

На правах рукописи

Антипина Любовь Юрьевна

**ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ
Ca²⁺-РЕГУЛИРУЕМОГО ФОТОПРОТЕИНА ОБЕЛИНА**

Специальность 01.04.07 – физика конденсированного состояния

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Красноярск – 2010

Работа выполнена в Институте физики им. Л.В. Киренского СО РАН

Научный руководитель: доктор физико-математических наук,
профессор, Овчинников Сергей Геннадьевич

Официальные оппоненты: доктор физико-математических наук
Белобров Петр Иванович

кандидат физико-математических наук
Краснов Павел Олегович

Ведущая организация: Институт биохимической физики
им. н.м. Эмануэля РАН, г. Москва

Защита состоится «___» _____ 2010 г. в ___:___ часов на заседании
диссертационного совета Д 003.055.02 в Институте физики им. Л.В. Киренского СО
РАН по адресу: 660036, г. Красноярск, Академгородок, д. 50, стр. 38.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института физики им. Л.В.
Киренского СО РАН.

Автореферат разослан «___» _____ 2010г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор физ.-мат. наук _____ Втюрин Александр Николаевич

Общее содержание работы

Актуальность: Билюминесценция – явление, широко представленное в природе. В настоящее время билюминесцентные белки являются основой многих широко используемых методов анализа. Билюминесцентные методы широко используются в клеточной биологии и экологии, а также в медицинской диагностике и исследовании онкологических заболеваний.

Значительный прогресс в понимании механизма билюминесценции и роли отдельных аминокислот белка в этом процессе был достигнут после определения нескольких пространственных структур Ca^{2+} -регулируемых фотопротеинов. Однако, пространственная структура белка обеспечивает информацию только о статическом состоянии белковой молекулы и аминокислот активного центра. Какие изменения происходят непосредственно в ходе реакции, остается неизвестным. Восполнить этот пробел позволяют современные квантово-химические методы расчетов, которые в настоящее время широко применяются для решения задач подобного уровня.

Целью работы являлось исследование строения, электронной структуры и механизмов флуоресценции фотопротеинов методами квантовой химии.

Для достижения этой цели решались следующие **задачи**:

1. исследование строения целентерамида (CLM) и целентеразина (CLZ) с учетом эффектов электронных корреляций;
2. изучение влияния ван-дер-ваальсовых взаимодействий на процесс образования 2-гидропероксицелентеразина (HP-CLZ) и моделирование процесса активации CLZ кислородом;
3. построение физической модели флуоресценции фотопротеинов.

При решении поставленных задач получены результаты, которые выносятся на защиту:

1. Учет электронных корреляций дает структуру наиболее близкую к экспериментальной для изомеров молекул CLZ и CLM и позволяет выбрать форму целентеразина CLZ(1H) как наиболее вероятную из возможных изомерных форм.
2. Показано, что ван-дер-ваальсово взаимодействие влияет на процесс формирования HP-CLZ. Рассчитана энергия активации реакции образования HP-CLZ, которая находится в согласии с экспериментом.
3. Построена физическая модель флуоресценции фотопротеина обелина с учетом электронных корреляций. Экспериментально наблюдаемая длина волны излучения 500 нм соответствует «комплексу с переносом протона» между кислородом целентерамида и гистидином His22.

Научная новизна.

В работе обнаружен эффект электронных корреляций на стабилизацию изомерных форм целентеразина.

Были получены объяснения следующим, экспериментально наблюдаемым, явлениям:

- 1) в белке *Obelia Longissima* (OL) субстрат находится в форме CLZ(2H), в *Renilla Muelleri* (RM) — CLZ(1H), поэтому активация CLZ в белке RM не происходит;
- 2) установлен механизм формирования эмиттера; длина волны флуоресценции определяется положением протона между фенольной группой CLM и атомом азота His22.

На основании результатов квантово-химических расчетов было предсказано следующее:

- 1) существование субстрата целентеразина в белке в изомерной форме CLZ(2H);
- 2) учет электронных корреляций дает структуру более близкую к экспериментальной в растворителе и позволяет выбрать форму целентеразина CLZ(1H) как наиболее вероятную из возможных изомерных форм в протонных растворителях.
- 3) необходимость присутствия гистидина His175 на формирование CLZ(2H) из CLZ(1H) в белке на начальном этапе реакции;
- 4) влияние полярных групп аминокислотного окружения на процесс образования комплекса CLZ(2H)···O₂, из которого впоследствии идёт формирование 2-гидропероксицелентеразина (HP-CLZ).

Практическая значимость.

Разработанная модель активного центра фотопротеина позволяет проводить качественные исследования геометрии активного центра и электронной структуры квантово-химическими методами, с учётом электронных корреляций.

Изучено влияние аминокислотного окружения на субстрат в активном центре фотопротеина. Полученная из расчётов информация делает возможным целенаправленный синтез люминесцентных белков с заданными свойствами.

Личный вклад автора.

Моделирование активного центра фотопротеинов. Расчет всех структур с помощью различных квантово-химических методов. Анализ полученных данных. Настоящая работа является итогом исследований, проводимых в 2007-2010 годах.

Апробация работы. Результаты, включенные в диссертацию, были представлены на различных конференциях, в том числе: VIII Всероссийская научно-практическая конференция студентов и аспирантов «Химия и Химическая технология

в XXI веке» (2007, Томск); XX зимняя международная молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (2008, Москва); Luminescence (2008, Beijing и 2010, Lyon); 12-ая и 13-ая международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология в XXI веке (2008 и 2009, Пущино); XX и XXI симпозиум "Современная химическая физика" (2008 и 2009, Туапсе); IV школа-семинар молодых ученых «Квантово-химические расчеты: структура и реакционная способность органических и неорганических молекул» (2009, Иваново). Результаты работы так же обсуждались на научных семинарах в Институте физики им. Л.В. Киренского СО РАН (г. Красноярск).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 3 статьи в реферируемых отечественных журналах. Всего опубликовано 14 работ, включая тезисы и материалы конференций.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (07-04-00930-а и 09-04-12022 офи_м), программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология», программы Сибирского отделения РАН (проект № 2), а также в рамках реализации ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России».

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из введения, 5 глав, заключения и списка литературы. Объем работы составляет 103 страницы, включающих 24 рисунка, 17 таблиц и список литературы из 121 наименования.

Содержание работы

Во введении обоснована актуальность проводимых исследований, сформулирована цель работы, указаны научная новизна, практическая значимость полученных результатов и основные положения, выносимые на защиту.

Первая глава диссертации содержит литературный обзор теоретических и экспериментальных исследований биолюминесцентных белков, их субстратов и различных механизмов реакции. Приводится обзор экспериментальных работ по исследованию обелина.

Схематично схема преобразования субстрата представлена на рис. 1, процесс биолюминесценции - на рис. 2.

