *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* - 2009. - V. 94. - P. 87–95.

[164] Hsiao Y.-W., Götze J.P., Thiel W., The central role of Gln63 for the hydrogen

- bonding network and UV-visible spectrum of the AppA BLUF domain. // *J. Phys. Chem. B* - 2012. - V. 116. - P. 8064–8073.
- [165] Udvarhelyi A., Domratcheva T., Glutamine rotamers in BLUF photoreceptors: A mechanistic reappraisal. // *J. Phys. Chem. B* - 2013. - V. 117. - P. 2888–2897.
- [166] Sadeghian K., Bocola M., Schütz M., A QM/MM study on the fast photocycle of blue light using flavin photoreceptors in their light-adapted/active form. // *Phys. Chem. Chem. Phys.* - 2010. - V. 12. - P. 8840–8846.
- [167] Udvarhelyi A., Domratcheva T., Photoreaction in BLUF receptors: Proton-coupled electron transfer in the flavin-Gln-Tyr system. // *Photochem. Photobiol.* - 2011. - V. 87. - P. 554–563.
- [168] Khrenova M.G., Nemukhin A. V., Grigorenko B.L., Krylov A.I., Domratcheva T.M., Quantum chemistry calculations provide support to the mechanism of the light-induced structural changes in the flavin-binding photoreceptor proteins. // *J. Chem. Theory Comput.* - 2010. - V. 6. - P. 2293–2302.
- [169] Khrenova M.G., Domratcheva T., Schlichting I., Grigorenko B.L., Nemukhin A. V., Computational characterization of reaction intermediates in the photocycle of the sensory domain of the appa blue light photoreceptor. // *Photochem. Photobiol.* - 2011. - V. 87. - P. 564–573.
- [170] Khrenova M.G., Nemukhin A. V., Domratcheva T., Photoinduced electron transfer facilitates tautomerization of the conserved signaling glutamine side chain in BLUF protein light sensors. // *J. Phys. Chem. B* - 2013. - V. 117. - P. 2369–2377.
- [171] Хренова М.Г., Никифоров А.А., Андрийченко Н.Н., Миронов В.А., Немухин А.В., Механизм фотореакции в бактериальном рецепторе синего света BLUF по результатам моделирования методом метадинамики. // *Вестник Московского университета. Серия 2 Химия* - 2014. - V. 55. - P. 195–198.
- [172] Dragnea V., Arunkumar A.I., Lee C.W., Giedroc D.P., Bauer C.E., A Q63E rhodobacter sphaeroides AppA BLUF domain mutant is locked in a pseudo-light-excited signaling state. // *Biochemistry* - 2010. - V. 49. - P. 10682–10690.
- [173] Barends T.R.M., Hartmann E., Griese J.J., Beitlich T., Kirienko N. V, Ryjenkov D. a, Reinstein J., Shoeman R.L., Gomelsky M., Schlichting I., Structure and mechanism of a bacterial light-regulated cyclic nucleotide phosphodiesterase. // *Nature* - 2009. - V. 459. - P. 1015–1018.

