

УДК 577.332

## МОДЕЛИРОВАНИЕ СПЕКТРОВ МУТАНТНЫХ ФОРМ КРАСНЫХ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ БЕЛКОВ

А.М. Кулакова, М.Г. Хренова\*, А.В. Немухин

*(Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, кафедра физической химии; \*e-mail: wasabiko@lcc.chem.msu.ru)*

В данной работе представлены результаты описания красных флуоресцентных белков комбинированным методом квантовой механики / молекулярной механики с описанием квантово-механической подсистемы методом функционала электронной плотности в приближении сильной связи (DFTB). На основании рассчитанных энергий вертикальных электронных переходов сделан вывод о том, что выбранный метод подходит для оценочных расчетов равновесных геометрических конфигураций, однако не может использоваться для последующей оценки энергий вертикальных электронных переходов.

**Ключевые слова:** флуоресцентные белки, КМ/ММ, DFTB.

Компьютерное моделирование свойств белков методами на основе квантовой теории становится все более доступным. Однако даже в рамках комбинированного подхода квантовой механики / молекулярной механики (КМ/ММ) применение неэмпирических вариантов квантово-химических расчетов для описания квантовых подсистем требует значительных вычислительных затрат. Поэтому анализ возможностей более экономичных вариантов расчета представляет собой важную задачу современной теоретической химии.

В данной работе мы рассматриваем проблему оценки структур и спектров красных флуоресцентных белков – важнейших маркеров моле-

кулярных процессов в живых системах. Свойства фотоактивных белков, включая оптические спектры, достаточно уверенно предсказываются современными методиками КМ/ММ с использованием теории функционала электронной плотности (DFT) для поиска равновесных геометрических конфигураций в хромофорсодержащей области и современных подходов для расчетов энергии электронных переходов для КМ-подсистем [1]. При использовании метода DFT с гибридными функционалами типичный размер КМ-подсистемы составляет около 100–200 атомов, и расчет одной стационарной точки (оптимизация геометрических параметров системы) требует нескольких суток при использовании

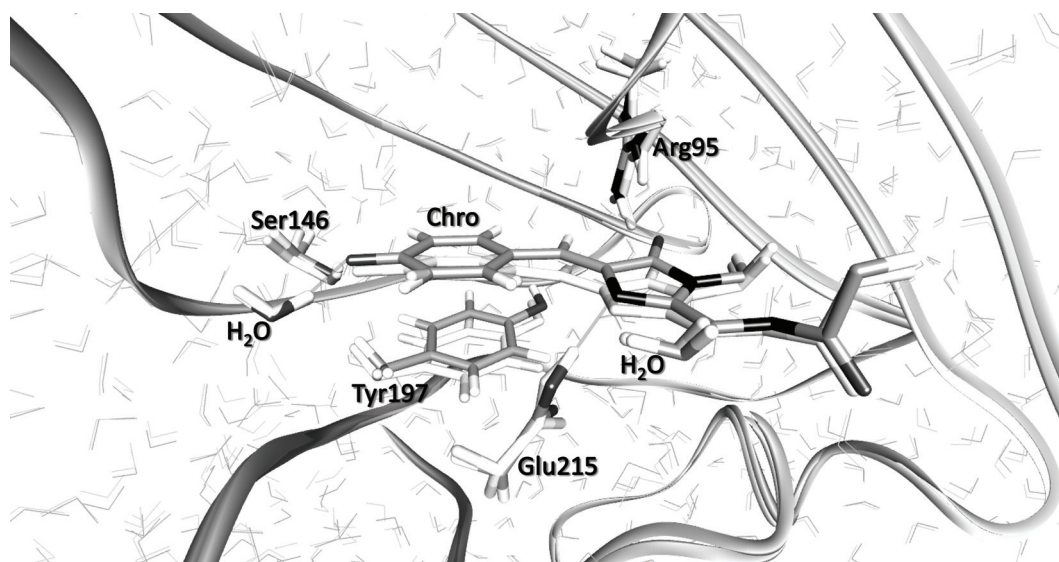


Рис. 1. Наложение структур белка mRojoA, полученных методом КМ/ММ, с описанием квантовой подсистемы методами DFT и DFTB

около ста современных вычислительных ядер. Такие затраты ресурсов слишком велики, в особенности, когда необходимо анализировать большое число структур, например, при переборе различных мутантных форм белка для прогнозирования новых вариантов с улучшенными свойствами. В этой связи поиск эффективного решения минимизации вычислительных затрат представляет собой актуальную задачу. Согласно литературным источникам, одним из обещающих подходов в этом направлении может быть полуэмпирический метод функционала электронной плотности в приближении сильной связи (DFTB) [2] с параметризацией 3об, специально разработанной для биологических и органических молекул [3]. Этот метод позволяет значительно расширить размеры КМ-подсистемы до 400–500 атомов, сильно сокращая при этом затраты ресурсов.