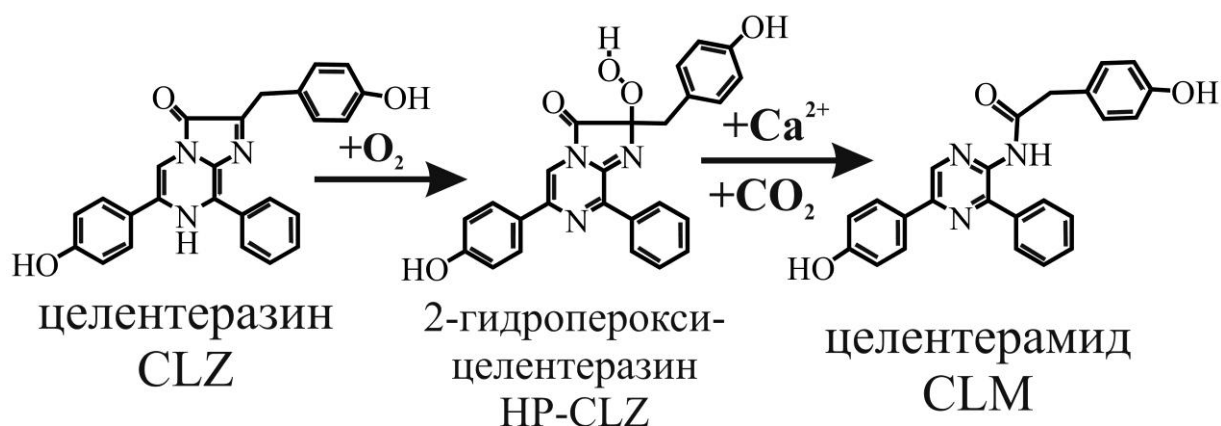


Рис. 1 – Преобразование субстрата в ходе биолюминесцентной реакции

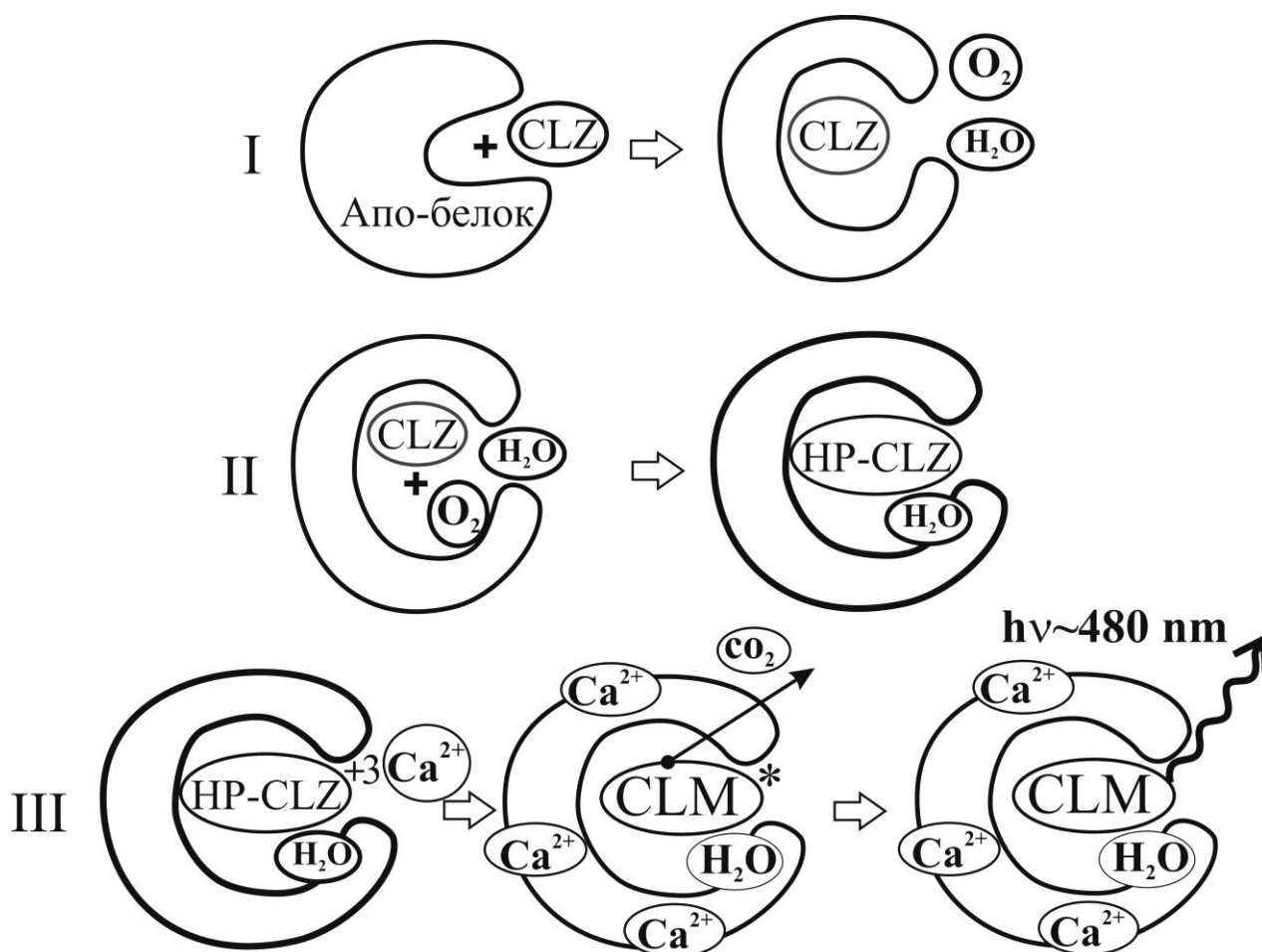


Рис. 2 – схема процесса биолуминесценции и флуоресценции обелина

I - Стадия поглощения апо-белком целентеразина в растворе.

II - Стадия образования гидроперекиси целентеразина внутри полости белка с находящимся там кислородом.

III - Биолуминесцентная реакция декорбацилирования обелина с ионами кальция с образованием Ca²⁺-разряженного белка обелина, с превращением целентеразина в целентерамид внутри полости белка.

IV - Флуоресцентная реакция Ca²⁺-разряженного обелина.

При добавлении к апо-белку целентеразина (CLZ) происходит образование активного фотопротейна (рис. 1 и 2, процесс I-II). При этом CLZ вступает в реакцию с молекулой кислорода, образуя внутри белка молекулу 2-гидропероксицелентеразина (HP-CLZ). Присоединение ионов кальция (рис. 1 и 2, процесс II-III) запускает реакцию окислительного декорбацилирования, в результате которой образуется Ca²⁺-разряженный фотопротейн, содержащий субстрат в возбужденном состоянии – целентерамид (CLM). Переход CLM из возбужденного состояния в основное сопровождается биолуминесценцией, которая наблюдается в диапазоне 465–495 нм и зависит от организма, из которого фотопротейн выделен. После реакции образующийся разряженный фотопротейн (рис. 2, состояние III), содержащий

целентерамид в основном состоянии, при облучении светом проявляет яркую флуоресценцию.

Немодифицированная форма CLZ отвечает формуле $C_{26}H_{21}O_3N_3$. Целентеразин может быть выкристаллизован из метанола как желто-оранжевые кристаллы. В метаноле CLZ флуоресцирует в желтой области, и его ультрафиолетовый спектр поглощения имеет максимум на 435 нм. В разных растворителях CLZ может формировать несколько изомерных форм. Однако экспериментально установить какая же именно форма существует в тех или иных условиях практически невозможно. Структуры изомерных форм CLZ представлены на рис. 3.

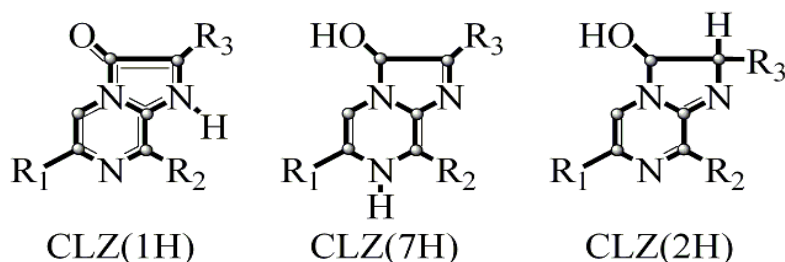


Рис. 3 – Изомерные формы целентеразина.

В отличие от фотопротеина обелина, выделенного из *Obelia Longissima* (OL), в Ca^{2+} -связывающем белке (CBP), выделенном из *Renilla Muelleri* (RM), активация целентеразина кислородом не происходит. Излучающей структурой фотопротеинов является целентерамид (CLM), образующийся в ходе билюминесцентной реакции. CLM может формировать четыре вида возбужденных состояний (рис. 4). Экспериментально установить, какая же форма является излучающей в процессе билюминесценции или флуоресценции, не удается.