- [174] Jenal U., Malone J., Mechanisms of cyclic-di-GMP signaling in bacteria. // *Annu. Rev. Genet.* - 2006. - V. 40. - P. 385–407.
- [175] Tarutina M., Ryjenkov D.A., Gomelsky M., An unorthodox bacteriophytochrome from *Rhodobacter sphaeroides* involved in turnover of the second messenger c-di-GMP. // *J. Biol. Chem.* - 2006. - V. 281. - P. 34751–34758.
- [176] Römling U., Amikam D., Cyclic di-GMP as a second messenger. // *Curr. Opin. Microbiol.* - 2006. - V. 9. - P. 218–228.
- [177] Römling U., Gomelsky M., Galperin M.Y., C-di-GMP: The dawning of a novel bacterial signalling system. // *Mol. Microbiol.* - 2005. - V. 57. - P. 629–639.
- [178] Cotter P.A., Stibitz S., C-di-GMP-mediated regulation of virulence and biofilm formation. // *Curr. Opin. Microbiol.* - 2007. - V. 10. - P. 17–23.
- [179] Hisert K.B., MacCoss M., Shiloh M.U., Darwin K.H., Singh S., Jones R.A., Ehrt S., Zhang Z., Gaffney B.L., Gandotra S., Holden D.W., Murray D., Nathan C., A glutamate-alanine-leucine (EAL) domain protein of *Salmonella* controls bacterial survival in mice, antioxidant defence and killing of macrophages: Role of cyclic diGMP. // *Mol. Microbiol.* - 2005. - V. 56. - P. 1234–1245.
- [180] Hoffman L.R., D'Argenio D.A., MacCoss M.J., Zhang Z., Jones R.A., Miller S.I., Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. // *Nature* - 2005. - V. 436. - P. 1171–1175.
- [181] Kulasekara H.D., Lee V., Brencic A., Liberati N., Urbach J., Miyata S., Lee D.G., Neely A.N., Hyodo M., Hayakawa Y., Ausubel F.M., Lory S., Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* diguanylate cyclases and phosphodiesterases reveals a role for bis-(3'-5')-cyclic-GMP in virulence. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 2006. - V. 103. - P. 2839–44.
- [182] Rao F., Yang Y., Qi Y., Liang Z.X., Catalytic mechanism of cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase: A study of the EAL domain-containing RocR from *Pseudomonas aeruginosa*. // *J. Bacteriol.* - 2008. - V. 190. - P. 3622–3631.
- [183] Schmidt A.J., Ryjenkov D.A., Gomelsky M., The ubiquitous protein domain EAL is a cyclic diguanylate-specific phosphodiesterase: Enzymatically active and inactive EAL domains. // *J. Bacteriol.* - 2005. - V. 187. - P. 4774–4781.
- [184] Rao F., Qi Y., Chong H.S., Kotaka M., Li B., Li J., Lescar J., Tang K., Liang Z.-X., The functional role of a conserved loop in EAL domain-based cyclic di-GMP-specific

- phosphodiesterase. // *J. Bacteriol.* - 2009. - V. 191. - P. 4722–4731.
- [185] McDonald I.K., Thornton J.M., Satisfying hydrogen bonding potential in proteins. // *J. Mol. Biol.* - 1994. - V. 238. - P. 777–793.
- [186] Torshin I.Y., Weber I.T., Harrison R.W., Geometric criteria of hydrogen bonds in proteins and identification of ‘bifurcated’ hydrogen bonds. // *Protein Eng. Des. Sel.* - 2002. - V. 15. - P. 359–363.
- [187] Aakeröy C.B., Evans T.A., Seddon K.R., Pálinkó I., The C–H···Cl hydrogen bond: does it exist? // *New J. Chem.* - 1999. - V. 23. - P. 145–152.
- [188] Fabiola F., Bertram R., Korostelev A., Chapman M.S., An improved hydrogen bond potential: Impact on medium resolution protein structures. // *Protein Sci.* - 2002. - V. 11. - P. 1415–1423.
- [189] Khrenova M., Domratcheva T., Grigorenko B., Nemukhin A., Coupling between the BLUF and EAL domains in the blue light-regulated phosphodiesterase BlrP1. // *J. Mol. Model.* - 2011. - V. 17. - P. 1579–1586.
- [190] Valle L., Morán Vieyra F.E., Borsarelli C.D., Hydrogen-bonding modulation of excited-state properties of flavins in a model of aqueous confined environment. // *Photochem. Photobiol. Sci.* - 2012. - V. 11. - P. 1051–1061.
- [191] Christie J.M., Gawthorne J., Young G., Fraser N.J., Roe A.J., LOV to BLUF: Flavoprotein contributions to the optogenetic toolkit. // *Mol. Plant* - 2012. - V. 5. - P. 533–544.
- [192] Drepper T., Gensch T., Pohl M., Advanced in vivo applications of blue light photoreceptors as alternative fluorescent proteins. // *Photochem. Photobiol. Sci.* - 2013. - V. 12. - P. 1125–1134.
- [193] Lobo L.A., Smith C.J., Rocha E.R., Flavin mononucleotide (FMN)-based fluorescent protein (FbFP) as reporter for gene expression in the anaerobe *Bacteroides fragilis*. // *FEMS Microbiol. Lett.* - 2011. - V. 317. - P. 67–74.
- [194] Mukherjee A., Walker J., Weyant K.B., Schroeder C.M., Characterization of flavin-based fluorescent proteins: An emerging class of fluorescent reporters. // *PLoS One* - 2013. - V. 8. - P. e64753:1–e64753:15.
- [195] Seago J., Juleff N., Moffat K., Berryman S., Christie J.M., Charleston B., Jackson T., An infectious recombinant foot-and-mouth disease virus expressing a fluorescent marker protein. // *J. Gen. Virol.* - 2013. - V. 94. - P. 1517–1527.

