

Влияние электронных корреляций на структуру субстратов фотопротеинов

С. Г. Овчинников^{*+}, Л. Ю. Антипина⁺¹⁾, Ф. Н. Томилин^{*+}, А. А. Кузубов⁺

^{*}Институт физики им. Л.В. Киренского Сибирского отд. РАН, 660036 Красноярск, Россия

⁺Сибирский федеральный университет, 660041 Красноярск, Россия

Поступила в редакцию 6 апреля 2010 г.

Электронная структура и полная энергия различных изомерных форм целентеразина и целентерамида рассчитаны методами квантовой химии как в одноэлектронном приближении, так и с учетом корреляционных эффектов. Показано, что учет электронных корреляций позволяет получить структуру целентерамида, наиболее близкую к экспериментальной, а также выбрать структуру целентеразина CLZ(1H) как наиболее вероятную из возможных изомерных форм.

1. За свечение многих живых организмов отвечают белки – фотопротеины. Недавно были определены кристаллические структуры некоторых фотопротеинов [1–3] и предложены механизмы биолюминесцентной реакции [4, 5]. Для понимания физических процессов, происходящих в активном центре фотопротеина, в первую очередь необходимо определить реальную атомную структуру центральной молекулы целентеразина (CLZ) среди нескольких возможных изомерных форм. В настоящей работе эта задача решается с помощью микроскопических квантовохимических расчетов молекулы CLZ. Применялись различные полуэмпирические и первопринципные методы как в приближении Хартри-Фока, так и с учетом корреляционных эффектов. Оказалось, что результаты одноэлектронных расчетов существенно меняются при учете корреляционных эффектов. Наибольшие отклонения от эксперимента у одноэлектронных полуэмпирического метода РМ3 и первопринципного метода Хартри-Фока. Учет корреляционных эффектов в теории функционала плотности (DFT) и в теории возмущений второго порядка по кулоновскому взаимодействию (метод МР2) хорошо описывает геометрию молекул. Показано, что в активном центре фотопротеинов находится структура CLZ(1H), а не CLZ(7H), как считалось ранее.

2. Биолюминесценция фотопротеинов проходит через несколько стадий (рис.1). Вначале происходит присоединение молекулярного кислорода к начальному субстрату целентеразину с образованием 2-гидропероксицелентеразина (GP-CLZ). Далее, после присоединения ионов кальция к белку структура белка изменяется, что приводит к реакции окислитель-

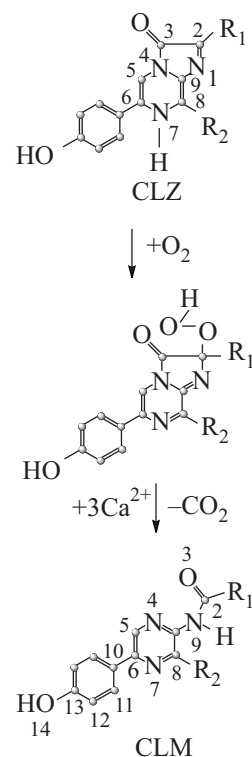


Рис.1. Механизм биолюминесцентной реакции из работы [4]

ного декарбокислирования с образованием продукта реакции целентерамида в возбужденном состоянии.

Авторы работы [6] провели детальное исследование эффектов pH и протонных и апротонных растворителей в анаэробной среде на спектральные свойства целентеразина и некоторых его аналогов. Они нашли, что спектр абсорбции целентеразина в апротонном растворителе (диметилсульфоксид) имеет красный сдвиг по отношению к метанолу (454 и 435 нм, соответственно). Различные абсорбционные максимумы были приписаны различным таутомерным формам

¹⁾ e-mail: antipinalyu@gmail.com

CLZ(7H) и CLZ(2H) соответственно. Однако, исходя из кристаллической структуры субстрата, CLZ(2H) может образовываться только внутри белка обелина. *In vitro* целентеразин может существовать в двух таутомерных формах – CLZ(1H) и CLZ(7H) (рис.2).