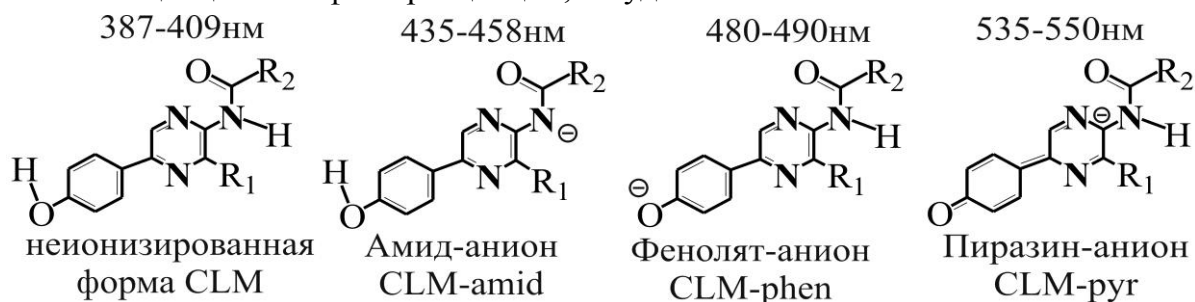


Рис. 4 – Излучающие формы CLM

Во второй главе приводится описание методов расчета электронной и атомной структуры используемых в данной работе. Рассматриваются метод Хартри-Фока (HF), метод функционала плотности (DFT). Также рассматривается теория возмущений Мёллера-Плессета второго порядка (MP2). Для изучения флуоресценции использовался метод конфигурационного взаимодействия (CI), позволяющий рассчитывать геометрию структуры в возбужденном состоянии с учетом электронных корреляций. Для учета ван-дер-ваальсовых взаимодействий использовались

полуэмпирические методы PM3 и PM6. Все расчеты электронной и атомной структуры проводились с использованием программ GAMESS, MOPAC или HyperChem.

Третья глава посвящена исследованию строения CLZ с учетом аминокислотного окружения и электронных корреляций.

Экспериментально, на данный момент, получена только структура белка обелина содержащая HP-CLZ и структура целентеразин-связывающего белка (CBP) *Renilla Muelleri*, содержащая CLZ. При оптимизации геометрии структуры целентеразина, взятой из рентгеноструктурного анализа CBP (CLZ(7H) или CLZ(1H)) в аминокислотном окружении обелина происходит разрушение структуры целентеразина потому что одним из своих заместителей целентеразин, протонированный в положении N(7) или N(1), пересекается с аминокислотным окружением – His175 и Trp135 (рис. 5). Если оптимизировать целентеразин в форме CLZ(2H) в тех же условиях, получается стабильная молекула.

В работе [1] проведено исследование немодифицированного CLZ и его аналогов в различных растворителях. Показано, что в растворителях различной полярности наблюдается различный максимум поглощения (в протонных ~ 435 нм, в апротонных – с красным сдвигом ~ 455 нм). Данные максимумы поглощения были приписаны разным изомерным формам – CLZ(7H) и CLZ(2H) соответственно.

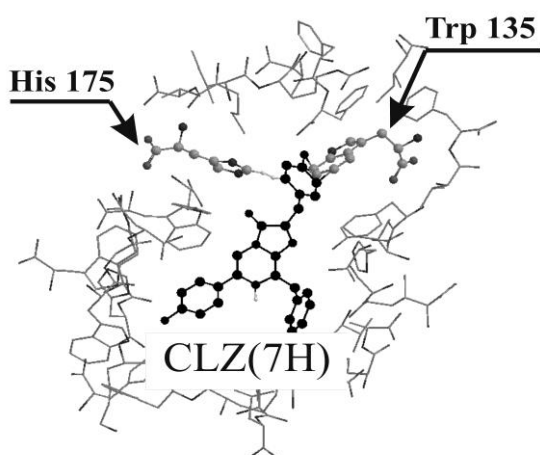


Рис. 5 – Положение целентеразина в форме CLZ(7H) в белке обелине.

Формы CLZ(1H) и CLZ(7H) геометрически очень похожи, и в связи с тем, что рентгеноструктурный анализ не показывает атомов водорода в молекуле, сложно определить, какая именно структура находится в белке. С другой стороны для правильного определения спектральных характеристик необходимо знание точной атомной структуры молекулы. Даже небольшие изменения в атомной структуре приводят к заметным сдвигам в спектрах поглощения. В структуре целентеразина присутствуют

атомы азота и кислорода с неподеленными электронными парами. Наличие данных атомов приводит к корреляционным эффектам, поэтому было решено проверить атомную структуру целентерамида с помощью одноэлектронных приближений (метод HF) и с учетом корреляционных поправок (CI, B3LYP, MP2).

В таблице 1 представлены энергии трех изомерных структур целентеразина, полученные различными методами.

¹ Hori K., Anderson J.M., Ward W.W., Cormier M.J. // *Biochemistry*, Vol. 14, No. 11. – 1975. – P. 2371 – 2376

При учете корреляции уменьшается энергетическая разница между структурами CLZ(1H) и CLZ(7H) (18 кДж/моль без учета корреляции и 6 кДж/моль с учетом). Это происходит из-за того, что структуры CLZ(1H) и CLZ(7H) геометрически различаются мало, в отличие от структуры CLZ(2H), у которой C(2) находится в sp^3 -гибридизации, и фенольное кольцо отклонено от плоскости пирезинового кольца на 125° . Аналогичная ситуация наблюдается и в случае первопринципных методов. В случае метода Хартри-Фока наблюдается достаточно большое различие энергий структур CLZ(1H) и CLZ(7H) (59 кДж/моль) и слабое различие между структурами CLZ(7H) и CLZ(2H) (30 кДж/моль).

Табл. 1 – Энергия целентеразина, полученная различными методами кДж/моль

Форма целентеразина \ Метод расчета	CLZ(1H)	CLZ(7H)	CLZ(2H)
PM3	-461338	-461333	-461348
PM3 CI	-461338	-461333	-461348
PM6	-470891	-470873	-470876
PM6 CI	-470900	-470894	-470885
HF	-3635586	-3635645	-3635675
DFT B3LYP	-3656046	-3656071	-3656071
MP2	-3647264	-3647270	-3647415

При расчете методом MP2 разница между структурами CLZ(1H) и CLZ(7H) уменьшается (6 кДж/моль), и сильнее проявляется разница между структурами CLZ(7H) и CLZ(2H) (145 кДж/моль). Метод DFT не показывает разницы между структурами CLZ(7H) и CLZ(2H). При этом следует отметить, что полуэмпирический метод показывает структуру CLZ(1H) более устойчивой, а первопринципные методы – CLZ(7H).

При учете электронной корреляции методом MP2 разница между CLZ(7H) и CLZ(1H) не большая, можно предположить, что они при определённых условиях могут переходить друг в друга в растворителях достаточно легко. Поэтому определить, какая структура существует в том или ином растворителе только из энергетического фактора нельзя. На основании полученных геометрий был выполнен расчет спектров поглощения изомерных форм целентеразина в вакууме, метаноле и DMSO. Расчет спектров поглощения CLZ в растворителях проводился прямым и косвенным методом. Для прямого метода расчетов молекула целентеразина была помещена в окружение из 10 молекул растворителя. Расчет проводился полуэмпирическим методом PM3, чтобы учесть электростатическое взаимодействие. Косвенный метод расчета был выполнен с использованием РСМ-модели методом DFT-B3LYP/6-31*. В РСМ модели (Polarizable Continuum Model) растворитель неявно

учитывается введением диэлектрической проницаемости среды, и других свойств растворителя [2,3]. Результаты расчетов приведены в таблице 2.

При расчете спектров поглощения в вакууме метод РМ6, реализованный в программе МОРАС, не показал различия в спектрах для изомерных форм CLZ. Метод TD DFT на основе геометрий, полученных методом MP2 показывает максимумы поглощения для всех форм CLZ в тех же пределах что и на основе геометрий, полученных методом DFT B3LYP. Поэтому при рассмотрении спектров в растворителях данные методы можно исключить.

Табл. 2 – Максимумы поглощения структур CLZ в растворителях, нм.

Метод расчета Форма целен- теразина	TD DFT B3LYP	PM3 CI
Вакуум		
CLZ(1H)	470	440
CLZ(7H)	450	475
CLZ(2H)	441	363
CH ₃ OH		
CLZ(1H)	435	433
CLZ(7H)	435	499
CLZ(2H)	442	362
DMSO		
CLZ(1H)	434	430
CLZ(7H)	437	540
CLZ(2H)	444	369

Расчет максимумов поглощения методом B3LYP в рамках PCM-модели для CLZ(1H) и CLZ(7H) показывает, что разница в максимумах поглощения между структурами минимальна (табл.2). В принципе данный расчет показывает хорошее соответствие с предположением, которое было выдвинуто Кормиером [1] о том, что в апротонном растворителе присутствует форма CLZ(2H) (эксперимент – 454 нм, расчет – 444 нм), а в протонном растворителе форма CLZ(7H) (эксперимент – 435 нм, расчет – 435 нм). При этом данный расчет показывает, что структура CLZ(1H) также может присутствовать, т.к. её максимумы поглощения лежат в той же области что и для CLZ(7H). Главной проблемой данных расчётов является то, что метод TD DFT не очень хорошо описывает спектры поглощения биологических объектов [4,5].