- [196] Wingen M., Potzkei J., Endres S., Casini G., Rupprecht C., Fahlke C., Krauss U., Jaeger K.E., Drepper T., Gensch T., The photophysics of LOV-based fluorescent proteins--new tools for cell biology. // *Photochem Photobiol Sci* - 2014. - V. 13. - P. 875–883.
- [197] Kay C.W.M., Schleicher E., Kuppig A., Hofner H., Rüdiger W., Schleicher M., Fischer M., Bacher A., Weber S., Richter G., Blue light perception in plants: Detection and characterization of a light-induced neutral flavin radical in a C450A mutant of phototropin. // *J. Biol. Chem.* - 2003. - V. 278. - P. 10973–10982.
- [198] Chapman S., Faulkner C., Kaiserli E., Garcia-Mata C., Savenkov E.I., Roberts A.G., Oparka K.J., Christie J.M., The photoreversible fluorescent protein iLOV outperforms GFP as a reporter of plant virus infection. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 2008. - V. 105. - P. 20038–20043.
- [199] Christie J.M., Hitomi K., Arvai A.S., Hartfield K.A., Mettlen M., Pratt A.J., Tainer J.A., Getzoff E.D., Structural tuning of the fluorescent protein iLOV for improved photostability. // *J. Biol. Chem.* - 2012. - V. 287. - P. 22295–22304.
- [200] Schüttrigkeit T.A., Kompa C.K., Salomon M., Rüdiger W., Michel-Beyerle M.E., Primary photophysics of the FMN binding LOV2 domain of the plant blue light receptor phototropin of *Avena sativa*. // *Chem. Phys.* - 2003. - V. 294. - P. 501–508.
- [201] Swartz T.E., Corchnoy S.B., Christie J.M., Lewis J.W., Szundi I., Briggs W.R., Bogomolni R.A., The photocycle of a flavin-binding domain of the blue light photoreceptor phototropin. // *J. Biol. Chem.* - 2001. - V. 276. - P. 36493–36500.
- [202] Khrenova M.G., Nemukhin A. V., Domratcheva T., Theoretical characterization of the flavin-based fluorescent protein iLOV and its Q489K mutant. // *J. Phys. Chem. B* - 2015. - V. 119. - P. 5176–5183.
- [203] Stanley R.J., Jang H., Electronic structure measurements of oxidized flavins and flavin complexes using stark-effect spectroscopy. // *J. Phys. Chem. A* - 1999. - V. 103. - P. 8976–8984.
- [204] Climent T., González-Luque R., Merchán M., Serrano-Andrés L., Theoretical insight into the spectroscopy and photochemistry of isoalloxazine, the flavin core ring. // *J. Phys. Chem. A* - 2006. - V. 110. - P. 13584–13590.
- [205] Liu X., Jiang L., Li J., Wang L., Yu Y., Zhou Q., Lv X., Gong W., Lu Y., Wang J., Significant expansion of fluorescent protein sensing ability through the genetic