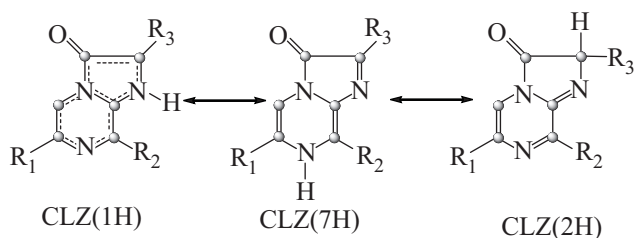


Рис.2. Изомерный переход между формами целентеразина

Между структурами CLZ(1H) и CLZ(7H) нет сильных геометрических различий, поэтому экспериментально показать, какая форма существует в тех или иных условиях, сложно. В работе проведено теоретическое исследование структур методами квантовой химии. Одноэлектронные расчеты в случае, когда необходимо исследовать достаточно сложные структуры (то есть большое количество разнородных связей), содержащие атомы с неподеленными электронными парами (азот и кислород), могут привести к значительной ошибке. Поэтому в данных системах предпочтительно проводить расчеты с учетом электронных корреляций.

3. Метод Хартри-Фока (HF) описывает движение каждого электрона в усредненном поле других электронов. Разница между значениями точной (нерелятивистской) и хартри-фоковской энергий многоэлектронной системы называется корреляционной энергией:

$$E_{\text{correl}} = E_{\text{exact}} - E_{\text{HF}}. \quad (1)$$

Корреляция движения электронов молекулы в пространстве обусловлена тремя причинами:

1) между электронами действуют силы кулоновского отталкивания, которые обуславливают то, что электронам энергетически невыгодно находиться вблизи друг друга;

2) действует принцип Паули, указывающий на невозможность нахождения в одной точке пространства двух электронов с параллельными спинами;

3) зависимость корреляционных эффектов от пространственных свойств симметрии (точечных групп симметрии).

Методами, часто используемыми для расчета корреляционной энергии, являются: теория возмущения Меллера-Плессета (обычно второго и четвертого по-

рядков, MP2 и MP4, соответственно), методы конфигурационного взаимодействия (CI), методы теории функционала плотности (DFT) [7–11].

В методе конфигурационного взаимодействия многоэлектронная волновая функция раскладывается по детерминантам Слетера, каждый из которых описывает систему в одном из возможных электронных состояний. Каждому состоянию отвечает определенная электронная конфигурация: их набор учитывает возможные переходы электрона с занятой молекулярной орбитали (МО) на различные незанятые (виртуальные) орбитали. Это означает, что каждый такой детерминант строится из спин-орбиталей, отвечающих основному или одному из возбужденных одноэлектронных состояний молекулы.

Основная идея теории Меллера-Плессета заключается в представлении решения полной многоэлектронной задачи в виде возмущения хартри-фоковского решения. Основной вклад в энергию корреляции вносит член второго порядка в случае достаточно малых корреляций.

Основная идея теории функционала плотности заключается в том, что энергия электронной системы однозначно определяется электронной плотностью. Таким образом, вместо того, чтобы искать волновую функцию, которая является функцией $3N$ переменных (N – количество электронов в системе), задача сводится к нахождению электронной плотности системы, которая зависит от трех пространственных координат.

В настоящее время в расчетах молекул и кластеров широко используются так называемые гибридные методы функционала плотности. В таких методах обменная энергия записывается как линейная комбинация обменных функционалов LSDA, GGA и обменной энергии Хартри-Фока. Корреляционная энергия записывается как линейная комбинация корреляционных функционалов. Наиболее популярный в настоящее время функционал B3LYP [12] записывается следующим образом:

$$E_{XC}^{B3LYP} = (1 - a)E_X^{LSDA} + aE_X^{HF} + b\Delta E_X^{B88} + E_X^{VWN} + c\Delta E_C^{LYP}. \quad (2)$$

Параметры a , b и c оптимизируются для наилучшего воспроизведения экспериментальных данных.

4. Экспериментально известна структура целентерамида (CLM), а вопрос о структуре CLZ остается открытым. Поэтому мы сначала рассчитали и сравнили с экспериментом структуру целентерамида. В структуре CLM присутствуют атомы азота с неподеленными электронными парами, причем в структуре присутствуют два атома азота, которые участвуют

в образовании как двойных связей с атомом углерода, так и одинарных (N4 и N7), и атом азота, у которого все связи одинарные (N1). Также в структуре присутствует атом кислорода с неподелёнными электронными парами. Наличие данных атомов приводит к корреляционным эффектам, поэтому было решено проверить атомную структуру целентерамида с помощью одноэлектронных приближений (методы PM6 и HF) и с учетом корреляционных поправок (PM6 CI, DFT, MP2). Так как данная структура 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, которые занимают гораздо меньше времени и компьютерных ресурсов.