Максимум поглощения структуры CLZ(2H), рассчитанный полуэмпирическим методом PM3, показывает значение ~ 360 нм. Поэтому структура CLZ(2H) исключена из дальнейшего рассмотрения.

Расчеты с использованием конфигурационного взаимодействия в рамках метода PM3, который хорошо параметризован для биологических объектов, показывают сильный красный сдвиг для структуры CLZ(7H) при любых условиях. Таким образом,

² Cossi M., Barone V., Cammi R. Tomasi J. // Chem.Phys.Lett., Vol. 255. – 1996. – P. 327 – 330

³ Barone V., Cossi M., Tomasi J. // J.Chem.Phys., Vol. 107. – 1997. – P. 3210 – 3217

⁴ Nakatani N., Hasegawa J., Nakatsuji H. // JACS, Vol. 129. – 2007. – P. 8756-8765

⁵ Casida M.E., Salahub D.R. // J. Chem. Phys., Vol. 113. – 2000. – P. 8918 – 8935

на основании полуэмпирических расчетов с учетом электронных корреляций методом конфигурационного взаимодействия можно сделать следующее заключение: в апротонном растворителе CLZ существует в форме CLZ(7H), а в протонном – CLZ(1H), в отличие от того, что считалось ранее [1].

Для того, чтобы определить, какая же структура является более предпочтительной в тех или иных условиях, было проведено сравнение длин связей для структур CLZ(1H) и CLZ(7H) (табл. 3). В таблице также приведено σ — среднеквадратическое отклонение. Структура CLZ(2H) не принималась во внимание при сравнении геометрических параметров, т.к. ее образование в растворителе маловероятно. Следует отметить, что метод Хартри-Фока дает ошибку при расчете длин связей азота и кислорода. Полуэмпирический метод PM6 (также как и PM3) немного лучше описывает эти связи. Из сравнения геометрий видно, что наиболее близкая к экспериментальным данным структура – CLZ(1H). Все методы расчета показали отклонение для данной структуры меньше, чем для структуры 7H.

Табл. 3 – Сравнение атомных структур двух таутомерных форм целентеразина, отклонение от экспериментальных данных, Å. Номера связи соответствуют рис. 2

Метод	PM6 CI		HF		DFT		MP2	
	CLZ(1H)	CLZ(7H)	CLZ(1H)	CLZ(7H)	CLZ(1H)	CLZ(7H)	CLZ(1H)	CLZ(7H)
1-2	0,03	-0,03	0,03	-0,09	0,03	-0,04	0,01	-0,01
2-3	-0,02	0,04	-0,08	0,04	-0,05	0,01	-0,03	-0,01
3-4	0,14	0,10	0,10	0,02	0,12	0,06	0,09	0,07
4-5	0,05	0,06	0,01	0,05	0,02	0,04	0,02	0,03
5-6	-0,02	-0,04	-0,05	-0,07	-0,02	-0,04	-0,02	-0,03
6-7	0,06	0,09	0,02	0,05	0,03	0,06	0,03	0,05
7-8	-0,03	0,04	-0,07	0,04	-0,03	0,03	-0,01	0,02
8-9	-0,04	-0,11	-0,06	-0,15	-0,07	-0,12	-0,09	-0,11
9-1	0,00	0,04	-0,05	0,01	-0,02	-0,01	-0,01	-0,02
4-9	0,08	0,12	-0,01	0,06	0,03	0,07	0,05	0,06
σ	0,058	0,070	0,058	0,073	0,054	0,060	0,050	0,053

Исходя из сравнения атомной структуры при учете электронных корреляций, можно сделать вывод, что начальной структурой процесса будет являться структура CLZ(1H), а не CLZ(7H), как считалось ранее.

Однако, как было показано выше, в аминокислотном окружении обелина может существовать только структура CLZ(2H). Следовательно, образование 2-гидропероксицелентеразина может начинаться только из целентеразина в форме CLZ(2H). На рисунке 6 представлена схема и энергетическая диаграмма данного процесса. Процесс происходит в одну стадию. Для того чтобы запустить активацию, необходимо затратить 68 кДж/моль. Рассчитанная энтальпия реакции составляет порядка 60 кДж/моль. Энергия активации, полученная из квантово-химических расчетов, хорошо согласуется с экспериментальными данными, из которых энергия активации составила 57,4 кДж/моль, энтальпия при 20 градусах – 55 кДж/моль.

Полученные результаты поднимают вопрос о том, каким образом может образовываться структура CLZ(2H) из структур CLZ(7H) или CLZ(1H).

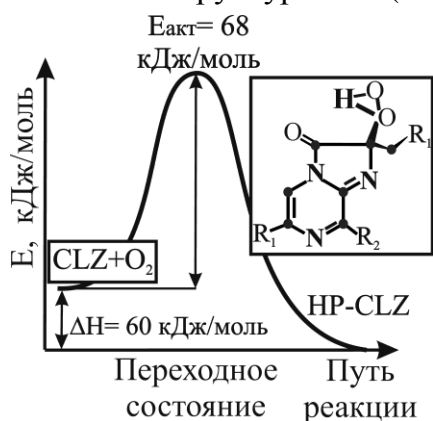


Рис. 6 – Механизм образования 2-гидропероксицелентеразина и энергетическая диаграмма данного процесса

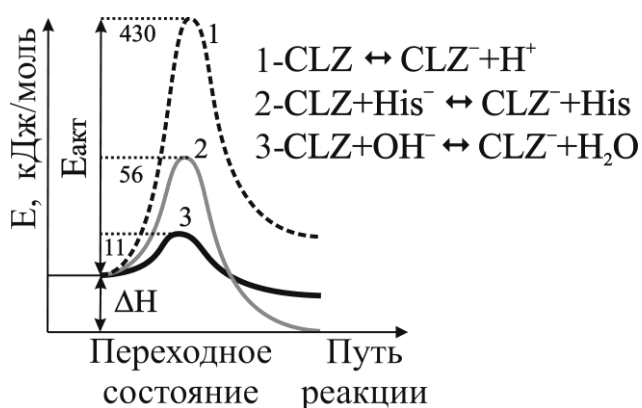


Рис. 7 – Энергетические схемы реакции депротонирования целентеразина

Образование CLZ(2H) может проходить по анионному механизму из структуры CLZ(1H) или CLZ(7H). Первым шагом данной реакции является депротонирование целентеразина в положении N(7) или N(1) (рис. 7). Из энергетической схемы реакции (рис. 7) видно, что депротонирование CLZ может происходить в присутствии OH(-) или аниона аминокислоты. Далее происходит переход заряда с положения N(7) или N(1) в положение C(2).

В работе [6] предполагалось, что образование HP-CLZ может происходить через образование аниона CLZ. Согласно данной схеме проводилось моделирование процесса присоединения молекулы кислорода к аниону. В соответствии с квантово-химическими расчетами, если молекулярный кислород находится вблизи атома C(2), на котором находится заряд -1, то при оптимизации геометрии данного кластера происходит циклизация, с последующим образованием структуры соответствующей конечным продуктам реакции — CLM и CO₂. Следовательно, образование гидроперекиси HP-CLZ может происходить только из незаряженной формы.

⁶ Kondo, H.; Igarashi, T.; Maki, S.; Niwa, H.; Ikeda, H.; Hirano, T. // Tetrahedron Lett., Vol. 46, N. 45. – 2005. – P. 7701 – 7704

Соответственно, следующая стадия – присоединение протона в положение C(2). Энергетическая схема данного процесса представлена на рисунке 8. Для образования CLZ(2H) из аниона необходимо присутствие аминокислоты, которая может отдать протон. Тогда реакция идет или с более низким барьером (в случае присутствия воды) или безбарьерно (в случае присутствия His(+)).