- incorporation of superior photo-induced electron-transfer quenchers. // *J. Am. Chem. Soc.* - 2014. - V. 136. - P. 13094–13097.
- [206] Zirak P., Penzkofer A., Mathes T., Hegemann P., Photo-dynamics of roseoflavin and riboflavin in aqueous and organic solvents. // *Chem. Phys.* - 2009. - V. 358. - P. 111–122.
- [207] Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer US: Boston, MA 1999.
- [208] Periasamy A., Fluorescence resonance energy transfer microscopy: a mini review. // *J. Biomed. Opt.* - 2001. - V. 6. - P. 287–91.
- [209] Margittai M., Widengren J., Schweinberger E., Schröder G.F., Felekyan S., Haustein E., König M., Fasshauer D., Grubmüller H., Jahn R., Seidel C.A.M., Single-molecule fluorescence resonance energy transfer reveals a dynamic equilibrium between closed and open conformations of syntaxin 1. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 2003. - V. 100. - P. 15516–21.
- [210] Brunger A.T., Strop P., Vrljic M., Chu S., Weninger K.R., Three-dimensional molecular modeling with single molecule FRET. // *J. Struct. Biol.* - 2011. - V. 173. - P. 497–505.
- [211] Sindbert S., Kalinin S., Nguyen H., Kienzler A., Clima L., Bannwarth W., Appel B., Müller S., Seidel C.A.M., Accurate distance determination of nucleic acids via Förster resonance energy transfer: implications of dye linker length and rigidity. // *J. Am. Chem. Soc.* - 2011. - V. 133. - P. 2463–2480.
- [212] Hoefling M., Lima N., Haenni D., Seidel C.A.M., Schuler B., Grubmüller H., Structural Heterogeneity and Quantitative FRET Efficiency distributions of polyprolines through a hybrid atomistic simulation and Monte Carlo approach. // *PLoS One* - 2011. - V. 6. - P. e19791:1–e19791:19.
- [213] Zhang J., Campbell R.E., Ting A.Y., Tsien R.Y., Creating new fluorescent probes for cell biology. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* - 2002. - V. 3. - P. 906–918.
- [214] Zimmer M., Green fluorescent protein (GFP): Applications, structure, and related photophysical behavior. // *Chem. Rev.* - 2002. - V. 102. - P. 759–781.
- [215] Day R.N., Davidson M.W., The fluorescent protein palette: tools for cellular imaging. // *Chem. Soc. Rev.* - 2009. - V. 38. - P. 2887–2921.
- [216] Mank M., Reiff D.F., Heim N., Friedrich M.W., Borst A., Griesbeck O., A FRET-

- based calcium biosensor with fast signal kinetics and high fluorescence change. // *Biophys. J.* - 2006. - V. 90. - P. 1790–1796.
- [217] Rusanov A.L., Ivashina T. V., Vinokurov L.M., Fiks I.I., Orlova A.G., Turchin I. V., Meerovich I.G., Zherdeva V. V., Savitsky A.P., Lifetime imaging of FRET between red fluorescent proteins. // *J. Biophotonics* - 2010. - V. 3. - P. 774–783.
- [218] Merzlyak E.M., Goedhart J., Shcherbo D., Bulina M.E., Shcheglov A.S., Fradkov A.F., Gaintzeva A., Lukyanov K.A., Lukyanov S., Gadella T.W., Chudakov D.M., Bright monomeric red fluorescent protein with an extended fluorescence lifetime. // *Nat Methods* - 2007. - V. 4. - P. 555–557.
- [219] Subach O.M., Malashkevich V.N., Zencheck W.D., Morozova K.S., Piatkevich K.D., Almo S.C., Verkhusha V. V., Structural characterization of acylimine-containing blue and red chromophores in mTagBFP and TagRFP fluorescent proteins. // *Chem. Biol.* - 2010. - V. 17. - P. 333–341.
- [220] Chudakov D.M., Belousov V. V., Zarausky A.G., Novoselov V. V., Staroverov D.B., Zorov D.B., Lukyanov S., Lukyanov K.A., Kindling fluorescent proteins for precise in vivo photolabeling. // *Nat. Biotechnol.* - 2003. - V. 21. - P. 191–194.
- [221] Quillin M.L., Anstrom D.M., Shu X., O’Leary S., Kallio K., Chudakov D.M., Remington S.J., Kindling Fluorescent Protein from *Anemonia sulcata*: Dark-State Structure at 1.38 Å Resolution. // *Biochemistry* - 2005. - V. 44. - P. 5774–5787.
- [222] Henderson J.N., Remington S.J., The kindling fluorescent protein: a transient photoswitchable marker. // *Physiology* - 2009. - V. 21. - P. 162–170.
- [223] Nemukhin A., Topol I., Collins J., Khrenova M., Quantum chemistry in studies of fluorescent and photosensing proteins. // *Int. J. Quantum Chem.* - 2013. - V. 113. - P. 1828–1832.
- [224] Khrenova M., Topol I., Collins J., Nemukhin A., Estimating orientation factors in the FRET theory of fluorescent proteins: The TagRFP-KFP pair and beyond. // *Biophys. J.* - 2015. - V. 108. - P. 126–132.
- [225] Zerner, M. C. Semiempirical Molecular Orbital Methods. *In Reviews in Computational Chemistry*; Lipkowitz, K. B., Boyd, D. B., Eds.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 1991; Vol. 2, , pp. 313–365.
- [226] Topol I., Collins J., Polyakov I., Grigorenko B., Nemukhin A., On photoabsorption of the neutral form of the green fluorescent protein chromophore. // *Biophys. Chem.* -

2009. - V. 145. - P. 1–6.