В табл.1 приведены отклонения длин связей от экспериментальных данных структуры целентерамида, полученные различными методами. Номера связей соответствуют рис.1.

Таблица 1

Отклонения длин связей структуры CLM от эксперимента (Å). Номера атомов i и j соответствуют рис.1

i - j	PM6 CI	HF	DFT	MP2
1-2	0.077	0.023	0.034	0.034
1-9	0.071	0.052	0.054	0.047
2-3	-0.022	-0.036	-0.011	-0.003
4-5	-0.008	-0.039	-0.026	-0.016
4-9	0.025	-0.032	-0.004	0.000
5-6	0.041	0.005	0.022	0.020
6-7	0.004	-0.037	-0.018	-0.012
7-8	0.012	-0.033	-0.012	-0.004
8-9	0.032	-0.001	0.013	0.008
6-10	-0.035	-0.020	-0.025	-0.034
10-11	0.024	0.006	0.019	0.016
11-12	-0.021	-0.033	-0.022	-0.021
12-13	-0.004	-0.021	-0.008	-0.011
13-14	0.029	0.005	0.021	0.027
σ	0.0333	0.0272	0.0246	0.0227
σ^2	0.00111	0.00074	0.00060	0.00052

В табл.1 также приведены среднеквадратичное отклонение σ и дисперсия σ^2 .

Из представленных данных видно, что полуэмпирические расчеты с использованием процедуры PM6 CI уступают ab-initio расчетам. 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 кислород O(3) оттягивает на себя электронную плотность, приводя, тем самым, к искажению структуры. Следует отметить, что метод Хартри-Фока дает ошибку при расчете длин связей азота и кислорода ($r_{2-3}, r_{6-7}, r_{7-8}$). Полуэмпирический метод немного лучше описывает эти связи.

В табл.2 приведены энергии таутомерных форм CLZ, полученных различными методами при расчете в вакууме. При сравнении энергий, полученных полуэмпирическим методом с учетом и без учета CI, видно, что учет конфигурационного взаимодействия понижает энергию структуры.

Таблица 2

Энергия таутомерных форм целентерамина (кДж/моль)

	CLZ(1H)	CLZ(7H)	CLZ(2H)
PM6	-470891	-470873	-470876
PM6 CI	-470900	-470894	-470885
HF	-3635586	-3635645	-3635675
DFT	-3656046	-3656071	-3656071
MP2	-3647264	-3647270	-3647415

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 заместитель R₁ отклонен от плоскости пиразинового 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) до 59 кДж/моль и слабое различие между структурами CLZ(7H) и CLZ(2H) до 30 кДж/моль. При расчете методом MP2 разница между структурами CLZ(1H) и CLZ(7H) уменьшается до 6 кДж/моль, зато сильнее проявляется разница между структурами CLZ(7H) и CLZ(2H) – 145 кДж/моль. Метод DFT не показывает энергетической разницы между структурами CLZ(7H) и CLZ(2H). Однако метод MP2 показывает структуру CLZ(2H) намного стабильней, чем структуры CLZ(1H) и CLZ(7H). То есть учет электронной корреляции стабилизирует структуру целентерамина, протонированную в положении C(2) атома – CLZ(2H).

При этом следует отметить, что полуэмпирический метод показывает структуру CLZ(1H) более устойчивой, а первопринципные методы – CLZ(7H). Учет электронной корреляции методом MP2 показывает небольшую разницу между двумя структурами CLZ(1H) и CLZ(7H), поэтому можно предположить, что это способствует тому что в протонных растворителях эти изомеры могут переходить из одной формы в другую, что было зафиксировано в эксперименте [6].

5. Также был проведен расчет данных структур в растворителях с использованием модели PCM (Polarization Continuum Model) [13–16]. Расчеты показывают, что растворитель нивелирует разницу между структурами. В методе HF разница между структурами CLZ(1H) и CLZ(7H) уменьшается до 37 кДж/моль. При учете корреляции методом DFT разница исчезает практически полностью до 1-2 кДж/моль в зависимости от растворителя. Поэтому определить, какая структура будет образовываться в том или ином растворителе, исходя только из энергетического фактора, нельзя. Для этой цели проведено сравнение длин связи для структур CLZ(1H) и CLZ(7H) (табл.3 и 4).