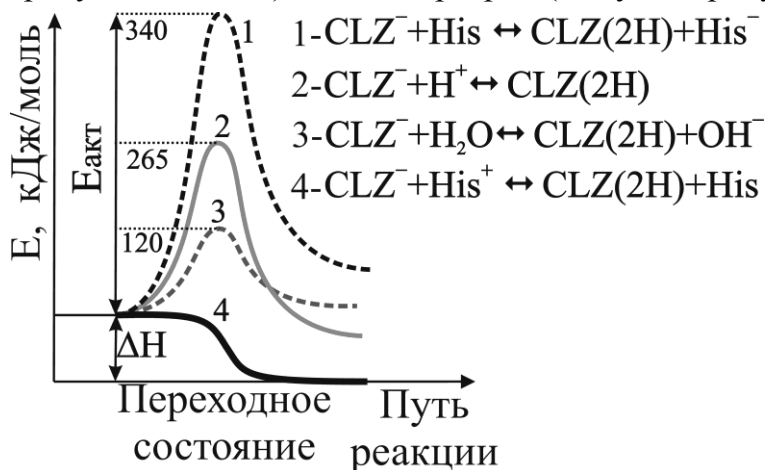


Рис. 8 – Энергетические схемы процесса протонирования аниона целентеразина

Таким образом, можно сделать вывод, что формирование целентеразина в форме CLZ(2H) происходит через образование аниона (рис. 9). Первым шагом реакции идет депротонирование целентеразина аминокислотным окружением. Роль «основания» может играть аминокислота His175, которая лежит в области пиразиноновых колец.

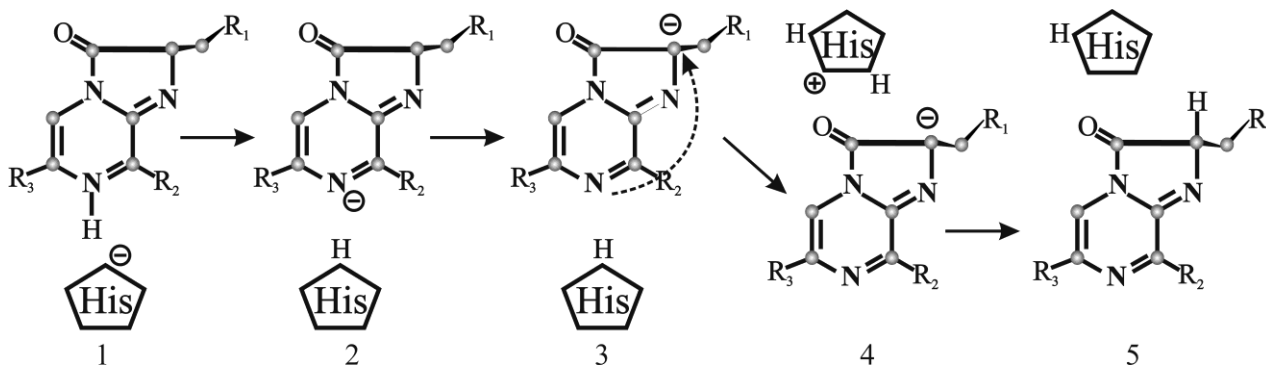


Рис. 9 – Схема анионного механизма образования целентеразина в форме CLZ(2H).

Из структуры белка видно, что рядом с His175 находится аминокислота, содержащая ионизированную $-\text{COO}^{(-)}$ группу, которая она может отобрать у His175 водород, переводя его в заряженную форму, которая, в свою очередь, забирает водород у целентеразина (рис. 9.1). На депротонирование целентеразина необходимо затратить 11 кДж/моль (рис. 7). Далее происходит переход заряда с атома азота N(7) на атом углерода C(2) ($E_{\text{акт}} \sim 1,5$ кДж/моль). Затем анион целентеразина CLZ(2-) протонируется аминокислотным окружением (рис. 9.5). Данный процесс происходит без затрат энергии (рис. 8). Данный результат хорошо согласуется с экспериментом, согласно которому замена аминокислоты His175 приводит к резкому падению активности фотопротейна.

В четвертой главе рассматривается влияние ван-дер-ваальсового взаимодействия на процесс активации молекулой кислорода CLZ. Для того чтобы

выяснить, что является движущей силой образования HP-CLZ и какая среда является оптимальной для активации целентеразина кислородом, мы провели оптимизацию геометрии кластера, включающего целентеразин, кислород, воду и несколько аминокислот His175, His64, Tyr138 и Tyr190 (код PDB – 1QV0). Ван-дер-ваальсовы силы могут играть ключевую роль в процессе активации целентеразина. Поэтому для расчетов были использованы полуэмпирические квантово-химические методы, включающие ван-дер-ваальсово взаимодействие и водородные связи.

В качестве отправной точки расчетов были взяты молекулы целентеразина и на различном удалении от атома C(2) молекула кислорода в основном триплетном состоянии. Данные расчёты (табл. 4) показывают, что целентеразин в присутствии O₂ не формирует стабильного комплекса. Более того, в процессе оптимизации геометрии молекула кислорода всегда удалялась от C(2) атома целентеразина на 3,6 Å и более (рис. 10).

Табл. 4 – Энергетические характеристики образования кластера и расстояние до молекул кислорода и воды

Кластер	ΔE, кДж/моль	Расстояние до O ₂ , Å	Расстояние до H ₂ O, Å
CLZ···O ₂ ···H ₂ O···Tyr138···His175	-93,82	2,33	3,01
CLZ···O ₂ ···Tyr138···His175	-37,44	2,39	—
CLZ···H ₂ O···Tyr138···His175	-84,67	—	1,98
CLZ···O ₂ ···H ₂ O···Tyr138	-64,97	2,33	2,86
CLZ···O ₂ ···Tyr138	-24,90	2,44	—
CLZ···H ₂ O···Tyr138	-66,19	—	2,87
CLZ···O ₂	0,38	3,60	—
CLZ···H ₂ O	-20,05	—	3,10
CLZ···O ₂ ···H ₂ O	-21,49	2,94	2,33

Далее к данной модели добавлялись различные молекулы: гистидин, тирозин и вода в различных позициях и комбинациях. Аминокислоты были выбраны и расположены в кластере в соответствии с аминокислотными остатками в кристаллической структуре обелина – His175, His64, Tyr138 и Tyr190. Оптимизация геометрии молекул при различных положениях полярных молекул (Tyr или вода) и кислорода относительно молекулы целентеразина приводит к тому, что все структуры попадают в одно положение на поверхности потенциальной энергии, в которой кислород располагается напротив с C(2)-H, а полярная молекула – напротив N(1) атома. Расстояние между молекулой кислорода и целентеразином равно 2,3Å, выигрыш энергии при этом достигает 20 кДж/моль.

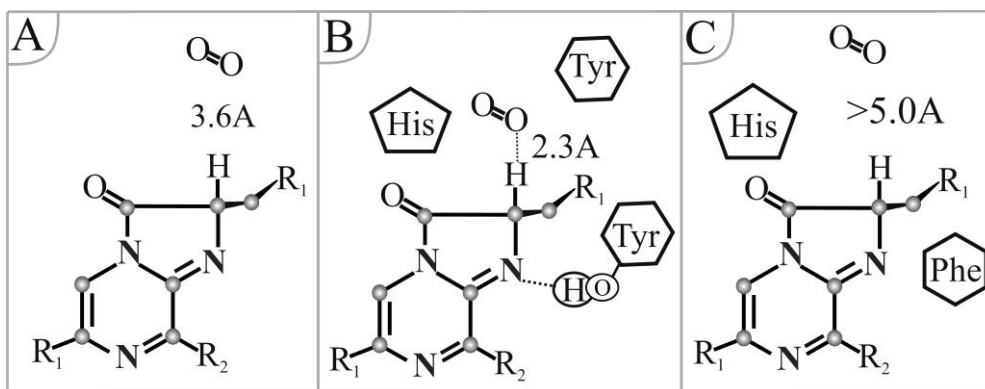


Рис. 10. Образование комплекса целентеразина с молекулой кислорода при различном окружении.