[227] Topol I., Collins J., Nemukhin A., Modeling spectral tuning in monomeric teal fluorescent protein mTFP1. // *Biophys. Chem.* - 2010. - V. 149. - P. 78–82.

[228] Topol I., Collins J., Savitsky A., Nemukhin A., Computational strategy for tuning spectral properties of red fluorescent proteins. // *Biophys. Chem.* - 2011. - V. 158. - P. 91–95.

[229] Topol I., Collins J., Nemukhin A., Modeling Structures and Spectra of Fluorescent Proteins in the Coordinate-Locking Cluster Approach: Application to the Photoswitchable Protein asFP595. // *Comput. Mol. Biosci.* - 2012. - V. 2012. - P. 83–91.

[230] Topol I., Collins J., Mironov V., Savitsky A., Nemukhin A., Modeling absorption of the kindling fluorescent protein with the neutral form of the chromophore. // *Int. J. Quantum Chem.* - 2012. - V. 112. - P. 2947–2951.

[231] Rosell F.I., Boxer S.G., Polarized absorption spectra of green fluorescent protein single crystals: Transition dipole moment directions. // *Biochemistry* - 2003. - V. 42. - P. 177–183.

[232] Ansbacher T., Srivastava H.K., Stein T., Baer R., Merckx M., Shurki A., Calculation of transition dipole moment in fluorescent proteins—towards efficient energy transfer. // *Phys. Chem. Chem. Phys.* - 2012. - V. 14. - P. 4109–4117.

[233] Grigorenko B.L., Nemukhin A. V., Polyakov I. V., Morozov D.I., Krylov A.I., First-principles characterization of the energy landscape and optical spectra of green fluorescent protein along the A→I→B proton transfer route. // *J. Am. Chem. Soc.* - 2013. - V. 135. - P. 11541–11549.

[234] Savitsky A.P., Rusanov A.L., Zherdeva V. V., Gorodnicheva T. V., Khrenova M.G., Nemukhin A. V., FLIM-FRET imaging of caspase-3 activity in live cells using pair of red fluorescent proteins. // *Theranostics* - 2012. - V. 2. - P. 215–226.

[235] Bulina M.E., Chudakov D.M., Britanova O. V, Yanushevich Y.G., Staroverov D.B., Chepurnykh T. V, Merzlyak E.M., Shkrob M.A., Lukyanov S., Lukyanov K.A., A genetically encoded photosensitizer. // *Nat Biotechnol* - 2006. - V. 24. - P. 95–99.

[236] Rosny E. De, Carpentier P., GFP-like phototransformation mechanisms in the cytotoxic fluorescent protein killerred unraveled by structural and spectroscopic investigations. // *J. Am. Chem. Soc.* - 2012. - V. 134. - P. 18015–18021.

[237] Лапшин Г.Д., Горященко А.С., Хренова М.Г., Русанов А.Л., Ивашина Т.В.,

Жердева В.В., Савицкий А.П., Оптимизация длины линкера в генетически кодируемых сенсорах каспазы-3. // Современные проблемы науки и образования приложение “Биологические науки” - 2011. - V. 6. - P. 18.

[238] Goryashchenko A., Khrenova M., Bochkova A., Ivashina T., Vinokurov L., Savitsky A., Genetically encoded FRET-sensor based on terbium chelate and red fluorescent protein for detection of caspase-3 activity. // *Int. J. Mol. Sci.* - 2015. - V. 16. - P. 16642–16654.

[239] Lukyanov K.A., Fradkov A.F., Gurskaya N.G., Matz M. V., Labas Y.A., Savitsky A.P., Markelov M.L., Zaraisky A.G., Zhao X., Fang Y., Tan W., Lukyanov S.A., Natural animal coloration can be determined by a nonfluorescent green fluorescent protein homolog. // *J. Biol. Chem.* - 2000. - V. 275. - P. 25879–25882.