В данной работе для анализа выбраны красный флуоресцентный белок mCherry (PDB ID: 2H5Q), и его модификации mRojoA, mRojoA-VYGV и mRojoA-YChroY. Белок mRojoA (PDB ID: 3NEZ), построенный на основе mCherry посредством шести точечных мутаций Val16Thr/Arg125His/Gln163Leu/Val195Ala/Ile197Tyr/Ala217Cys [4], содержит аминокислотный остаток Tyr197, вовлеченный в  $\pi$ -стэкинг с ароматическим кольцом хромофора (Chro). Белок mRojoA-VYGV, построенный из mRojoA посредством четырех мутаций Thr16Val/Pro63Tyr/Trp143Gly/Leu163Val [5], содержит аминокислотный остаток Tyr63, который также должен вступать в  $\pi$ -стэкинг с хромофором, но согласно кристаллографиче-

ским исследованиям, располагается под углом к плоскости хромофора. В белке mRojoA-YChroY предложены дополнительные по сравнению с вариантом mRojoA-VYGV мутации (Gly143Ser/Ile161Asn/Val163Ser/Val177Tyr/Leu199Ala) [6], позволяющие установить копланарность ароматических колец Tyr63 и хромофора.

В качестве начальных геометрических конфигураций выбраны четыре структуры белков (mCherry, mRojoA, mRojoA-VYGV, mRojoA-YChroY), рассмотренные ранее методами DFT/ММ [6]. Модельные системы содержат белки и молекулы воды, образующие сольватные оболочки на расстоянии до 4 Å от поверхности белка. Для оптимизации геометрических параметров применяли метод DFTB/ММ, т.е. в отличие от работы [6] в квантовой подсистеме для определения структурных параметров использовали экономный вариант DFTB вместо DFT. Для описания молекулярно-механической части в обоих подходах использовали силовое поле Charmm [7]. В квантовую подсистему для всех систем входили хромофор, боковые цепи аминокислотных остатков Lys70, Arg95, Ser146, Glu148, Glu215 и две молекулы воды. Для систем, содержащих остатки тирозина, были также включены ароматические  $\pi$ -системы (Tyr197 и Tyr63), а также аминокислотные остатки и молекулы воды, образующие сеть водородных связей вблизи хромофора. Таким образом, рассматриваемые в рамках метода DFTB КМ-подсистемы превышали по размерам таковые в расчетах методом DFT. Расчет проводился в программном пакете CP2K [8].

Т а б л и ц а 1

Геометрические параметры  $\pi$ -стэкинга\*

Структура	Метод	$r$ (Tyr197-Chro), Å	Угол (Tyr197-Chro), град.	$r$ (Tyr63-Chro), Å	Угол (Tyr63-Chro), град.
mRojoA	DFTB/ММ	3,76	10	–	–
	DFT/ММ	3,68	20	–	–
	РСА	3,9	8	–	–
mRojoA-VYGV	DFTB/ММ	3,57	3	4,52	65
	DFT/ММ	3,60	13	4,71	42
	РСА	3,7 ± 0,1	0 ± 3	4,8 ± 0,1	71 ± 4
mRojoA-YChroY	DFTB/ММ	3,62	7	3,50	9
	DFT/ММ	3,78	10	3,72	8

\*Значения, полученные описанием КМ-части методом DFT(PBE0/сс-pVDZ), взяты из работы [6].

Равновесные геометрические конфигурации, полученные методом DFTB/MM, сравнивали с результатами предшествующих расчетов [6] методом КМ/ММ с описанием квантовой подсистемы методом теории функционала электронной плотности в варианте PBE0-D3/сс-pVDZ. В качестве геометрических параметров  $\pi$ -стэкинга рассматривались расстояния между геометрическими центрами ароматических колец тирозинов и хромофора, а также углы между векторами нормали к плоскости ароматических колец. Из табл. 1 видно, что геометрические параметры, полученные методом DFTB/MM, согласуются с данными DFT/MM и данными РСА. Положение Tyr197 относительно хромофора описывается несколько лучше методом DFTB/MM, чем методом DFT/MM, если ориентироваться на РСА.