Была проведена оптимизация кластера, содержащего целентеразин, кислород и воду. При последовательном расположении молекулы воды на различные расстояния от N(1) азота целентеразина (3 – 10 Å), при фиксированном расстоянии до кислорода 2,4 Å, оптимизация приводит к тому, что молекула воды приближается к N(1) азоту целентеразина на 3 Å когда она находится на расстоянии до 5 Å. В результате близкого положения молекулы воды N(1) азот целентеразина поляризуется и формируется стабильный комплекс между целентеразином и кислородом.

Для проверки влияния полярных молекул на стабилизацию кластера «CLZ...O₂» была проведена замена тирозина около N(1) азота на фенилаланин. В ходе оптимизации молекула кислорода отошла от C(2)-Н связи на достаточно большое расстояние (>5 Å). Из данных расчётов видно, что для формирования устойчивого комплекса между водородом C(2)-Н и молекулой кислорода необходимо наличие полярной молекулы у атома N(1). Полярная молекула влияет на атом N(1) который в свою очередь, с помощью индукционного эффекта перераспределяет заряд в пиразиновом кольце. Данный эффект вызывает появление мгновенного диполя на молекуле кислорода, что приводит к ее приближению к C(2)-Н связи.

В пятой главе проводится изучение физико-химических процессов, происходящих при флуоресценции фотопротеинов.

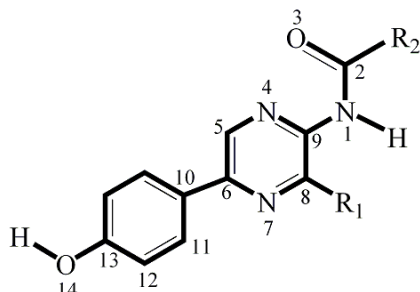


Рис. 11 – Строение целентерамида

Так как конечная структура CLM (рис. 11) является эммитером флуоресцентной реакции, то знание точной геометрии структуры становится особенно важным. Даже небольшие изменения в атомной структуре приводят к достаточно большим сдвигам в спектрах поглощения.

Поэтому, необходимо выяснить насколько сильно в данной структуре проявляются корреляционные эффекты и нужно ли в дальнейшем их учитывать или можно использовать только одноэлектронные приближения. В таблице 5

представлено сравнение длин связей рассчитанных структур относительно эксперимента.

Табл. 5 – Сравнение геометрии, полученной различными методами, для незараженной формы целентерамида, Å. Номера связи соответствуют рис. 11

Метод расчета Номер связи	PM3		PM6		HF	DFT	MP2
	-	CI	-	CI			
2-3	0,02	0,02	0,03	0,03	0,00	0,02	0,03
3-4	-0,01	-0,01	0,00	0,00	-0,02	-0,01	-0,01
4-5	-0,02	-0,02	-0,02	-0,02	-0,03	-0,02	-0,02
5-6	0,01	0,01	0,02	0,02	0,01	0,02	0,02
6-7	-0,04	-0,04	-0,03	-0,03	-0,02	-0,02	-0,03
7-8	0,00	0,00	0,00	0,00	-0,04	-0,02	-0,01
8-9	0,01	0,01	0,01	0,01	-0,03	-0,01	0,00
9-10	0,01	0,01	0,03	0,03	0,00	0,01	0,01
10-11	0,02	0,02	0,02	0,02	-0,03	0,00	0,00
11-12	-0,01	-0,01	-0,01	-0,01	-0,04	-0,03	-0,02
12-7	0,03	0,03	0,04	0,04	0,00	0,02	0,02
10-13	0,09	0,07	0,07	0,07	0,05	0,05	0,05
13-16	0,09	0,10	0,07	0,08	0,02	0,03	0,03
σ^*	0,038	0,037	0,031	0,032	0,026	0,024	0,024

В системе связей с N(1) полуэмпирический метод показывает сильное отклонение от экспериментальной структуры. Но при расчете данной связи достаточно сильное отклонение от эксперимента (0,05 Å и более) показывают все методы. Вероятно, это связано с тем, что атом кислорода O(3) оттягивает на себя электронную плотность, приводя, тем самым, к искажению структуры. Метод Хартри-Фока сильно ошибается при расчете длин связей азота и кислорода. Полуэмпирический метод немного улучшает результаты, но тоже допускает ошибки в связях с азотом. Но полуэмпирические расчеты учитывают водородные связи и ван-дер-ваальсово взаимодействие, что дает им преимущество перед ab-initio методами.

При сравнении длин связи структур CLM, рассчитанных в возбужденном (Ψ^*) и основном (Ψ_0) состоянии (рис. 12) видно, что значения сильно меняются на фенольном и пиразининовом кольцах. Этими изменениями в геометрии можно объяснить большой Стоксов сдвиг в спектре флуоресценции (~ 140 нм), они показывают участие атомов этих колец в перераспределении полученной энергии

возбуждения. Стоит отметить, что при оптимизации геометрии полуэмпирическими методами с учетом электронных корреляций данная область молекулы CLM описывается достаточно хорошо (табл. 5).

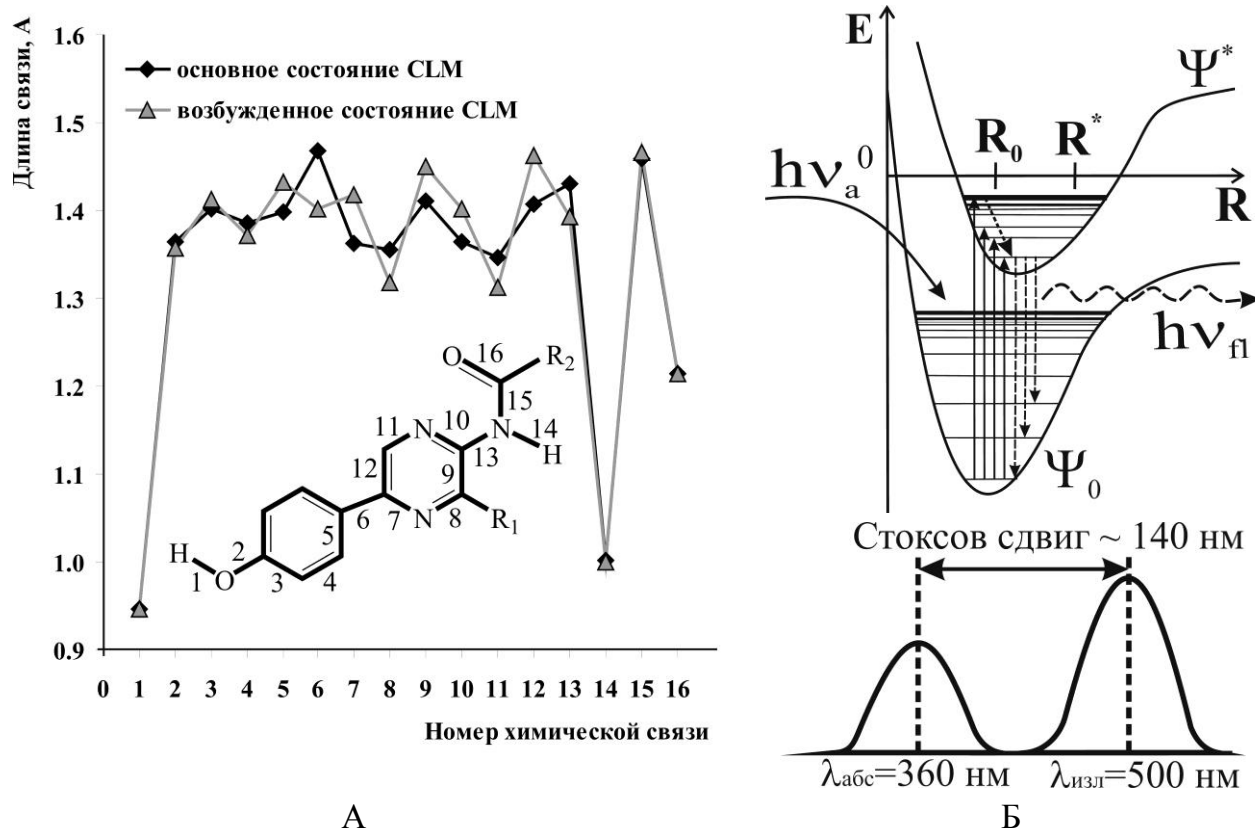


Рис. 12. А - Сравнение длин связей структур CLM в основном и возбужденном состояниях, рассчитанных методом КВ РМ3.