Таблица 3

Отклонения длин связей структуры CLZ(1H) от эксперимента (Å). Номера атомов i и j соответствуют рис.1

	PM6 CI	HF	DFT	MP2
1-2	0.028	0.035	0.029	0.014
2-3	-0.022	-0.081	-0.049	-0.033
3-4	0.144	0.104	0.115	0.095
4-5	0.047	0.014	0.018	0.023
5-6	-0.016	-0.047	-0.021	-0.017
6-7	0.057	0.025	0.029	0.029
7-8	-0.033	-0.069	-0.031	-0.011
8-9	-0.038	-0.056	-0.075	-0.090
9-1	0.003	-0.054	-0.020	-0.010
4-9	0.080	-0.007	0.031	0.046
σ	0.0582	0.0583	0.0536	0.0496
σ^2	0.00339	0.00339	0.00288	0.00246

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.

6. Исследована структура эмиттера флуоресцентной реакции CLM. Показано, что учет электронных корреляций позволяет получить структуру, наиболее близкую к экспериментальной, что важно для правильной оценки люминесцентных свойств. Расчет без учета электронных корреляций подобных струк-

Таблица 4

Отклонения длин связей структуры CLZ(7H) от эксперимента (Å). Номера атомов i и j соответствуют рис.1

	PM6 CI	HF	DFT	MP2
1-2	-0.030	-0.085	-0.038	-0.009
2-3	0.043	0.036	0.015	-0.007
3-4	0.097	0.017	0.060	0.069
4-5	0.060	0.051	0.038	0.032
5-6	-0.040	-0.070	-0.041	-0.032
6-7	0.091	0.055	0.060	0.048
7-8	0.042	0.037	0.027	0.018
8-9	-0.106	-0.153	-0.121	-0.108
9-1	0.036	0.007	-0.009	-0.020
4-9	0.119	0.062	0.072	0.062
σ	0.0702	0.0729	0.0599	0.0529
σ^2	0.00493	0.00532	0.00358	0.00280

тур приводит к неправильной геометрии системы и, как следствие, к ошибкам в понимании природы фотофизических процессов.

Целентеразин может существовать в двух изомерных формах – CLZ(1H) и CLZ(7H). Так как геометрически эти структуры очень похожи, экспериментально невозможно определить, какая таутомерная форма существует в растворителях. Энергетически структуры CLZ(1H) и CLZ(7H) также очень похожи. Учет корреляций уменьшает энергетическую разницу между этими структурами, а учет растворителя практически нивелирует ее. Исходя из сравнения атомной структуры, можно сделать вывод, что начальной структурой процесса флуоресценции будет являться структура CLZ(1H), а не CLZ(7H), как считалось ранее.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, грант # 07-04-00930-а, программы Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология” и программы Сибирского отделения РАН (проект № 2).

1. G. A. Stepanyuk, Z.-J. Liu, S. S. Markova et al., Photochem. Photobiol. Sci. **7**, 442 (2008).
2. Z.-J. Liu, E. S. Vysotski, C.-J. Chen et al., Protein Science **9**, 2085 (2000).
3. J. F. Head, S. Inouye, K. Teranishi et al., Nature **405**, 372 (2000).
4. F. G. Predergast, Nature **405**, 291 (2000).
5. K. Mori, S. Maki, H. Niwa et al., Tetrahedron **62**, 6272 (2006).
6. K. Hori, H. Charbonneau, R. C. Hart et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**, 4285 (1997).

7. P. Hohenberg and W. Kohn, Phys. Rev. Lett. **136**, B864 (1964).
8. W. Kohn and L. Sham, Phys. Rev. Lett. **140**, A1133 (1965).
9. J. P. Perdew and Y. Wang, Phys. Rev. B. **45**, 13244 (1992).
10. S. J. Vosko, L. Wilk, and M. Nusair, Can. J. Phys. **58**, 1200 (1980).
11. C. Møller and M. S. Plesset, Phys. Rev. **46**, 618 (1934).
12. A. D. Becke, J. Chem. Phys. **109**, 2093 (1998).
13. S. Miertus, E. Scrocco, and J. Tomasi, Chem. Phys. **55**, 117 (1981).
14. S. Miertus and J. Tomasi, Chem. Phys. **65**, 239 (1982).
15. M. Cossi, V. Barone, R. Cammi et al., Chem. Phys. Lett. **255**, 327 (1996).
16. V. Barone, M. Cossi, B. Mennucci et al., J. J. Chem. Phys. **107**, 3210 (1997).