Другими важными параметрами, требующими тщательного анализа при описании хромофорсодержащей области (рис. 1), являются ковалентные связи сопряженной  $\pi$ -системы хромофора и водородные связи, которые он образует. Хромофорная группа флуоресцентных белков может находиться в разных резонансных состояниях (рис. 2). Для анализа геометрических

параметров структуры хромофора рассмотрены длины связей O–C фенольного фрагмента, O–C имидазолидинового кольца и мостиковых C–C-связей (табл. 2). Важна также длина водородных связей (измеряемая здесь как расстояние между тяжелыми атомами) между хромофором и аминокислотными остатками Arg95, Ser146, Glu215 и молекулой воды, связанной водородной связью с кислородом фенольной части хромофора. В методе DFTB получают немного удлиненные ковалентные связи (в среднем на 0,03 Å), водородные связи отличаются в среднем на 0,1 Å – от 0,09 Å (для mRojoA-VYGV) до 0,11 Å (для mRojoA-YChroY). При этом водородные связи между аминокислотными остатками в методе DFTB увеличиваются по сравнению с методом DFT, в то время как водородная связь хромофора с молекулой воды уменьшается на 0,13 Å.

На основании полученных геометрических параметров рассчитаны значения энергии вертикальных переходов ( $S_{0, \text{мин}} \rightarrow S_1$ ) методами нестационарной теории функционала электронной плотности TDDFT [9], конфигурационно-го взаимодействия с масштабированием вкладов от динамической корреляции электронов с

Таблица 2

**Различия в геометрических параметрах хромофора (Å). Значения  $\Delta r_1, \Delta r_2, \Delta r_3, \Delta r_4$  вычислены как разность между соответствующими длинами связей (рис. 2) для равновесных геометрических конфигураций, полученных методами DFTB/MM и DFT/MM [6]**

Параметр	mCherry	mRojoA	mRojoA-VYGV	mRojoA-YChroY
$\Delta r_1$	0,028	0,020	0,020	0,043
$\Delta r_2$	0,014	0,015	0,012	0,022
$\Delta r_3$	0,000	0,006	0,008	-0,001
$\Delta r_4$	0,047	0,053	0,052	0,047
$\Delta r_{\text{ср.}}^*$	0,033	0,034	0,033	0,039

\* $\Delta r_{\text{ср.}}$  – среднеквадратичное отклонение, полученное при учете всех геометрических параметров.

Таблица 3

**Значения энергии вертикальных переходов  $S_{0, \text{мин}} \rightarrow S_1$  в эВ и нм (в скобках), рассчитанные для равновесных геометрических конфигураций, полученных методом DFTB/MM (в этой работе) и DFT/MM (в работе [6])**

Структура	TDDFT ( $\omega$ B97X-D)		SOS-CIS(D)		XMCQDPT2		Эксперимент
	DFTB/MM	DFT/MM	DFTB/MM	DFT/MM	DFTB/MM	DFT/MM	
mCherry	3,03 (409)	3,11 (399)	2,28 (544)	2,39 (519)	2,11 (587)	2,20 (567)	2,14 (578)
mRojoA	3,04 (408)	3,02 (410)	2,40 (516)	2,32 (534)	2,08 (595)	2,10 (590)	2,08 (596)
mRojoA-VYGV	2,96 (419)	2,94 (422)	2,22(559)	2,27 (547)	1,98 (625)	2,08 (595)	2,10 (591)
mRojoA-YChroY	2,87 (432)	3,01 (412)	2,10(590)	2,28 (544)	1,78 (697)	1,93 (643)	–

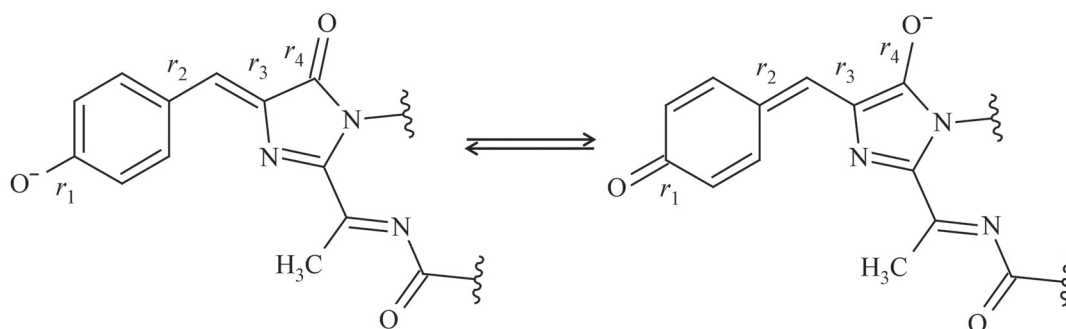


Рис. 2. Резонансные структуры хромофора рассматриваемых красных флуоресцентных белков

противоположными спинами SOS-CIS(D) [10] и многоконfigurационной квазивырожденной теории возмущений второго порядка XMCQDFT2 [11]. Для расчетов использовали программные пакеты ORCA [12], QChem [13] и Firefly [14] соответственно. Размеры изучаемых модельных систем были выбраны так же, как в работе [6] и включали в себя хромофор и ближайшие аминокислотные остатки. В табл. 3 приведены значения энергии вертикальных переходов между основным и первым возбужденным состояниями  $S_{0, \text{мин}} \rightarrow S_1$ .