Б – Схема процессов, происходящих в процессе флуоресценции

В работе [7] при исследовании флуоресценции целентерамида и его аналогов в различных растворителях было установлено, что в зависимости от растворителя возбужденный целентерамид может образовывать несколько ионных форм (рис. 4). В таблице 6 представлены результаты расчетов длин волн флуоресценции для всех возможных форм целентерамида в вакууме и в аминокислотном окружении.

Табл – 6. Длина волны люминесценции целентерамида и его форм

Центральная молекула	РМ3		$\lambda_{\text{экср}}, \text{нм}$
	Без окружения, $\lambda_{\text{расч}}, \text{нм}$	В присутствии окружения $\lambda_{\text{расч}}, \text{нм}$	
CLM	329	343	387 – 409
CLM-Pyr	483	520	530 – 565
CLM-Amid	379	430	435 – 458

⁷ Shimomura O., Teranishi K. Light-emitters involved in the luminescence of coelenterazine // Luminescence, Vol. 15. – 2000. – P. 51–58

Данные расчетов длины волны излучения целентерамида в вакууме без окружения значительно расходятся с экспериментально полученными значениями для структур CLM, CLM-pyr и CLM-amid. Поэтому была построена кластерная модель белка (рис. 13).

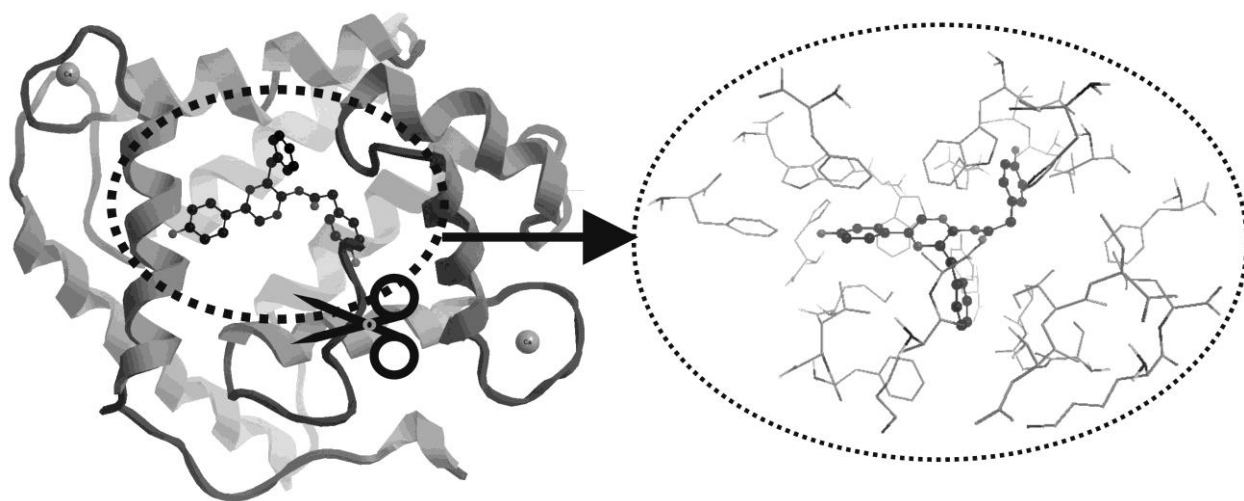


Рис. 13 – Построение кластера фотопротеина

В модель было включено ближайшее аминокислотное окружение полости, в которой находится целентерамид, в предположении, что оно может сильно влиять на возбужденные состояния CLM. При моделировании системы аминокислотное окружение было зафиксированным и играло роль электростатического поля. Рассчитывалась молекула целентерамида (около 50 атомов) в ее ближайшем аминокислотном окружении на расстоянии 4-5 Å от атомов целентерамида, всего около 500 атомов. Из данных таблицы 6 видно, что длины волн для данных форм близки к экспериментальным значениям, полученным для этих форм в различных растворителях, но не подходят под экспериментальное значение флуоресценции обелина (максимум 495–510 нм). Таким образом, эти формы не подходят на роль эмиттера.

При моделировании фенолят-аниона в результате отрыва протона образуется анион с отрицательным зарядом на фенольном кислороде. Кислород образует двойную связь с образованием «хинонной» группы, что приводит к перестройке структуры с образованием пиазин-аниона. В этой связи структуру фенолят-аниона невозможно рассчитать. Поэтому была построена модель, основанная на следующих приближениях: полученная энергия в ходе флуоресценции (3,5 эВ), идет на перемещение протона. Моделирование проводилось следующим образом. Протон помещали в различные положения между двумя крайними позициями, расстояние между которыми составляло 2,8 Å (рис. 14).

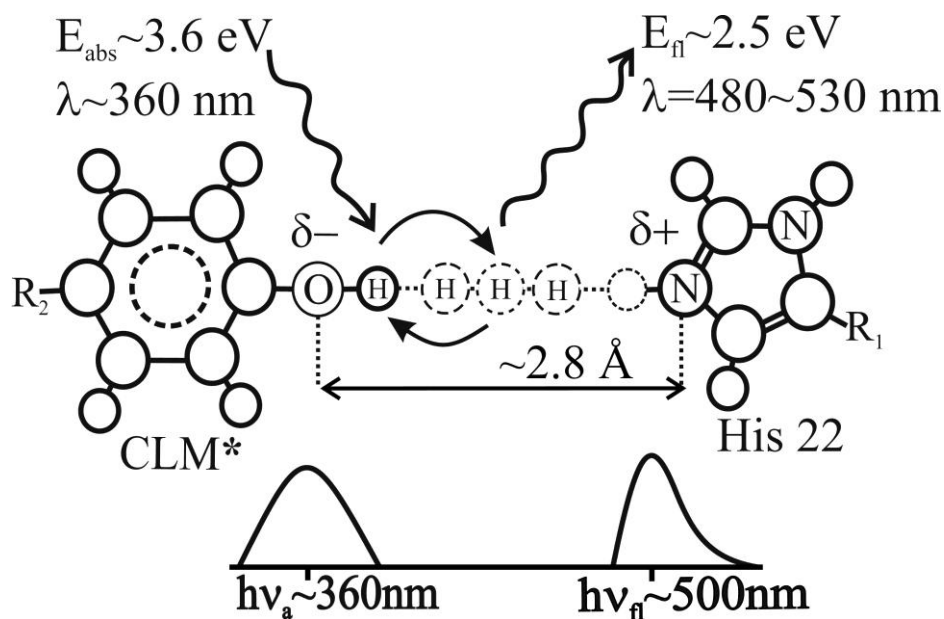


Рис. 14 – Моделирование процесса переноса водорода между эмиттером и His22.

Табл. 7 – Длины волны флуоресценции в зависимости от положения протона

Расстояние CLM — Н, Å	$E_{\text{пер}}$, эВ	λ , нм
0,92	3,62	343
1,31	3,62	343
1,36	3,62	343
1,40	3,65	340
1,47	3,42	363
1,50	3,27	380
1,56	2,97	417
1,60	2,79	445
1,63	2,65	469
1,64	2,53	492
1,78	1,63	763
1,85	1,96	633
1,90	2,00	620
1,96	2,02	615
2,02	2,04	610

В каждом положении отдельно проводился расчет основного и возбужденного состояния (табл. 7). Данная схема позволяет смоделировать процесс образования комплекса с переносом протона, который получил название “Ion-pair proton transfer” и который образуется при биолюминесценции Ca^{2+} -регулируемых фотопротеинов. Расстояние 0,92 Å между кислородом и протоном соответствует равновесной геометрии основного состояния нейтральной формы целентерамида. Энергия перехода в данном состоянии 3,6 эВ (340 нм). Полученная энергия тратится на перемещение протона и возбуждение системы. Экспериментально излучение системы происходит в районе 2,5 эВ (~500 нм), что в наших расчетах соответствует положению протона посередине между целентерамидом и гистидином (~1,65 Å). Нахождение протона на расстоянии большем, чем 1,8 Å, показывает энергию перехода в районе 1,5-2,0 эВ (~600-700 нм).