[240] Andresen M., Wahl M.C., Stiel A.C., Gräter F., Schäfer L. V, Trowitzsch S., Weber G., Eggeling C., Grubmüller H., Hell S.W., Jakobs S., Structure and mechanism of the reversible photoswitch of a fluorescent protein. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 2005. - V. 102. - P. 13070–13074.

[241] Chudakov D.M., Feofanov A. V., Mudrik N.N., Lukyanov S., Lukyanov K.A., Chromophore environment provides clue to “kindling fluorescent protein” riddle. // *J. Biol. Chem.* - 2003. - V. 278. - P. 7215–7219.

[242] Schüttrigkeit T.A., Feilitzsch T. von, Kompa C.K., Lukyanov K.A., Savitsky A.P., Voityuk A.A., Michel-Beyerle M.E., Femtosecond study of light-induced fluorescence increase of the dark chromoprotein asFP595. // *Chem. Phys.* - 2006. - V. 323. - P. 149–160.

[243] Habuchi S., Ando R., Dedecker P., Verheijen W., Mizuno H., Miyawaki A., Hofkens J., Reversible single-molecule photoswitching in the GFP-like fluorescent protein Dronpa. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 2005. - V. 102. - P. 9511–9516.

[244] Andresen M., Stiel A.C., Trowitzsch S., Weber G., Eggeling C., Wahl M.C., Hell S.W., Jakobs S., Structural basis for reversible photoswitching in Dronpa. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 2007. - V. 104. - P. 13005–9.

[245] Li X., Chung L.W., Mizuno H., Miyawaki A., Morokuma K., Primary events of photodynamics in reversible photoswitching fluorescent protein dronpa. // *J. Phys. Chem. Lett.* - 2010. - V. 1. - P. 3328–3333.

[246] Koseki J., Kita Y., Nagashima U., Tachikawa M., Theoretical study of the

reversible photoconversion mechanism in Dronpa. // *Procedia Comput. Sci.* - 2011. - V. 4. - P. 251–260.

[247] Mizuno H., Mal T.K., Wälchli M., Kikuchi A., Fukano T., Ando R., Jeyakanthan J., Taka J., Shiro Y., Ikura M., Miyawaki A., Light-dependent regulation of structural flexibility in a photochromic fluorescent protein. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 2008. - V. 105. - P. 9227–9232.

[248] Habuchi S., Dedecker P., Hotta J., Flors C., Ando R., Mizuno H., Miyawaki A., Hofkens J., Photo-induced protonation/deprotonation in the GFP-like fluorescent protein Dronpa: mechanism responsible for the reversible photoswitching. // *Photochem. Photobiol. Sci.* - 2006. - V. 5. - P. 567–576.

[249] Nam K.H., Kwon O.Y., Sugiyama K., Lee W.H., Kim Y.K., Song H.K., Kim E.E., Park S.Y., Jeon H., Hwang K.Y., Structural characterization of the photoswitchable fluorescent protein Dronpa-C62S. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 2007. - V. 354. - P. 962–967.

[250] Wilmann P.G., Turcic K., Battad J.M., Wilce M.C.J., Devenish R.J., Prescott M., Rossjohn J., The 1.7 Å crystal structure of Dronpa: a photoswitchable green fluorescent protein. // *J. Mol. Biol.* - 2006. - V. 364. - P. 213–224.

[251] Wilmann P.G., Petersen J., Devenish R.J., Prescott M., Rossjohn J., Variations on the GFP chromophore: A polypeptide fragmentation within the chromophore revealed in the 2.1-Å crystal structure of a nonfluorescent chromoprotein from *Anemonia sulcata*. // *J. Biol. Chem.* - 2005. - V. 280. - P. 2401–2404.

[252] Faro A.R., Adam V., Carpentier P., Darnault C., Bourgeois D., Rosny E. de, Low-temperature switching by photoinduced protonation in photochromic fluorescent proteins. // *Photochem. Photobiol. Sci.* - 2010. - V. 9. - P. 254–262.