Значения энергии вертикальных переходов  $S_{0, \text{мин}} \rightarrow S_1$ , полученные методом нестационарной теории функционала электронной плотности TDDFT с использованием функционала  $\omega$ B97X-D [15] и рассчитанные для равновесных

геометрических конфигураций систем mRojoA и mRojoA-VYGV методами DFTB/MM и DFT/MM, хорошо согласуются между собой. Однако экспериментальные сдвиги энергий переходов  $S_{0, \text{мин}} \rightarrow S_1$  относительно реперной структуры mCherry, полученные методом DFTB/MM, не воспроизводятся ни в одном из использованных методов.

Таким образом, выбранный в данной работе метод DFTB для описания квантово-механической системы в КМ/MM-моделировании, можно применять для оценочных расчетов равновесных геометрических конфигураций флуоресцентных белков, однако для оценки вертикальной энергии переходов требуется описание структуры системы методами более высокого уровня точности.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 16-03-00078) с использованием оборудования Центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами МГУ имени М.В. Ломоносова.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Acharya A., Bogdanov A.M., Grigorenko B.L., Bravaya K.B., Nemukhin A.V., Lukyanov K.A., Krylov A.I. // Chem. Rev. 2017. Vol. 117. P. 758.
- Elstner M., Porezag D., Jungnickel G., Elsner J., Haugk M., Frauenheim T., Suhai S., Seifert G. // Phys. Rev. B 1998. Vol. 58. P. 7260.
- Gaus M., Goez A., Elstner M. // J. Chem. Theory Comput. 2013. Vol. 9. P. 338.
- Chica R.A., Moore M.M., Allen B.D., Mayo S.L. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2010. Vol. 107. P. 20257.
- Pandelieva A.T., Baran M.J., Calderini G.F., McCann J.L., Tremblay V., Sarvan S., Davey J.A., Couture J.-F., Chica R. A. // ACS Chem. Biol. 2016. Vol. 11. P. 508.
- Khrenova M.G., Polyakov I.V., Grigorenko B.L., Krylov A.I., Nemukhin A.V. // J. Phys. Chem. B 2017. Vol. 121. P. 10602.
- Best R.B., Zhu X., Shim J., Lopes P.E.M., Mittal J., Feig M., MacKerell Jr. A.D. // J. Chem. Theory Comput. 2012. Vol. 8. P. 3257.
- Hutter J., Iannuzzi M., Schiffmann F., VandeVondele J. // Wiley Interdiscip. Rev.: Comput. Mol. Sci. 2014. Vol. 4. P. 15.
- Petersilka M., Gossmann U.J., Gross E.K.U. // Phys. Rev. Lett. 1996. Vol. 76. P. 1212.
- Rhee Y.M., Head-Gordon M. // J. Phys. Chem. A. 2007. Vol. 111. P. 5314.
- Granovsky A.A. // J. Chem. Phys. 2011. Vol. 134. P. 214113.
- Neese F. // Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci. 2012. Vol. 2. P. 73.
- Shao Y. et al. // Mol. Phys. 2015. Vol. 113. P. 184.
- Granovsky A.A. Firefly version 8, <http://classic.chem.msu.su/gran/firefly/index.html>
- Chai J.-D., Head-Gordon M. // Phys. Chem. Chem. Phys. 2008. Vol. 10. P. 6615.

## MODELING OF SPECTRA OF THE RED FLUORESCENT PROTEINS MUTANTS

**A.M. Kulakova, M.G. Khrenova\*, A.V. Nemukhin**

*(M.V. Lomonosov Moscow State University, Division of Physical Chemistry;*

*\*e-mail: wasabiko@lcc.chem.msu.ru)*

**In this paper we present the results of the description of red fluorescent proteins by the combined quantum mechanics / molecular mechanics approach with a description of the quantum-mechanical subsystem at the density functional based tight binding (DFTB) level of theory. Based on the calculated vertical electronic transition energies, it is concluded that this method is suitable for estimating equilibrium geometry configurations, but it is not recommended to use it for the subsequent estimation of the of electronic transition energies.**

**Key words:** fluorescent proteins, QM/MM, DFTB.

**Сведения об авторах:** *Кулакова Анна Михайловна* – аспирант кафедры физической химии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (kulakova@lcc.chem.msu.ru); *Хренова Мария Григорьевна* – вед. науч. сотр. лаборатории химической кибернетики кафедры физической химии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, докт. физ.-матем. наук (khrenova.maria@gmail.com); *Немухин Александр Владимирович* – профессор кафедры физической химии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, лаборатория химической кибернетики, докт. хим. наук (anem@lcc.chem.msu.ru).