В спектре флуоресценции данные длины волн не наблюдаются, это связано с тем, что перемещение на расстояние более 1,8 Å требует дополнительных затрат энергии.

Таким образом, процесс флуоресценции Ca^{2+} -разряженного обелина хорошо моделируется перемещением протона от кислорода фенольной группы CLM до азота аминокислоты His22. Вероятнее всего, что аналогичный процесс имеет место и при биолюминесцентной реакции фотопротеинов. По-видимому, спектр биолюминесценции также определяется положением протона между атомом кислорода фенольной группы CLM в возбужденном состоянии и атомом азота His22. С помощью квантово-химических методов было проанализировано влияние ближайшего аминокислотного окружения на длину волны излучения нейтральной формы целентерамида. При расчете CLZ без окружения длина волны излучения составляет 375 нм. Присутствие аминокислотного окружения сдвигает длину волны на 6 нм (381 нм). Особенно сильное влияние наблюдается от молекул воды, His22, Trp92. Каждая из этих аминокислот по отдельности сдвигает длину волны на 1-2 нм (376-377 нм), а при совместном присутствии – на 4 нм (379 нм). Можно сделать вывод, что, хотя аминокислотное окружение не связано с центральной молекулой целентерамида, оно электростатически действует на него, сдвигая длину волны.

ВЫВОДЫ

На основании полученных результатов можно сделать следующие выводы:

1. Проведены расчеты различных изомерных форм целентеразина методами одноэлектронного приближения и с учетом электронных корреляций. Показано, что учет электронных корреляций дает структуру более близкую к экспериментальной и позволяет выбрать форму целентеразина CLZ(1H) как наиболее вероятную из возможных изомерных форм. Целентеразин в протонных растворителях находится в изомерной форме CLZ(1H), в апротонных – в форме CLZ(7H). Образование формы CLZ(2H) в растворителях не происходит. В отличие от растворителей, в белке обелина целентеразин находится в форме CLZ(2H). Активация целентеразина молекулой кислорода с образованием молекулы HP-CLZ возможна только для структуры CLZ(2H). Изомерная форма CLZ(2H) может образовываться только при захвате целентеразина белковым окружением.

2. Показано, что ван-дер-ваальсово взаимодействие влияет на процесс формирования HP-CLZ. Присутствие полярной молекулы, которая благодаря индукционному эффекту перераспределяет заряды в молекуле целентеразина, приводит к стабилизации комплекса «CLZ-O₂». Рассчитана энергия активации реакции образования HP-CLZ. Барьер для реакции составляет 68 кДж/моль, $\Delta H = 60$ кДж/моль, что хорошо согласуется с экспериментальными данными: $E_{акт} = 57,4$ кДж/моль, $\Delta H = 55$ кДж/моль.

3. Построена физическая модель флуоресценции фотопroteина обелина, в которой рассчитаны электронные структуры молекул CLM в основном и возбужденном состояниях с учетом электронных корреляций методом конфигурационного взаимодействия. Рассмотрено пять возможных вариантов возбужденных состояний CLM в процессе флуоресценции. Показано, что экспериментально наблюдаемая длина волны излучения 500 нм соответствует «комплексу с переносом протона» между кислородом целентерамида и гистидином His22.

Список публикаций:

1. Tomilin F.N., Antipina L.Yu., Vysotski E.S., Ovchinnikov S.G., Gitelzon I.I. Fluorescence of Calcium-Discharged Obelin: The Structure and Molecular Mechanism of Emitter Formation. // *Doklady Biochemistry and Biophysics*, Vol. 422. – 2008. – P. 279–284.
2. Томилин Ф. Н., Антипина Л.Ю., Высоцкий Е.С., Овчинников С.Г., Гительзон И.И. Механизм формирования эммитера флуоресценции кальций-разряженного обелина. // *Биофизика*, том 54, вып. 4. – 2009. – С. 630-637.
3. Овчинников С. Г., Антипина Л. Ю., Томилин Ф. Н., Кузубов А. А. Влияние электронных корреляций на структуру субстратов фотопротеинов // *Письма в ЖЭТФ*, Т. 91, № 9. – 2010. – С. 536 – 540.
4. Tomilin F. N., Antipina L. U., Ereemeeva E.V., Ovchinnikov S. G., Vysotski E. S. Quantum chemical study of mechanism of active photoprotein generation // *Luminescence*, Vol. 25, No. 2. – 2010. – P. 210-211
5. Tomilin F.N., Antipina L.U., Ovchinnikov S.G., Vysotski E.S. The theoretical studies of light emitters in bioluminescence of Ca^{2+} -regulated photoprothoin obelin // *Luminescence*, March-April 2008, V.23, Issue № 2, P. 96.
6. Томилин Ф.Н., Антипина Л.Ю., Высоцкий Е.С., Овчинников С.Г. Исследование реакции образования гидроперекиси целентеразина Ca^{2+} -регулируемого фотопротеина *Obelia Longissima* // Сборник материалов IV школы-семинара молодых ученых «Квантово-химические расчеты: структура и реакционная способность органических и неорганических молекул», Иваново, 20-22 мая 2009, стр. 166-169.
7. Антипина Л.Ю., Томилин Ф.Н., Овчинников С.Г. Теоретическое изучение люминесценции Ca^{2+} -регулируемого фотопротеина обелина // *НКСФ-XXXVI (2007)*, тезисы докладов научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых физиков. Красноярск, 13-14 апреля 2007 г. КГУ. Стр. 77.
8. Антипина Л.Ю., Качин С.В., Томилин Ф.Н. Квантово-химическое изучение биолюминесценции Ca^{2+} -регулируемого фотопротеина обелина // Тезисы VIII Всероссийской научно-практической конференции студентов и аспирантов «Химия и Химическая технология в XXI веке», 14-15 мая 2007г., Томск, ТПУ. С. 251-252.
9. Антипина Л.Ю., Томилин Ф.Н., Овчинников С.Г. Теоретическое изучение флуоресценции в Ca^{2+} -регулируемом фотопротеине обелине // Тезисы XX зимней международной молодежной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Москва, 11-15 февраля 2008г. С. 64
10. Томилин Ф., Антипина Л., Высоцкий Е., Овчинников С. Квантово-химическое моделирование процесса флуоресценции кальций-разряженного

обелина // Тезисы V съезда Российского фотобиологического общества, международной конференции «Преобразование энергии света при фотосинтезе», Пущино, 8-13 июня 2008г. С. 115

11. Антипина Л.Ю., Томилин Ф.Н., Овчинников С.Г., Высоцкий Е.С. Изменение структуры субстратов белков, выделенных из *Obelia Longissima* и *Renilla Muelleri* // Тезисы 12-ой международной пущенской школы-конференции молодых ученых «Биология в XXI веке, Пущино, 10 – 14 ноября 2008, стр. 258

12. Антипина Л.Ю., Томилин Ф.Н., Овчинников С.Г., Высоцкий Е.С. Исследование механизма получения субстрата белков *Obelia Longissima* и *Renilla Muelleri* // Тезисы XX Симпозиума «Современная химическая физика», Туапсе, 15-26 сентября 2008, стр. 92

13. Антипина Л.Ю., Томилин Ф.Н., Овчинников С.Г., Высоцкий Е.С. Теоретическое изучение процесса активации кислородом субстрата фотопротеина обелина // Тезисы XXI Симпозиума «Современная химическая физика», Туапсе, 25 сентября – 06 октября 2009, стр. 313.

14. Антипина Л.Ю., Томилин Ф.Н., Овчинников С.Г., Высоцкий Е.С. Влияние аминокислотного окружения на длину волны целентеразина, выделенного из *Obelia Longissima* // Тезисы 13-ой международной пущенской школы-конференции молодых ученых, Пущино, 28 сентября – 02 октября 2009, стр. 258

Подписано в печать 09.06.2010

Формат 60x84x16. Усл.печ.л. 1. Тираж 60 экз. Заказ № 19

Отпечатано в типографии Института физики СО РАН

660036, Красноярск, Академгородок 50, стр. 38, ИФ СО РАН