[253] Brakemann T., Weber G., Andresen M., Groenhof G., Stiel A.C., Trowitzsch S., Eggeling C., Grubmüller H., Hell S.W., Wahl M.C., Jakobs S., Molecular basis of the light-driven switching of the photochromic fluorescent protein padron. // *J. Biol. Chem.* - 2010. - V. 285. - P. 14603–14609.

[254] Sun Q., Li Z., Lan Z., Pfisterer C., Doerr M., Fischer S., Smith S.C., Thiel W., Isomerization mechanism of the HcRed fluorescent protein chromophore. // *Phys. Chem. Chem. Phys.* - 2012. - V. 14. - P. 11413–11424.

[255] Warren M.M., Kaucikas M., Fitzpatrick A., Champion P., Timothy Sage J., Thor

- J.J. van, Ground-state proton transfer in the photoswitching reactions of the fluorescent protein Dronpa. // *Nat. Commun.* - 2013. - V. 4. - P. 1461.
- [256] Mudalige K., Habuchi S., Goodwin P.M., Pai R.K., Schryver F. De, Cotlet M., Photophysics of the red chromophore of HcRed: Evidence for Cis-trans isomerization and protonation-state changes. // *J. Phys. Chem. B* - 2010. - V. 114. - P. 4678–4685.
- [257] Nienhaus K., Nar H., Heilker R., Wiedenmann J., Nienhaus G.U., Trans-cis isomerization is responsible for the red-shifted fluorescence in variants of the red fluorescent protein eqFP611. // *J. Am. Chem. Soc.* - 2008. - V. 130. - P. 12578–12579.
- [258] Weber W., Helms V., McCammon J.A., Langhoff P.W., Shedding light on the dark and weakly fluorescent states of green fluorescent proteins. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 1999. - V. 96. - P. 6177–6182.
- [259] Toniolo A., Granucci G., Martínez T.J., Conical intersections in solution: A QM/MM study using floating occupation semiempirical configuration interaction wave functions. // *J. Phys. Chem. A* - 2003. - V. 107. - P. 3822–3830.
- [260] Toniolo A., Olsen S., Manohar L., Martínez T.J., Conical intersection dynamics in solution: the chromophore of Green Fluorescent Protein. // *Faraday Discuss.* - 2004. - V. 127. - P. 149–163.
- [261] Nifosì R., Tozzini V., Cis–trans photoisomerization of the chromophore in the green fluorescent protein variant E2GFP: A molecular dynamics study. // *Chem. Phys.* - 2006. - V. 323. - P. 358–368.
- [262] Martin M.E., Negri F., Olivucci M., Origin, Nature, and Fate of the Fluorescent State of the Green Fluorescent Protein Chromophore at the CASPT2//CASSCF Resolution. // *J. Am. Chem. Soc.* - 2004. - V. 126. - P. 5452–5464.
- [263] Chen M.C., Lambert C.R., Urgitis J.D., Zimmer M., Photoisomerization of green fluorescent protein and the dimensions of the chromophore cavity. // *Chem. Phys.* - 2001. - V. 270. - P. 157–164.
- [264] Abbruzzetti S., Bizzarri R., Luin S., Nifosì R., Storti B., Viappiani C., Beltram F., Photoswitching of E222Q GFP mutants: “concerted” mechanism of chromophore isomerization and protonation. // *Photochem. Photobiol. Sci.* - 2010. - V. 9. - P. 1286–1300.
- [265] Abbandonato G., Signore G., Nifosì R., Voliani V., Bizzarri R., Beltram F., Cis-trans photoisomerization properties of GFP chromophore analogs. // *Eur. Biophys. J.* -

2011. - V. 40. - P. 1205–1214.

[266] Olsen S., Smith S.C., Radiationless decay of red fluorescent protein chromophore models via twisted intramolecular charge-transfer states. // *J. Am. Chem. Soc.* - 2007. - V. 129. - P. 2054–2065.

[267] Olsen S., Smith S.C., Bond selection in the photoisomerization reaction of anionic green fluorescent protein and kindling fluorescent protein chromophore models. // *J. Am. Chem. Soc.* - 2008. - V. 130. - P. 8677–8689.

[268] Olsen S., Lamothe K., Martínez T.J., Protonic gating of excited-state twisting and charge localization in GFP chromophores: A mechanistic hypothesis for reversible photoswitching. // *J. Am. Chem. Soc.* - 2010. - V. 132. - P. 1192–1193.

[269] Polyakov I., Epifanovsky E., Grigorenko B., Krylov A.I., Nemukhin A., Quantum chemical benchmark studies of the electronic properties of the green fluorescent protein chromophore: 2. Cis-trans isomerization in water. // *J. Chem. Theory Comput.* - 2009. - V. 5. - P. 1907–1914.

[270] Polyakov I. V., Grigorenko B.L., Epifanovsky E.M., Krylov A.I., Nemukhin A. V., Potential energy landscape of the electronic states of the GFP chromophore in different protonation forms: electronic transition energies and conical intersections. // *J. Chem. Theory Comput.* - 2010. - V. 6. - P. 2377–2387.

[271] Torrie G.M., Valleau J.P., Nonphysical sampling distributions in Monte Carlo free-energy estimation: Umbrella sampling. // *J. Comput. Phys.* - 1977. - V. 23. - P. 187–199.

[272] Kästner J., Umbrella sampling. // *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* - 2011. - V. 1. - P. 932–942.

[273] Roux B., The calculation of the potential of mean force using computer simulations. // *Comput. Phys. Commun.* - 1995. - V. 91. - P. 275–282.

[274] Mironov V.A., Khrenova M.G., Grigorenko B.L., Savitsky A.P., Nemukhin A. V., Thermal isomerization of the chromoprotein asFP595 and its kindling mutant A143G: QM/MM molecular dynamics simulations. // *J. Phys. Chem. B* - 2013. - V. 117. - P. 13507–13514.

[275] Tsien R.Y., The green fluorescent protein. // *Annu. Rev. Biochem.* - 1998. - V. 67. - P. 509–544.

[276] Wang Y., Shyy J.Y.-J., Chien S., Fluorescence proteins, live-cell imaging, and

- mechanobiology: Seeing is believing. // *Annu. Rev. Biomed. Eng.* - 2008. - V. 10. - P. 1–38.
- [277] Bogdanov A.M., Mishin A.S., Yampolsky I. V, Belousov V. V, Chudakov D.M., Subach F. V, Verkhusha V. V, Lukyanov S., Lukyanov K.A., Green fluorescent proteins are light-induced electron donors. // *Nat. Chem. Biol.* - 2009. - V. 5. - P. 459–461.
- [278] Blandamer M.J., Fox M.F., Theory and applications of charge-transfer-to-solvent spectra. // *Chem. Rev.* - 1970. - V. 70. - P. 59–93.
- [279] Bradforth S.E., Jungwirth P., Excited states of iodide anions in water: A comparison of the electronic structure in clusters and in bulk solution. // *J. Phys. Chem. A* - 2002. - V. 106. - P. 1286–1298.
- [280] Simons J., Molecular Anions. // *J. Phys. Chem. A* - 2008. - V. 112. - P. 6401–6511.
- [281] Sobolewski A.L., Domcke W., Computational studies of aqueous-phase photochemistry and the hydrated electron in finite-size clusters. // *Phys. Chem. Chem. Phys.* - 2007. - V. 9. - P. 3818.
- [282] Feng D.-F., Kevan L., Theoretical models for solvated electrons. // *Chem. Rev.* - 1980. - V. 80. - P. 1–20.
- [283] Jacobson L.D., Herbert J.M., Polarization-bound quasi-continuum states are responsible for the “Blue Tail” in the optical absorption spectrum of the aqueous electron. // *J. Am. Chem. Soc.* - 2010. - V. 132. - P. 10000–10002.
- [284] Bravaya K.B., Khrenova M.G., Grigorenko B.L., Nemukhin A. V., Krylov A.I., Effect of protein environment on electronically excited and ionized states of the green fluorescent protein chromophore. // *J. Phys. Chem. B* - 2011. - V. 115. - P. 8296–8303.
- [285] Epifanovsky E., Polyakov I., Grigorenko B., Nemukhin A., Krylov A.I., Quantum chemical benchmark studies of the electronic properties of the green fluorescent protein chromophore. 1. Electronically excited and ionized states of the anionic chromophore in the gas phase. // *J. Chem. Theory Comput.* - 2009. - V. 5. - P. 1895–1906.